

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINHA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADEMICA DE SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA**

EDILBERTO ALVES GRANGEIRO JÚNIOR

**COMPARAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE MICROENCAPSULAÇÃO
CONTENDO BETALAÍNAS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
PELO MÉTODO DE DPPH**

CUITÉ/PB

2016

EDILBERTO ALVES GRANGEIRO JÚNIOR

**COMPARAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE MICROENCAPSULAÇÃO
CONTENDO BETALAÍNAS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
PELO MÉTODO DE DPPH**

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande UFCG/CES, como requisito à obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana de Souza Alencar Falcão

CUITÉ/PB

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

G757c Grangeiro Júnior, Edilberto Alves.

Comparação de diferentes técnicas de microencapsulação contendo betalaínas e avaliação da atividade antioxidante pelo método de DPPH. / Edilberto Alves Grangeiro Júnior. – Cuité: CES, 2016.

70 fl.

Monografia (Curso de Graduação em Farmácia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2016.

Orientadora: Dra. Juliana de Souza Alencar Falcão.

1. Beterraba. 2. Microencapsulação. 3. DPPH. I. Título.

EDILBERTO ALVES GRANGEIRO JÚNIOR

**COMPARAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE MICROENCAPSULAÇÃO
CONTENDO BETALAÍNAS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
PELO MÉTODO DE DPPH**

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande UFCG/CES, como requisito à obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em: 22/02/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Juliana de Souza Alencar Falcão
(Orientadora)

Msc. Maria da Glória Batista de Azevedo

Prof^a Dr^a Júlia Beatriz Pereira de Souza

A Deus;

Aos meus pais Edilberto Alves Grangeiro e Jackeline Coelho Grangeiro;

Aos meus avôs Joaquim de Lima, Lourdes Coelho de Lima, Gilberto Grangeiro Pereira (*in memorian*) e Maria Alves Grangeiro (*in memorian*);

A minha noiva Allane Costa da Silva;

Agradecimentos

A Deus por ter iluminado e enchido meu espírito com a força de vontade para continuar esse trabalho, nos momentos que eu fraquejei o Senhor me guiou e me levou.

Aos meus pais Edilberto Alves Grangeiro e Jackeline Coelho Grangeiro, por serem esses batalhadores; que apesar de todas as dificuldades tornaram esse sonho possível, me sinto honrado de ser filho de vocês.

A Allane Costa da Silva, por ter me dado apoio, carinho e atenção em todos os dias que está comigo, obrigado por ser minha amiga, confidente e noiva, este trabalho também é seu.

A minha família, por terem acreditado em mim e sempre me receberem de volta com carinho e apoio, após os tempos fora de casa.

Aos Amigos, Alberto Magno, Sarah Hanna, Valmir Ferreira, Gabriel, Gean e Irajá, vocês foram a minha família em Cuité.

A Juliana de Souza Alencar Falcão, pelos ensinamentos e paciência com as minhas dificuldades, obrigado por ser minha orientadora, professora e exemplo. Levarei seus conselhos e ensinamentos para sempre.

A Maria da Glória Batista de Azevedo por ter me auxiliado durante a construção desse trabalho, sempre que eu precisava você me ajudava e orientava obrigado pela paciência e dedicação.

A Cuité e todos os cuitenses, ao qual destaco Lurdinha, Robério, Chimba, Zefa, Antônio dourado e Dadá, por me acolherem nessa cidade.

Aos funcionários do CES: porteiros, guardas, jardineiros, técnicos, professores e serviços gerais, por terem me auxiliado e me ensinado cada um a sua maneira.

O que fizemos apenas por nós mesmos morre conosco; o que fizemos pelos outros e pelo mundo permanece e é imortal.

Albert Pike

Resumo

Diversos processos fisiológicos ou patológicos são associados à produção de radicais livres, responsáveis pela homeostasia celular ou paradoxalmente ao declínio progressivo e irreversível das diferentes funções orgânicas. Os compostos antioxidantes são as substâncias responsáveis pelo controle da produção dos radicais livres. Dentre os diversos exemplos de antioxidantes, existe uma classe extraída das beterrabas (*Beta vulgaris* L) chamada betalaínas, capaz de doar elétrons para os agentes oxidantes. O objetivo desse trabalho foi comparar diferentes técnicas de microencapsulação para o padrão e o extrato de beterraba, sendo observadas, as cinéticas de liberação e os graus de intumescimento, avaliando também a atividade antioxidante através da reação envolvendo o 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). As cinéticas de liberação e os testes de grau de intumescimento indicaram que a DAE possui uma liberação mais imediata, atuando como um sistema encapsulante inerte. A coacervação complexa, por sua vez, libera o ativo lentamente, sendo o seu mecanismo de liberação relacionado, principalmente, ao intumescimento. Os resultados obtidos indicaram a viabilidade da fabricação dos sistemas microparticulados e a potencialização da atividade antioxidante do padrão e do extrato de beterraba após a incorporação na formulação. Portanto, as pesquisas com sistemas microencapsulados que envolvam antioxidantes devem ser estimuladas, a fim de garantir uma maior eficácia desses compostos, seja no âmbito farmacêutico, cosmético ou alimentício.

Palavras-chave: Beterraba, Microencapsulação, 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).

ABSTRACT

Many physiological or pathological processes are associated with the production of free radicals responsible for cellular homeostasis or paradoxically to progressive and irreversible decline of different physiological functions. The antioxidants are substances responsible for controlling the production of free radicals. Among the many examples of antioxidants, there is class extracted from beet (*Beta vulgaris* L.) call betalains, able to donate electrons to the oxidizing agents. The objective of this study was to compare different microencapsulation techniques, of standard and beet extract, being observed, the kinetic releases and degrees of intumescence, also evaluating the antioxidant activity by the reaction involving 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH). The tests of kinetics of release and the intumescence degree indicated that the DAE has a more immediate release, acting as an inert encapsulant system. The complex coacervation, in turn, releases the active slowly, and its associated release mechanism, mainly to intumescence. These results indicate the feasibility of production of microparticulate systems and the increase antioxidant activity of the standard and beet extract, after incorporating in the formulation. Therefore, research on microencapsulated systems involving antioxidants should be encouraged in order to ensure greater effectiveness of these compounds, at the scope pharmaceutical, cosmetic or food.

Keywords:Beets, Microencapsulation, 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH).

LISTA DE ABREVIATURAS

ICAM	Molécula de adesão intercelular
DAE	Emulsão adsorvida a seco
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
PEG	Polietilenoglicol
Mm	Micromolar
IC ₅₀	Concentração inibitória para que 50%
Mm	Micrometro
IUPAC	União internacional de química pura e aplicada
UV/VIS	Ultravioleta visível
Rpm	Rotações por minuto
Nm	Nanômetro
A/O	Água em óleo
m/m	Massa/massa
v/v	Volume/volume
m/v	Massa/volume
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda máximo

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura química geral das betalaínas.	18
Figura 2 -Betanidina 5-O- α -glicosídeo.	20
Figura 3 - Reação de estabilização do radical livre DPPH.	21
Figura 4 - Reação de obtenção do estearato de cálcio e fluxograma de sua síntese.	31
Figura 5- Fluxograma de obtenção DAE.	32
Figura 6 - Fluxograma de obtenção das microesferas obtidas por coacervação.	33
Figura 7 - Microscopia dos extratos A- Betalaína padrão solubilizado em água; B- Extrato AA; C- extrato A7; D- extrato AC.	36
Figura 8- Processo de eluição das betalaínas realizado com os extratos alcoólicos. A -corrida cromatográfica para o extrato A7; B- corrida cromatográfica para o extrato AA.	37
Figura 9 - Processo de eluição das betalaínas realizado com o extrato AC.	37
Figura 10 - Varredura da solução aquosa contendo betalaína padrão. Em destaque a região entre 530 e 540 nm.	38
Figura 11- Região de maior absorção do corante (532 e 535nm) em espectroscopia UV/VIS.	39
Figura 12 - Curvas de calibração para diferentes pHs . A- pH 5,0 $abs=0,2888x-0,1055$; $r^2=0,9993$. B- pH7,0 $abs=0,2833x-0,09409$; $r^2=0,9998$.	39
Figura 13 - Etapas de preparação da DAE. A- óleo de rícino e estearato de cálcio. B- adição do ativo e da sílica hidrofílica. C- adição da sílica hidrofóbica. D- formulação final antes de tamisar.	41
Figura 14 – Formulação DAE após a tamisação. A- DAE tamisada (mesh 48) (F1) ; B- DAE não tamisada(F2).	42
Figura 15 – Alterações físicas após armazenamento da formulação. A- DAE com estearato de sódio; B- (F1), DAE com estearato de cálcio (tamisada); C- (F2), DAE com estearato de cálcio (não tamisada).	42
Figura 16 – Placebo da coacervação (COA-PL) obtido sem o acoplamento da agulha.	43

- Figura 17 - Esferas obtidas contendo padrão de betalaínas (COA-PA), após o acoplamento da agulha 43
- Figura 18 - Processo de gotejamento na solução de quitosana e CaCl_2 44
- Figura 19 - Esferas contendo o padrão de betalaínas(COA-PA), após o período de secagem. 45
- Figura 20 - Cinética de liberação da DAE-PA, com intervalos de 20 minutos durante o período de duas horas 45
- Figura 21- Material residual obtido durante o teste de cinética com COA-PA. A- Turvação do sistema, logo após o contato das partículas e o tampão. B- amostra retirada do meio reacional, após a centrifugação. 46
- Figura 22 - Cinética de liberação da COA-PA, com intervalos de 20 minutos durante o período de duas horas 47
- Figura 23 - Mecanismo de liberação das micropartículas preparadas através da técnica DAE 48
- Figura 24 - Mecanismo de liberação das micropartículas preparadas através da técnica coacervação complexa 50
- Figura 25- Varredura feita em espectrofotômetro com o DPPH no sistema tampão pH 7,0. Onde o comprimento de onda de maior absorção foi de 550nm. 51
- Figura 26 - Curva de calibração em tampão fosfato citrato pH 7,0 para o DPPH 51
- Figura 27 - Teste de antioxidante realizado com as formulações preparadas pela técnica DAE 52
- Figura 28 - Teste antioxidante realizado com partículas DAE-PL. A- Solução em contato com DAE-PL no tempo inicial do teste; B- Solução em contato com DAE-PL no tempo final do teste. 52
- Figura 29 - Teste antioxidante realizado com as formulações preparadas pela técnica coacervação complexa. 53
- Figura 30 -Teste de antioxidante realizado com COA-PL. A- Solução de DPPH em contato com partículas COA-PL, B- Material liberado no meio reacional após centrifugação. 54
- Figura 31- Comportamento do DPPH em diferentes sistemas solventes: A- Absorção do DPPH ao material residual liberado pela COA-PL. B- Material residual desidratado (roxo). C- Material residual contendo DPPH em 54

diferentes solventes (tubo 1- metanol e tubo 2 - tampão). D- Solubilização do DPPH após agitação (tubo 1- metanol e tubo 2 - tampão).

Figura 32- Mudança da coloração ao longo do teste com COA-PA. A- 55
Início do teste, B – intervalo de 40 minutos, C- 80 minutos, observar a mudança de coloração da solução, D- 120 minutos.

Figura 33 - Comparação entre a coloração do material residual. A- 56
Material obtido do teste com COA-PA (amarelo) e B-Material obtido do teste de COA-PL (roxo).

Figura 34 - Mudança da coloração ao longo do teste entre DPPH e COA- 56
AC. T0- Tempo inicial; T1- Após 40 minutos ; T2 – 80 minutos; T3- 120 minutos.

Figura 35- Comparação entre a coloração do material residual coletado. 57
Observar as colorações características de cada amostra. A-Material oriundo de COA-AC (amarelo); B- Material oriundo de COA-PL (roxo).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 Betalaínas	18
2.1.1 Origem e classificação das betalaínas	18
2.1.2 Propriedades físico-químicas	19
2.1.3 Métodos de extração das betalaínas	20
2.1.4 Propriedades antioxidantes	20
2.2 Avaliação das propriedades antioxidantes: método DPPH	22
2.3 Sistemas microparticulados.....	23
2.3.1 Antioxidantes nos sistemas microparticulados.....	23
2.3.2 Emulsão adsorvida à seco - DAE	24
2.3.3 Coacervação complexa	25
2.4 Controle de qualidade	25
2.4.1 Controle de qualidade da substância ativa	25
2.4.2 Controle de qualidade do produto acabado	25
4 OBJETIVO	27
4.1 Objetivo geral	27
4.2 Objetivo específico	27
5 MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1 Reagentes.....	28
5.2 Equipamentos	28
5.3 Métodos	29
5.3.1 Obtenção do extrato de beterraba	29
5.3.2 Controle de qualidade do extrato da beterraba.....	29
5.3.2.1 Análise microscópica e macroscópica.....	30
5.3.2.2 pH	30
5.3.2.3 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	30
5.3.2.4 Espectroscopia UV/Visível.....	31
5.3.3 Síntese do estearato de cálcio	31
5.3.4 Emulsão adsorvida à seco - DAE	32
5.3.5 Coacervação complexa	33
5.3.6 Avaliação da liberação do antioxidante em função do tempo	34

5.3.7 Determinação do grau de intumescimento	
5.3.8 Avaliação da atividade antioxidante.....	35
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6.1 Obtenções do extrato	37
6.2 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	38
6.3 Varredura espectro UV- Visível para o corante betalaína	40
6.4 Curva de calibração do corante betalaína	41
6.5 Doseamento de betalaínas nos extratos.....	41
6.6 Obtenção das micropartículas	43
6.6.1 Emulsão adsorvida à seco - DAE	43
6.6.2 Coacervação Complexa	45
6.7 Cinéticas de liberação:	48
6.7.1 DAE.....	48
6.7.2 Coacervação complexa	49
6.8 Grau de intumescimento das micropartículas	50
6.9 Avaliação da atividade antioxidante através do método DPPH.....	53
6.9.1 Varredura espectro UV-visível para o DPPH	53
6.9.2 Curva de calibração do DPPH.....	54
6.9.3 Avaliação da atividade antioxidante.....	55
7 CONCLUSÃO.....	62
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1 INTRODUÇÃO

Em condições fisiológicas durante a respiração celular, o corpo produz agentes oxidantes chamados de radicais livres. Para balancear essa produção, existem sistemas endógenos e exógenos que possuem a capacidade de inativar esses agentes, chamamos isso de efeito antioxidante (HARRIS, 2003).

Dentre os diversos exemplos de compostos com atividade antioxidante, existe uma classe extraída das beterrabas (*Beta vulgaris* L), as betalaínas, ainda pouco estudadas e com potencial promissor (MARTINS, 2010). Dentre a gama de efeitos atribuídos as betalaínas são descritos: inibição da expressão de ICAM-1, inibição dependente da dose de determinados tipos de cânceres e principalmente um efeito inibitório da peroxidação de lipídeos (LIVREA e TESORIERE, 2006). O grande problema das betalaínas é sua instabilidade perante fatores externos (pH, luz, atividade de água e concentração de O₂), tornando-o um candidato favorável a microencapsulação (SCHAFFAZICK, 2006 ; STULZER, 2008; COSTA, 2011).

Os sistemas microparticulados possuem o tamanho na ordem de micrômetros, sendo classificados em microcápsulas e microesferas. Entre suas vantagens se destacam a liberação direcionada do princípio ativo, níveis plasmáticos mais constantes e diminuição da frequência de administração. Existem diversos métodos para a preparação desses sistemas, tais como: coacervação simples e complexa, fluidização, atomização e DAE (Emulsão adsorvida a seco). Diversas substâncias podem ser incorporadas a esses sistemas, de medicamentos a antioxidantes, sempre com o objetivo primordial de proteger e liberar gradativamente o princípio ativo (SCHAFFAZICK, 2006; STULZER, 2008; COSTA 2011; SEVERINO et al. , 2011).

Desta maneira, o desenvolvimento e/ou comparação de metodologias relacionadas à encapsulação de compostos que possuam alguma atividade fisiológica (como as betalínas) são de suma importância, visto que, essas técnicas podem levar a uma potencialização da atividade, melhorando significativamente um possível uso desse constituinte.

Portanto, o presente trabalho propõe a comparação entre duas técnicas de microencapsulação para o extrato da beterraba, a DAE e a coacervação complexa; realizando o controle de qualidade da substância ativa e do produto acabado; bem como a avaliação do potencial antioxidante do extrato de beterraba *in natura* e microencapsulada, através do método DPPH.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Betalaínas

2.1.1 Origem e classificação das betalaínas

A beterraba é uma hortaliça bastante consumida no Brasil, cuja parte tuberosa tem sabor doce e coloração roxa. É fonte de sais minerais, principalmente ferro, e açúcar (EMBRAPA, 2010). É originária da Europa, pertencente à família *Quenopodiácea*, assim como a acelga e o espinafre verdadeiro (EMBRAPA, 2014).

Existem três tipos de beterraba: a beterraba açucareira, usada para produção de açúcar, a beterraba forrageira, usada para alimentação animal e aquela cujas raízes são consumidas como hortaliça, sendo a mais conhecida no Brasil (EMBRAPA, 2014).

Segundo Zabotti e Genena (2013) e Gonçalves et al. (2015), a beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L.) é conhecida por possuir as betalaínas, as quais são classificadas em: betacianinas, (Latim: *beta*= beterraba ; Grego: *Kyaneos* =Azul) produtos da condensação entre o ácido betalâmico e derivados glicosilados da ciclo-DOPA, com comprimento de onda máximo próximo à 540 nm, que conferem cor vermelho-violeta à beterraba; e betaxantinas, (Grego: *xanthos* = amarelo) iminas ou sais de imínio com máximo de absorção entre 460 e 480 nm, originadas do acoplamento entre o ácido betalâmico e aminoácidos, sendo corantes amarelo-laranja também presentes na beterraba vermelha só que em menor proporção que as betacianinas.

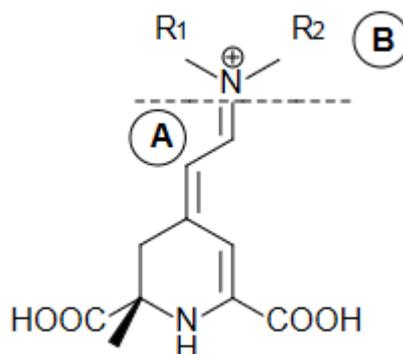
As betacianinas compreendem 80-90% das betalaínas da beterraba vermelha, se apresentam glicosiladas e derivam das agliconas betanidina e isobetanidina, um epímero do C-15 da betanidina. Dentre as betacianinas, a betanina e o seu diastereoisômero isobetanina, são os pigmentos que se apresentam em maior porcentagem na beterraba vermelha, variando de 75 à 95%, se destacando como corante em alimentos; já a vulgaxantina, é a betaxantina mais comum encontrada na beterraba (DRUNKLER et al. , 2004; SCHIOZER; BARATA , 2007).

As betalaínas são compostos N-heterocíclicos solúveis em água. Entre as plantas a sua ocorrência é restrita a 10 famílias da ordem da *Caryophyllales* e podem ser encontrados no reino fungi como a *Amanita*, *Hygrocybe* e

Hygrosporus, tendo o ácido betalâmico como sendo o seu precursor comum. Além de dar origem à pigmentação vermelho-escura da beterraba (*Beta vulgaris*) estão também relacionadas com o pigmento animal, eumelanina que tem como função principal proteger a pele humana dos raios ultravioletas (VOLP et al. ,2009;SCHIOZER; BARATA , 2007).

A figura 1 mostra a estrutura geral das betalaínas, ao contrário de outros pigmentos, como antocianinas, clorofila e carotenoides, as betalaínas são pigmentos ainda pouco estudados, sendo conhecidas apenas 55 betalaínas, quando em comparação, já se conhece 550 estruturas de antocianinas (MARTINS, 2012).

Figura 1 - Estrutura química geral das betalaínas: (A) Estrutura do precursor ácido betalâmico, presente em todas as betalaínas; (B) Betacianina o R= glicose ou ácido glucurônico, betaxantina o R= anel di-hidropirínico.



Fonte: VOLP et al. ,2009.

Um fato importante de ser citado é que não há limite superior recomendado para a ingestão diária de betalaínas, sendo que estas também não apresentam efeitos tóxicos no corpo humano (COSTA, 2005; VOLP et al. ,2009; SOUZA, 2012).

2.1.2 Propriedades físico-químicas

O aquecimento de soluções de betanina produz uma redução da cor vermelha, e aparecimento de uma cor marrom clara. Em relação ao tempo de meia vida e presença de oxigênio, a estabilidade das betalaínas é máxima

entre pH 5,5 e 5,8 na presença de O₂; e entre pH 4 e 5 na ausência de O₂. O mecanismo de degradação da betanina, mediada por temperatura e/ou pH, envolve ataque nucleofílico na posição C11, originando os compostos de degradação: ácido betalâmico e ciclodopa-5-O-glicosídeo (SCHIOZER; BARATA, 2007; HORST, 2005).

A taxa de degradação da betanina aumenta 15,6% após o pigmento ser exposto à luz à 15°C. Quando as betacianinas foram expostas à luz fluorescente foi observada a sua degradação, sendo maior em pH 3,0 do que em pH 5,0. Houve total destruição dos pigmentos em tratamento de 120 horas sob radiação UV (HORST, 2005; COSTA, 2005; SCHIOZER e BARATA, 2007).

Em relação à atividade de água, a degradação das betalaínas segue uma cinética de primeira ordem, onde ocorre aumento da sua estabilidade com o decréscimo da atividade de água podendo ser atribuído à reduzida mobilidade de reagentes ou a limitada solubilidade de oxigênio. (COSTA, 2005).

2.1.3 Métodos de extração das betalaínas

As betalaínas podem ser extraídas através da maceração utilizando água ou etanol como solvente, e purificadas por cromatografia em coluna de Sephadex G25, utilizando como eluente a água deionizada; coluna de sílica gel 60, eluente metanol/água (8:2, v/v) ou centrifugação seguida por HPLC semi-preparativo (CUCHINSKI, 2010; LOPES et al. , 2009).

A maceração se mostrou um método simples e muito utilizado. Consiste em deixar o solvente, etanol 99,5% ou água (1:2 p/v), em contato com a beterraba por um período de 48 horas, seguida de filtração e rota evaporação. O recipiente que armazena o extrato deve ser coberto com papel alumínio e guardado em refrigerador (CUCHINSKI, 2010).

2.1.4 Propriedades antioxidantes

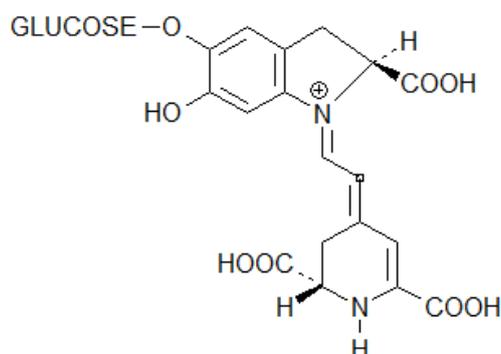
Os antioxidantes são qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz. Os meios de defesa antioxidantes do organismo podem ser divididos em dois grupos: enzimáticos e não enzimáticos. Os enzimáticos constituem a primeira defesa endógena aos ataques das espécies reativas de oxigênio (EROs), eles sequestram ou

impedem a sua formação, esse sistema é formado pela superóxido Dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e Catalase (Cat). Os não enzimáticos, na maioria das vezes necessitam ser adquiridos pela alimentação, geralmente são oriundos de frutas e vegetais; tem-se como exemplo alguns oligoelementos, vitaminas, piruvato, carotenoides, flavonoides e outros compostos derivados das plantas (MARTINS, 2010).

Os efeitos antioxidantes das betalaínas são oriundos de seus grupamentos doadores de elétrons, que são capazes de neutralizar agentes oxidantes. Dentre suas atividades antioxidantes apresentam efeito inibitório da peroxidação de lipídios em concentrações acima de 25 μM ; são capazes de inibir ligeiramente a expressão de ICAM-1, molécula de adesão encontrada em processos inflamatórios nas células endoteliais, em concentrações micromolares; em concentrações que variam de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ (25 μM) e 200 $\mu\text{g/mL}$ (340 μM) mostrou uma inibição do crescimento, dependente da dose, contra câncer de mama, do cólon, do estômago, do sistema nervoso central, e do pulmão, apresentando IC_{50} de 162, 142, 158, 164, e 147 $\mu\text{g/mL}$ (LIVREA; TESORIERE, 2006).

A estrutura das betalaínas está intimamente ligada a sua capacidade antioxidante, como exemplo a betanina (betanidina 5-O- α -glicosídeo, Figura 2) que contém um grupo fenólico e uma amina cíclica, ambos bons doadores de elétron fazendo com que ela possa neutralizar agentes oxidantes (MARTINS,2012).

Figura 2 - Betanidina 5-O- α -glicosídeo.



Fonte: MARTINS, 2012.

2.2 Avaliação das propriedades antioxidantes: método DPPH

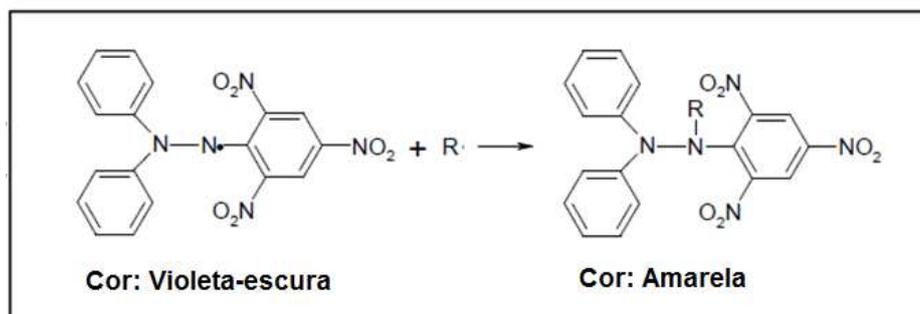
A eficiência antioxidante de compostos bioativos em alimentos de origem vegetal depende de sua estrutura e da sua concentração no alimento. A quantidade destas substâncias em vegetais é amplamente influenciada por fatores genéticos e condições ambientais (OLIVEIRA et al. , 2009).

Não existe uma metodologia universal para determinar a capacidade antioxidante, sendo necessário avaliar por diferentes ensaios. Entretanto, existem critérios para a escolha da avaliação mais adequada, tais como: utilizar moléculas biologicamente relevantes, ser tecnicamente simples, mecanismos químicos bem definidos, instrumentação facilmente disponível, boa reprodutibilidade, adaptável para ensaios de antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos (FRANÇA et al. , 2012).

Dentre as técnicas de determinação de potencial antioxidante se destaca o método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Ele um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico. (RUFINO et al. , 2007).

O método DPPH é baseado na transferência de elétrons (Figura 3), onde por ação de um antioxidante ou espécie radicalar, o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, o que resulta na alteração de cor da solução, que passa de violeta-escura (DPPH) para cor amarela (2,2difenil-picril-hidrazina), produzindo um decréscimo da absorbância (DUARTE-ALMEIDA et al. ,2006; RUFINO et al. , 2007; NASCIMENTO et al. , 2011).

Figura 3 - Reação de estabilização do radical livre DPPH.



Fonte: RUFINO et al. (2007).

2.3 Sistemas microparticulados

Micropartículas são sistemas que apresentam diâmetro na ordem de micrômetros (1 a 1000 μm) podendo ser classificadas de acordo com o seu tamanho em nanopartículas (10– 1000 nm) ou micropartículas (maiores que 1 μm), e de acordo com a sua organização, em microcápsulas, sistemas reservatórios, onde o material ativo se encontra no núcleo protegido por uma membrana encapsulante e microesferas o material ativo está disperso por toda a matriz polimérica de forma homogênea (STULZER, 2008; SCHAFFAZICK, 2006; COSTA 2011).

Nesses sistemas o princípio ativo é protegido e liberado gradativamente mediante a estímulos, tais como variações de pH, rompimento físico, intumescimento, dissolução. A principal finalidade de microencapsular é: modificar ou melhorar a aparência e as propriedades de uma substância, proteção química, mascarar odor e sabor desagradável e principalmente promover a liberação controlada (ROSSAN, 2011).

Existem diversos métodos para a preparação tanto de microcápsulas, como de microesferas. As principais técnicas são: emulsificação por extração e/ou evaporação do solvente, que consiste na preparação de uma emulsão onde uma das fases é constituída por um polímero de natureza hidrofóbica num solvente adequado; coacervação, onde o princípio ativo que se deseja encapsular é disperso na solução de um polímero, e a microencapsulação ocorre devido a um processo induzido chamado dessolvatação; e os métodos mecânicos, realizados por atomização, fusão ou fluidização (SEVERINO et al. , 2011).

2.3.1 Antioxidantes nos sistemas microparticulados

Nos sistemas antioxidantes a principal função da microencapsulação é a proteção das substâncias contra fatores do ambiente (oxidação, luz, atividade de água, pH).

Segundo Barros e Stringheta (2006) as antocianinas mostraram maior estabilidade diante dos fatores luz, pH e calor, quando comparado ao corante não microencapsulado. Eles afirmam ainda que o processo de

microencapsulação quando usado em pigmentos naturais oferecem proteção e os tornam mais estáveis, viabilizando sua utilização.

Parize (2009) demonstrou que a microencapsulação da cúrcuma por spray dryer aumenta a sua atividade antioxidante, melhorando a solubilidade e aumentando a estabilidade térmica.

Agentes encapsulantes mostraram uma diminuição do teor de umidade, da atividade de água, redução da densidade aparente e menor teor de compostos fenólicos após a encapsulação, quando utilizada maltodextrina acetilada. Já quando foi utilizada a maltodextrina comum ela apresentou um menor valor de higroscopicidade e maior retenção de compostos fenólicos durante o processo de secagem, mostrando então, que diferentes agentes encapsulantes geram diferentes efeitos no composto encapsulado (TOSONI; RODRIGUES, 2013).

2.3.2 Emulsão adsorvida à seco - DAE

As emulsões secas são formas farmacêuticas que vem chamando atenção ultimamente. Nessas emulsões a fase lipídica é encapsulada por veículos solúveis em água ou sólidos insolúveis. Elas oferecem vantagens tais como: melhoria da estabilidade física, facilidade na fabricação, melhor comodidade no armazenamento e melhor precisão na administração em comparação com as emulsões líquidas convencionais (TAN et al. , 2009).

A DAE é uma forma de preparar emulsões secas, que consiste em uma dispersão organizada de partículas hidrofílicas e hidrofóbicas, cuja estrutura é iniciada com uma emulsão água em óleo. As duas fases da emulsão vão ser estabilizadas por dois adsorventes em pó; o primeiro vai adsorver a fase aquosa e o segundo absorver a fase oleosa. No final do procedimento é obtido um pó de fluxo livre, com tamanhos de partícula variando de 100 a 1000 μm (CHAMBIN et al. , 2000;KAUR et al. , 2013).

O interesse nesse método é devido ao seu processo de fabricação que não necessita de solvente orgânico e sua estabilidade, em comparação com as emulsões habituais (CHAMBIN et al. , 2002).

2.3.3 Coacervação complexa

Segundo a IUPAC (2014), a coacervação é a separação de duas fases líquidas em sistemas coloidais. A fase mais concentrada no sistema coloidal é o coacervado, e a outra fase é a solução de equilíbrio.

No início do processo se tem a dispersão de uma substância hidrofóbica em uma solução coloidal do material encapsulante. Nesse, para que ocorra à separação de fases necessária à adição de um eletrólito, o aumento da concentração desse eletrólito diminui a solubilidade das cadeias poliméricas na fase aquosa esse efeito é chamado de “salting out”. Isso faz com que as unidades de repetição da cadeia polimérica interajam entre si formando agregados. O material encapsulante, que estava no sistema coloidal, forma ao redor de cada gota de material hidrofóbico, um revestimento protetor. O passo final é o endurecimento da parede do coacervado e isolamento das micropartículas (LEIMANN, 2008; CARVALHO, 2009).

Existem dois tipos de coacervação: a simples, que trabalha com sistemas contendo apenas um soluto coloidal (por exemplo, a gelatina) e a complexa que trabalha com sistemas contendo mais de um soluto (por exemplo, gelatina e goma acácia) (COMUNIAN, 2013).

2.4 Controle de qualidade

2.4.1 Controle de qualidade da substância ativa

Para o controle de qualidade da substância ativa pode-se utilizar duas técnicas: a espectroscopia UV/visível, que apresenta uma banda principal de absorção em 536nm para as betaninas e 487nm para as betaxantinas (LOPES et al. , 2009) e a espectroscopia no infravermelho onde a betalaína apresenta bandas características: 1640 cm^{-1} e 1417 cm^{-1} do íon carboxilato, 1025 cm^{-1} do grupo C—O—C, 1153 cm^{-1} , 1078 cm^{-1} e 1328 cm^{-1} do grupo NH. (HORST, 2005). Existem ainda testes mais básicos como o de análise macroscópica e microscópica, solubilidade e pH.

2.4.2 Controle de qualidade do produto acabado

Em relação ao controle do produto acabado é necessário fazer testes que avaliem a liberação e se o composto foi corretamente microencapsulado. Dentre esses testes, se pode citar: liberação do corante em função do pH, da

temperatura e da luz. Eles têm como objetivo avaliar os sistemas de gatilhos de liberação, bem como se a própria microencapsulação ocorreu da maneira desejada. Outro teste realizado é a determinação do grau de intumescimento com o objetivo de avaliar a capacidade das micropartículas absorverem água e assim liberar o composto microparticulado (HORST, 2005).

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo geral

Avaliar duas técnicas de microencapsulação (DAE e coacervação complexa) do extrato de beterraba e realizar os testes de atividade antioxidante dos produtos obtidos, através do método DPPH.

4.2 Objetivo específico

- Obter o extrato de beterraba e realizar os respectivos controles de qualidade;
- Microencapsular o extrato de beterraba pela técnica de DAE;
- Microencapsular o extrato de beterraba pela técnica de coacervação complexa;
- Analisar os graus de intumescimento e a cinética de liberação da substância ativa nos sistemas microparticulados desenvolvidos;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato de beterraba livre e microencapsulado.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Reagentes

- Ácido cítrico (DINÂMICA);
- Ácido esteárico (DINÂMICA);
- Água destilada;
- Álcool etílico P.A(DINÂMICA);
- Álcool metílico P.A. (DINÂMICA);
- Alginato de Sódio (DINÂMICA);
- Cloreto de cálcio (ISO FAR);
- DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil) (SIGMA-ALDRICH);
- Extrato comercial de beterraba B-35-WS-P, utilizado como padrão de betalaínas (CHR HANSEN);
- Fosfato de sódio (NEON);
- Óleo de Rícino (TERRA MAR);
- Óxido de cálcio (DINÂMICA);
- Quitosana (POLYMAR);
- Sílica Hidrofílica (Aerosil 380 EVONIK);
- Sílica Hidrofóbica (Aerosil R974 EVONIK);

5.2 Equipamentos

- Agitador magnético (Thelga);
- Balança Analítica (Bioprecisa FA-2104N);
- Balança semi-analítica (Bioprecisa, JH2102);
- Cubetas de vidro;
- Espectrofotômetro UV/VIS (Centouro SP2000UV);
- Liquidificador Industrial (POLI LS-08);
- pHmetro (Hanna, pH 21);

5.3 Métodos

5.3.1 Obtenção do extrato de beterraba

Foi utilizada a metodologia descrita por Dallagnol (2013) com algumas adaptações para a obtenção do extrato de beterraba. Assim, utilizou-se três solventes, sendo eles: etanol a 77° GL (A7), etanol absoluto (AA) e acetona (AC), onde maceração seguiu a proporção de 1:2 p/v, relação peso da beterraba e solvente.

As beterrabas foram descascadas, cortadas em cubos e trituradas juntamente com cada solvente em liquidificador industrial, durante cerca de um minuto na velocidade de 17000 rpm à temperatura ambiente. Em seguida, o extrato permaneceu sob maceração, em recipiente fechado, pelo período de 48 horas ao abrigo da luz e sob-refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$). Após a maceração, o material foi prensado manualmente em pano fino e filtrado em papel filtro. O extrato obtido foi armazenado em frasco âmbar, sob-refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$).

Os extratos que continham álcool (A7 e AA) foram levados ao rotaevaporador à temperatura de 70°C , sendo concentrados até volume constante e depois armazenados em frasco âmbar sob-refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) até o momento de sua utilização. O extrato de beterraba obtido utilizando acetona como solvente (AC) não foi levado ao rotaevaporador, tendo como objetivo evitar possível degradação das betalaínas relacionada à temperatura. Por esse motivo, o recipiente ficou coberto com papel alumínio em temperatura ambiente até o solvente evaporar espontaneamente, antes de armazená-lo em frasco âmbar sob-refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$).

5.3.2 Controle de qualidade do extrato da beterraba

Toda a análise tanto a macroscópica como a microscópica utilizou como referência a solução aquosa feita com o padrão, devendo ser utilizado para as formulações aquele extrato que apresentar maior semelhança com esta solução.

5.3.2.1 Análise microscópica e macroscópica

Os extratos foram avaliados macroscopicamente em relação à cor, odor, homogeneidade e microscopicamente em microscópio óptico, 24 horas depois desse processo.

5.3.2.2 pH

O pH dos extratos foi verificado em pHmetro, sendo as análises realizadas em triplicatas sob temperatura ambiente, inserindo o eletrodo nas amostras.

5.3.2.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para a CCD seguiu-se a metodologia descrita por Ribeiro e Nunes (2008) com algumas adaptações.

Inicialmente, foi preparada a fase móvel que consiste em um sistema eluente 9:1 acetona/água, esse sistema foi colocado em um béquer e posteriormente coberto. Logo após, com auxílio de um capilar, uma gota, tanto do padrão como do extrato, foi aplicada em diferentes pontos sobre uma placa revestida com sílica fase normal, estando todos os pontos na mesma altura. Essa placa foi colocada no interior do béquer, previamente preparado, tendo o cuidado para que o local de aplicação fique acima do nível do sistema eluente. Foram realizadas duas corridas cromatográficas com o mesmo sistema eluente, a fim de permitir melhor separação dos constituintes. Ao final da última corrida, retirou-se a placa do sistema e calculou-se o fator de retenção (R_f) do padrão e dos extratos, seguindo a equação 1.

$$R_f = \frac{ds}{dm}$$

Equação 1- Cálculo do fator de retenção (R_f), onde ds: distância percorrida pela substância em questão e dm: distância percorrida pela fase móvel.

5.3.2.4 Espectroscopia UV/Visível

Para determinar o comprimento de onda de maior absorção das betalaínas foi realizada uma varredura na faixa de 400 a 550 nm em espectrofotômetro UV/Vis.

Foram preparadas duas curvas de calibração que variavam os pHs da solução de tampão fosfato citrato (pHs 5 e 7), contendo betalaína padrão com concentração conhecida, variando entre 0,5 mg/mL e 3 mg/mL. Todas as soluções foram analisadas no comprimento de onda 535nm para a obtenção da curva de calibração.

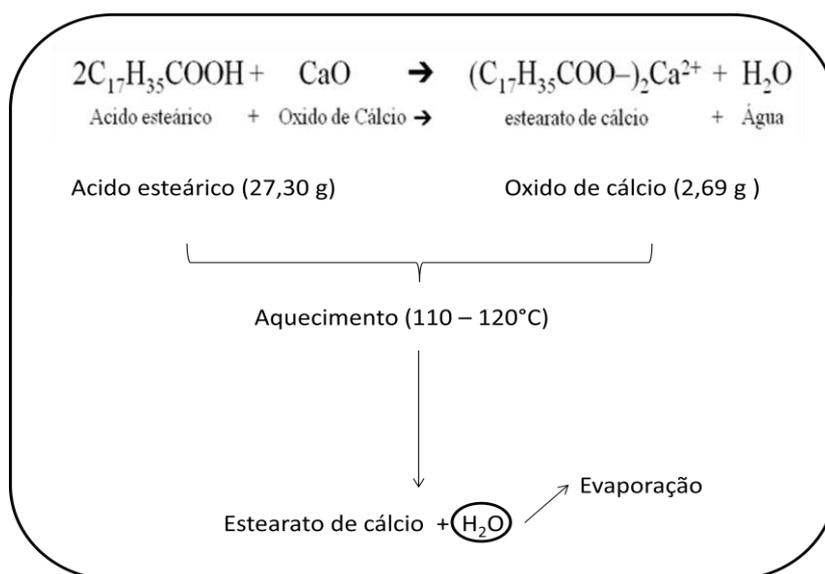
A partir da curva de calibração da solução padrão, o extrato AC foi doseado em cubeta de vidro e os valores de absorbância foram detectados em espectrofotômetro, no comprimento de onda 535 nm. A análise foi realizada em triplicata.

5.3.3 Síntese do estearato de cálcio

Para preparo da DAE necessitou-se de óleo de rícino, estearato de cálcio, sílica hidrofílica e hidrofóbica, como não se dispunha de estearato de cálcio, o mesmo foi sintetizado seguindo a metodologia da Baerlocher, (2005) descritos na figura 4.

Primeiro, foi calculado a quantidade de ácido esteárico e óxido de cálcio necessário para obter-se 30g de estearato de cálcio. Em um recipiente adequado, foi colocado o ácido esteárico e o óxido de cálcio previamente pesados e levados ao aquecimento em uma temperatura entre 110°C e 120°C, os dois componentes reagiram entre si formando estearato de cálcio e água, onde esta última por sua vez evaporou, restando apenas o estearato de cálcio. Por fim, o produto final foi coletado, pulverizado e armazenado em embalagem adequada.

Figura 4 - Reação de obtenção e fluxograma da síntese do estearato de cálcio.

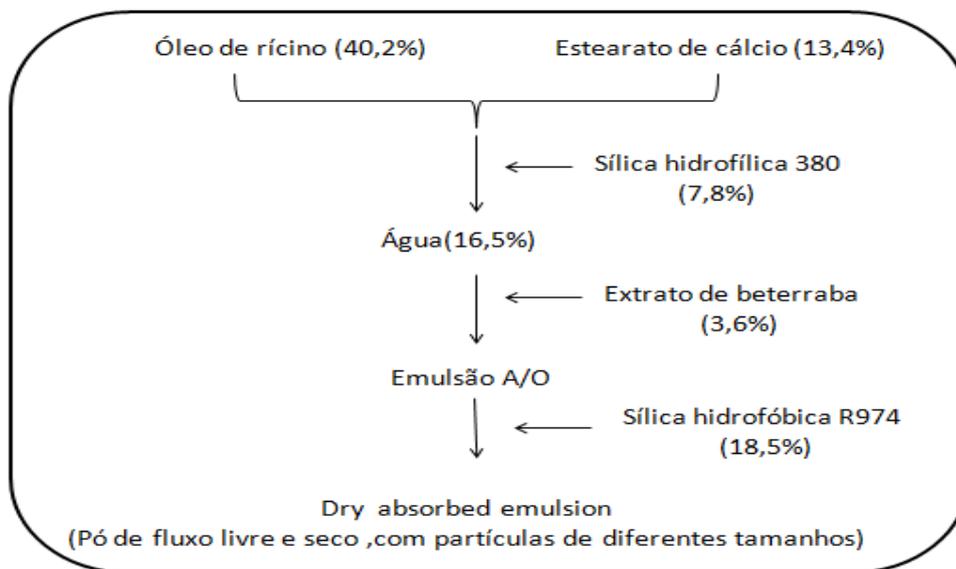


Fonte: Autoria própria.

5.3.4 Emulsão adsorvida à seco - DAE

A DAE foi preparada seguindo a metodologia descrita por Chambin et al. (2000) sendo ilustrada na figura 5. Primeiramente, a sílica hidrofílica foi misturada na fase lipídica (Óleo de rícino e estearato de cálcio). Em seguida, a água adicionada em alta agitação resultou em uma emulsão A/O, onde a betalaína padrão e o extrato de beterraba foram disperso a uma concentração de 3,6% m/m, sendo este valor correspondente a uma concentração máxima de 1,74mg/mL de betalaínas nessa formulação.

Na última fase, adicionou-se lentamente a sílica hidrofóbica, ocasionando uma mudança na forma da emulsão, passando de consistência cremosa a uma pasta e depois a um pó de fluxo livre, esse por sua vez, passou pelo tamis Mesh 48 para separação das frações. As formulações foram armazenadas em temperatura ambiente e protegidas da luz.

Figura 5 - Fluxograma de obtenção DAE

Fonte: adaptado de CHAMBIN, 2000.

5.3.5 Coacervação complexa

A preparação por coacervação complexa seguiu a metodologia descrita por HORST, (2005) com adaptações.

Inicialmente dispersou-se a quitosana em quantidade suficiente para (qsp) 25 mL em uma solução 5% v/v de ácido acético, obtendo-se uma solução de concentração 1,5% m/v de quitosana, a qual foi levada ao agitador magnético, onde permaneceu por aproximadamente 40 minutos. Na etapa seguinte, preparou-se o gel de alginato de sódio à 4% m/v. Para isso, pesou-se o alginato de sódio e dispersou-o em qsp de 15 mL de água até a sua completa homogeneização, adquirindo a forma de um gel. Em seguida, foi incorporado à formulação 3,6% m/m do padrão ou do extrato, sendo essa concentração correspondente a 1,74 mg/mL de betalaínas. Em outro becker, foi preparada uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) pesando-se 1,837g de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ com adição de um qsp de água de 25 mL.

Preparadas as soluções, foi iniciado o processo de gotejamento. No qual verteu-se 12,5 mL da solução de CaCl_2 em 12,5 mL de solução 1,5% m/v de quitosana, essa mistura foi mantida no agitador magnético e com o auxílio da seringa, gotejou-se o gel de alginato de sódio lentamente sobre essa solução mantendo a agitação constante, obtendo assim as esferas. As esferas

foram lavadas com água destilada e colocadas em vidro de relógio para secagem, conforme descrito na figura 6.

Figura 6 - Fluxograma de obtenção das microesferas obtidas por coacervação.



Fonte: Autoria própria.

5.3.6 Avaliação da liberação do antioxidante em função do tempo

A determinação da liberação do antioxidante em função do tempo seguiu a metodologia descrita por HORST (2005), com algumas adaptações. Para este teste foi pesada uma massa de micropartículas que correspondia a uma concentração de 1,74mg/mL de padrão betalaína. Isso foi feito para partículas oriundas de ambas as técnicas, sendo essa massa mantida em contato com o tampão fosfato citrato pH 7,0 (25 mL) à 25° C sob agitação.

Em intervalos de 20 minutos foi retirado cerca de 4 mL da solução tampão que estava em contato com as micropartículas. Essa solução foi levada a centrífuga, onde ficou 5 minutos a 3000 rpm. Após essa etapa, o sobrenadante límpido foi levado para espectrofotômetro, onde foi medida a absorbância. Ao final da medição a solução retornava para o sistema.

Esse procedimento foi repetido durante o período de duas horas. Ao final, foi produzido um gráfico concentração de betalaína versus o tempo de teste.

5.3.7 Determinação do grau de intumescimento

A determinação do grau de intumescimento seguiu a metodologia descrita por HORST (2005), com algumas adaptações.

As micropartículas obtidas pela técnica de DAE e coacervação complexa, contendo ou não substância ativa (placebo (DAE-PL e COA-PL), padrão (DAE-PA e COA-PA) e extrato (DAE-AC e COA-AC)), foram inicialmente pesadas (0,151 g) e mantidas em contato com a solução tampão fosfato citrato pH 7,0 (25 mL) à 25 °C sob agitação.

Em intervalos de tempo pré-determinados as micropartículas obtidas pela coacervação complexa foram retiradas da solução tampão, secas em papel absorvente e pesadas novamente; já para a DAE, as partículas formadas foram filtradas, e a massa retida no papel de filtro foi pesada. Sendo esse processo repetido pelo período de 2 horas e em triplicata, para ambas as formulações.

O grau de intumescimento(G.I) de cada amostra no tempo t, é calculado pela equação 2:

$$\%GI = \frac{Wt - Wo}{Wo} \times 100$$

Equação 2 - Determinação do grau de intumescimento, onde Wt e Wo referem-se às massas das amostras no tempo t e no estado seco, respectivamente.

5.3.8 Avaliação da atividade antioxidante

Segue-se a metodologia de Duarte (2015) com algumas adaptações. O primeiro passo consistiu na preparação da solução metanólica de DPPH a 2000 µg/mL. A seguir foram preparadas diluições de 5, 10, 15, 25 e 30 µg/mL em sistema tampão fosfato citrato no pH 7,0. Utilizando a solução de 30 µg/mL foi feita uma varredura para encontrar o maior comprimento de onda da solução. Após isso, foram feitas as leituras das absorbâncias das soluções em triplicata, utilizando-se solução tampão fosfato citrato no pH 7,0 como branco;

construiu-se a curva padrão de DPPH plotando-se o valor médio das absorvâncias obtidas x concentração da solução.

Para avaliar a atividade antioxidante preparou-se uma solução que continha a betalaína padrão na concentração de 1,74mg/mL e o DPPH 30 µg/mL. Essa solução foi mantida em agitação constante durante o período de 2 horas. Entre os intervalos de 20 minutos alíquotas da solução foram retiradas e medidas as suas absorvâncias no comprimento de onda de 550 nm; do mesmo modo se procedeu com o extrato AC.

Para avaliar a atividade antioxidante das micropartículas, pesou-se uma massa de micropartículas equivalente a uma concentração de 1,74 mg/mL de betalaínas, estas foram mergulhadas em solução de DPPH 30 µg/mL mantendo a agitação constante durante o período de 2 horas. Entre os intervalos de 20 minutos, alíquotas da solução foram retiradas e medidas as suas absorvâncias a 550 nm do mesmo modo se procedeu com as esferas sem ativo.

Todos esses testes foram feitos no mínimo em três diluições diferentes e em triplicata. A capacidade de inativar o radical DPPH (atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a equação 3 :

$$\text{Atividade antioxidante(\%)} = \frac{A \text{ controle} - A \text{ amostra}}{A \text{ controle}} \times 100$$

Equação 3-Atividade antioxidante, onde A controle = absorvância da solução de DPPH sem a amostra e A amostra = absorvância da amostra com o DPPH.

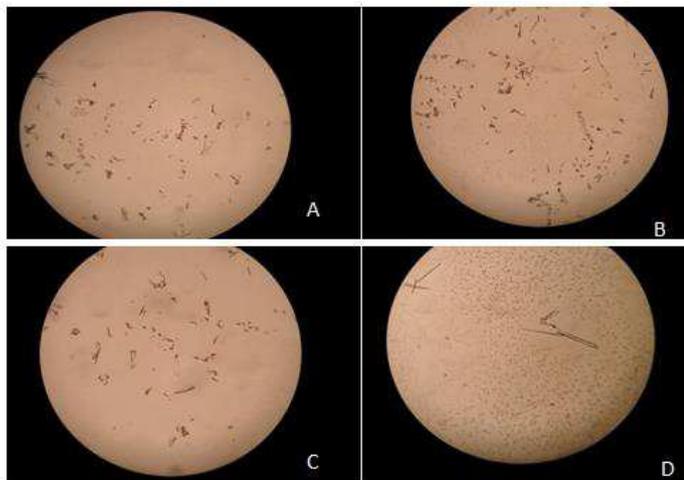
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Obtenções do extrato

Macroscopicamente, o extrato preparado com álcool 77° GL (A7), se apresentou vermelho intenso, homogêneo, porém o seu odor fugiu do característico, não se comparando a nenhum dos outros extratos nem com a solução aquosa contendo betalaína padrão. O extrato de álcool absoluto (AA) se apresentou com coloração vermelho intenso, homogêneo e odor característico da beterraba. Segundo Bastos et al. (2013) e Bastos et al. (2014), o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) das betalaínas diminui com o aumento da temperatura, pressupondo dessa maneira, que a alta temperatura associado ao longo tempo de rotaevaporação poderia ter induzido a degradação desses extratos. Diante dessa avaliação, foi escolhido outro solvente que reunisse as características de solubilização necessárias para a maceração, em conjunto com um ponto de ebulição baixo, a fim de que evaporasse a temperatura ambiente, minimizando a possibilidade de degradação das betalaínas. A acetona originou um extrato (AC) de cor vermelha menos intensa, com o odor característico da beterraba e homogêneo.

Microscopicamente, todos os extratos apresentaram estruturas cristalinas em forma de bastão. Segundo Scardelato (2013) e Siener et al. (2006), a beterraba possui em sua composição oxalato de cálcio, sendo possivelmente esses os cristais encontrados nas lâminas. Os extratos alcoólicos são os que apresentaram essas estruturas em maior tamanho, como mostrado na figura 7.

Figura 7 - Microscopia dos extratos. A- Betalaína padrão solubilizado em água; B- Extrato AA; C- extrato A7; D- extrato AC.



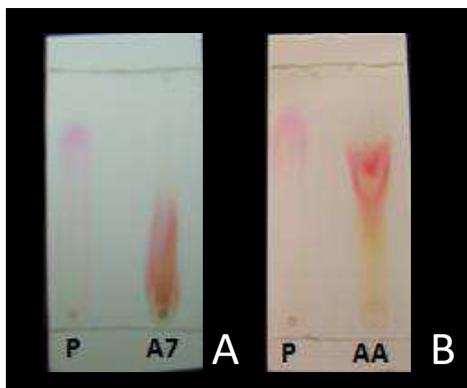
Fonte: Autoria própria.

Em relação ao pH, o extrato A7 apresentou o maior pH 5,39, seguido do extrato AC 5,16 e por último o extrato AA pH 5,13.

6.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

O extrato A7 não apresentou um perfil de eluição semelhante à solução betalaína padrão (P), indicando compostos distintos nas duas amostras, sendo o mesmo resultado encontrado para o extrato AA, figura 8. Todas as placas cromatográficas passaram por duas corridas cromatográficas, ou seja, entraram em contato com o sistema eluente duas vezes, a fim de separar melhor os constituintes do extrato facilitando a observação.

Figura 8 - Processo de eluição das betalaínas realizado com os extratos alcoólicos. A- corrida cromatográfica para o extrato A7; B- corrida cromatográfica para o extrato AA.



Fonte: Autoria própria.

O extrato AC apresentou perfil de eluição semelhante ao P, obtendo um Rf de 0,72 (Figura 9).

Figura 9 - Processo de eluição das betalaínas realizado com o extrato AC.



Fonte: Autoria própria.

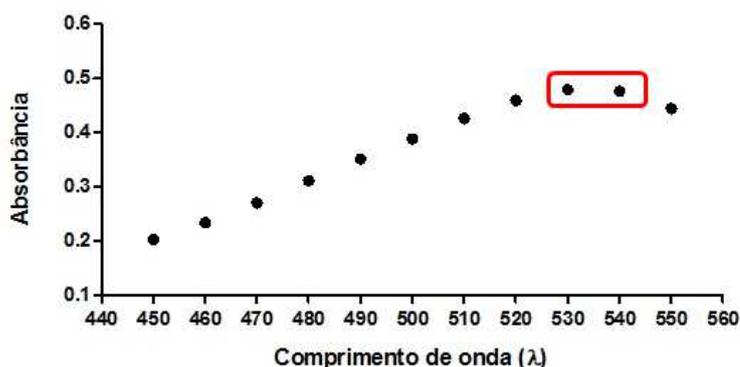
Cuchinski et al. (2010) e Souza (2012), relatam que o principal pigmento da beterraba é a betanina, sendo responsável por cerca de 75% a 95% dos pigmentos encontrados nessa hortaliça. Outro fator confirmatório é relatado por COSTA, 2005 ao afirmar, soluções de betalaínas na faixa de pH entre 3,5 e 7,0 possuem coloração visível tanto para as betaxantinas quanto para as betacianinas, sendo que neste último grupo se encontra a betanina. Desta

forma, o extrato AC possui, dentre a sua variada composição, uma betalaína que é a mesma do padrão.

6.3 Varredura espectro UV- Visível para o corante betalaína

Ao utilizar a técnica de espectroscopia UV-visível se faz necessário realizar uma varredura, com o objetivo de descobrir qual o comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) de absorção da substância de interesse. Dessa maneira, a figura 10 mostra todos os comprimentos de onda analisados em solução de tampão fosfato citrato no pH 7,0 para uma concentração de 2mg/mL da solução aquosa contendo betalaína padrão.

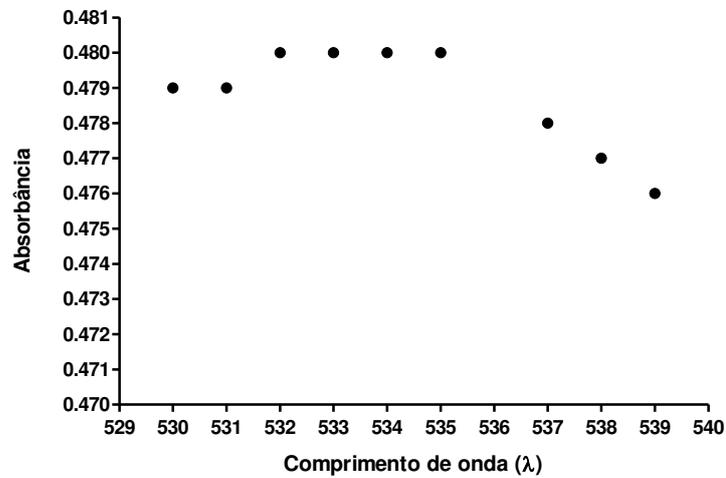
Figura 10 - Varredura da solução aquosa contendo betalaína padrão.
Em destaque a região entre 530 e 540 nm.



Fonte: Dados da pesquisa.

O valor de $\lambda_{\text{máx}}$ determinado ficou entre 532 e 535nm, figura 11. O estudo de Costa (2005) relata que o valor de $\lambda_{\text{máx}}$ para o corante betalaína é 535 nm, confirmando assim a varredura. Dessa maneira, o comprimento de onda adotado para esta pesquisa foi de 535nm.

Figura 11 - Região de maior absorção do corante (532 e 535nm) em espectroscopia UV/VIS.

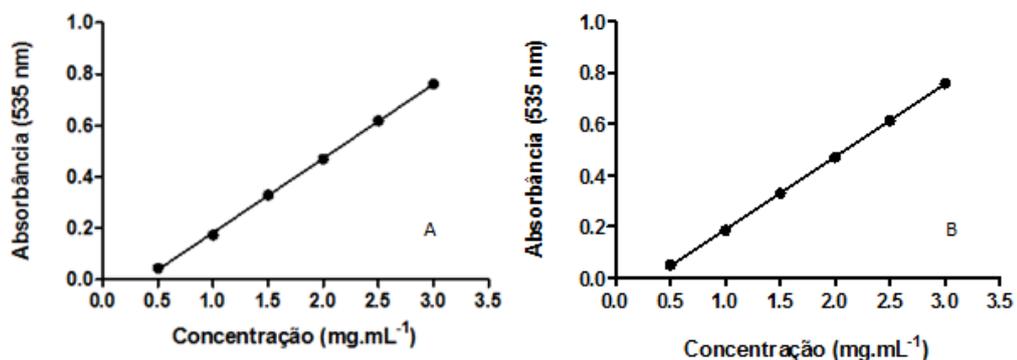


Fonte: Dados da pesquisa.

6.4 Curva de calibração do corante betalaína

Na figura 12 estão representadas graficamente, as curvas de calibração da betalaína padrão em tampão fosfato citrato pHs 5 e 7. Sendo escolhido para os testes de doseamento a curva de calibração pH 7,0.

Figura 12 - Curvas de calibração para diferentes pHs. A- pH 5,0 $abs=0,2888x-0,1055$; $r^2=0,9993$. B- pH7,0 $abs=0,2833x-0,09409$; $r^2=0,9998$.



Fonte: Dados da pesquisa.

6.5 Doseamento de betalaínas nos extratos

O doseamento foi feito seguindo a curva de calibração pH 7,0 ($abs=0,2833x-0,09409$), obtendo assim, os valores de concentração para cada

extrato. Os extratos alcoólicos necessitaram de diluição previa para o doseamento, os resultados obtidos foram multiplicadas pelo fator de diluição 25, dessa maneira, o extrato A7 apresentou absorvância $0,101 \pm 0,00094$ e concentração de 17,215 mg/mL, seguido pelo AA que apresentou absorvância de $0,092 \pm 0,00094$ com concentração de 16,45 mg/mL e por último o extrato AC, que não necessitou diluição, apresentando absorvância de $0,274 \pm 0,0017$ e concentração de 1,299 mg/mL.

Os resultados mostram que o extrato A7 possuía a maior concentração, porém foi o único que na análise macroscópica se apresentou diferente dos demais com características de degradação. Essa maior concentração pode ser explicada devido à técnica utilizada para o doseamento avaliar somente a cor das soluções e não as estruturas das betalaínas, podendo dessa maneira existir dentro desse extrato algum produto de degradação que modificaria esse parâmetro; da mesma maneira, o extrato AA apresenta uma absorvância maior, porém as mesmas observações em relação a A7 devem ser levadas em consideração no extrato AA.

O extrato AC se mostrou menos concentrado que os demais, isso pode ser explicado por dois pontos, o primeiro está relacionado ao fato da acetona possuir menor capacidade de extração de betalaínas que o álcool ou a água, visto que, as betalaínas possuem afinidade por solventes mais polares; o outro fato está relacionado ao processo de concentração do extrato, que por não ter sido realizado em rotaevaporador e sim à temperatura ambiente, ocasionou um menor arraste de água e conseqüentemente a obtenção de um extrato mais diluído. Esses dois fatores em conjunto acarretaram em uma menor concentração de betalaínas e conseqüentemente uma menor coloração.

Associando-se as informações obtidas nas análises macroscópicas e microscópicas, nos doseamentos e na cromatografia em camada delgada, o extrato de beterraba escolhido para as formulações, bem como para a avaliação da atividade antioxidante, foi o extrato de beterraba utilizando a acetona (AC) como solvente.

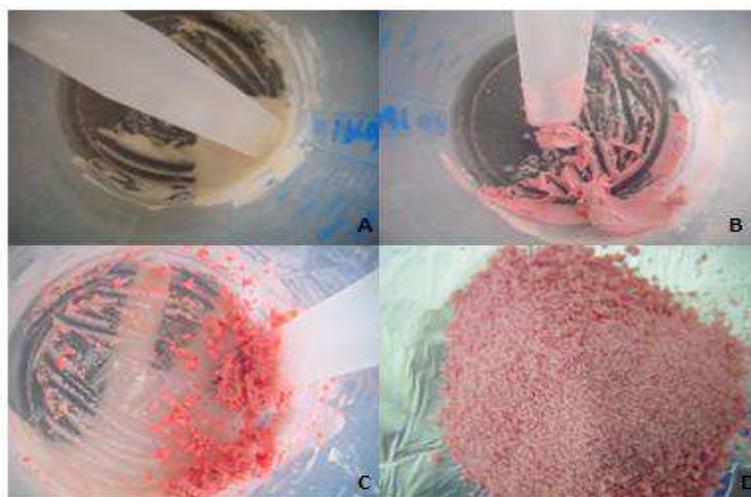
6.6 Obtenção das micropartículas

6.6.1 Emulsão adsorvida à seco - DAE

Inicialmente, foi testada a preparação da DAE substituindo o estearato de cálcio por estearato de sódio, resultando em um pó sem fluxo livre com uma forma característica de sabão, tendendo a formar grumos de partículas com grande granulometria. Verificou-se que o sistema óleo, estearato de sódio e sílica hidrofílica quando incorporado à água impedem a emulsificação, inviabilizando a preparação da DAE por uma metodologia alternativa, ou seja, tornou-se inviável a substituição do estearato de cálcio por estearato de sódio.

Devido a essas dificuldades, resolveu-se sintetizar o estearato de cálcio, seguindo a metodologia da Baerlocher (2005). Após essa síntese seguiu-se a metodologia descrita por Chambin et al. (2000). Quando se substituiu o estearato de sódio pelo de cálcio recém-sintetizado, a formulação apresentou-se como um pó de fluxo livre com menor granulometria, como é demonstrado na figura 13. Para a preparação da DAE foi escolhido o extrato AC, utilizando a concentração de 3,6% m/m tanto para o extrato de escolha (DAE-AC), como para o padrão (DAE-PA).

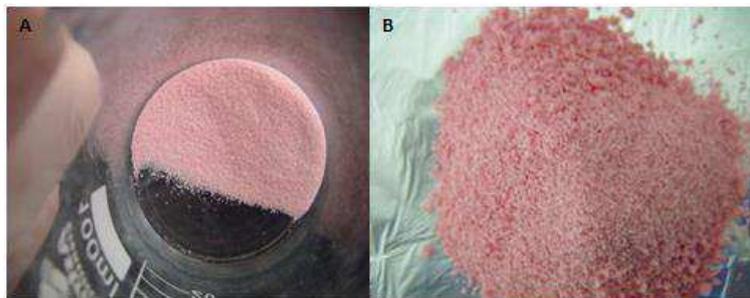
Figura 13 - Etapas de preparação da DAE. A- óleo de rícino e estearato de cálcio. B- adição do ativo e da sílica hidrofílica. C- adição da sílica hidrofóbica. D- formulação final antes de tamisar.



Fonte : Autoria própria.

A formulação tamisada na Mesh 48 foi separada em duas frações; a fração que atravessou a malha apresentava-se como um pó de fluxo livre com partículas de tamanho reduzido (F1), e a fração retida caracterizava-se como um pó de maior granulometria (F2), figura 14.

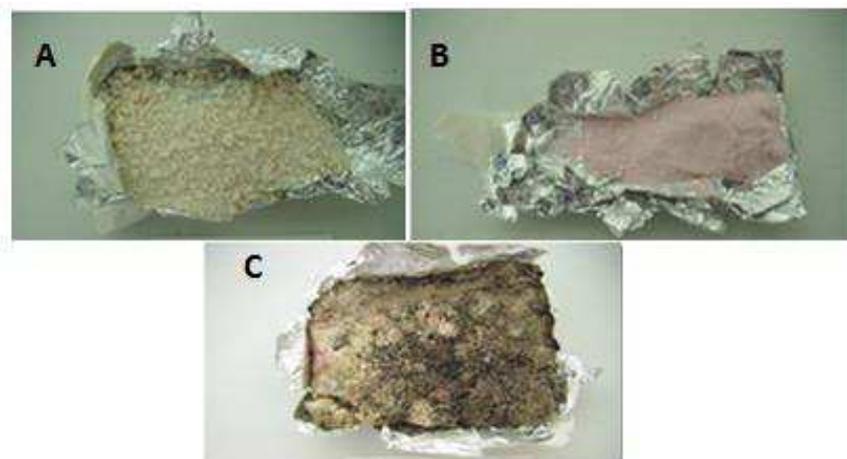
Figura 14 – Formulação DAE após a tamisação. A- DAE tamisada (mesh 48) (F1) ; B- DAE não tamisada(F2).



Fonte: Autoria própria.

Após aproximadamente 45 dias de armazenamento foram abertas as embalagens a fim de se observar as formulações. A formulação feita com estearato de sódio logo após a preparação se apresentava na cor vermelho claro; após o tempo de armazenamento ficou branca, (15A). A F1 não apresentou mudanças visíveis (15B), e a F2 se apresentou com características de uma possível contaminação fúngica, (15C),isto é relacionado ao fato dos grumos maiores água e óleo da formulação , favorecendo assim a contaminação. Todas as alterações são mostradas na figura 15.

Figura 15 – Alterações físicas após armazenamento da formulação. A- DAE com estearato de sódio; B- (F1), DAE com estearato de cálcio (tamisada); C- (F2), DAE com estearato de cálcio (não tamisada) .



Fonte: Autoria própria.

6.6.2 Coacervação Complexa

Inicialmente o processo de gotejamento foi feito com o gel de alginato sem ativo e com uma seringa sem agulha, obtendo esferas de grandes dimensões com formato de gota, figura 16.

Figura 16 – Placebo da coacervação (COA-PL) obtido sem o acoplamento da agulha.



Fonte: Autoria própria.

Percebeu-se então, que o tamanho dessas esferas está relacionado na quantidade de gel de alginato de sódio gotejado, bem como a velocidade do gotejamento. Isso levou a utilização de uma seringa acoplada a uma agulha,

tornando o processo mais lento e dificultoso, visto que a solução gotejada tem a viscosidade característica de um gel. Porém com essa modificação foram obtidas esferas de pequeno tamanho e bem arredondas, se adequando aos objetivos da pesquisa, como é demonstrado na figura 17.

Figura 17 - Esferas contendo padrão de betalaínas (COA-PA) após o acoplamento da agulha.



Fonte: Autoria própria.

Após a preparação do gel de alginato, ao qual foi incorporado a betalaína padrão e o extrato AC na concentração de 3,6% m/m, este foi gotejado com auxílio de uma seringa sobre uma solução previamente preparada de quitosana e CaCl_2 . Foi observado que a solução que ficavam mergulhadas as micropartículas adquiria uma coloração avermelhada, sendo que este fenômeno ocorria tanto para as micropartículas preparadas com o padrão quanto para as preparadas com o extrato. Isso ocorre devido à característica hidrossolúvel das betalaínas que leva ao início do processo de liberação osmótica, assim que as esferas entram em contato com a solução. Diante dessa observação, padronizou-se o tempo de contato da solução de CaCl_2 e quitosana com as microesferas entre 5 a 10 minutos, para tentar minimizar perdas de extrato para a solução, figura 18.

Figura 18 - Processo de gotejamento na solução de quitosana e CaCl_2 .



Fonte: Autoria própria.

Após o período de contato com a solução de quitosana e CaCl_2 , as esferas foram lavadas e colocadas para secar à temperatura ambiente. Depois de 48 horas de secagem, as esferas que continham a betalaína padrão e o extrato AC desidrataram e diminuíram de tamanho, sendo armazenadas à temperatura ambiente, em sacos plásticos de polietileno (figura 19). As micropartículas com padrão e com o extrato de beterraba foram armazenadas para os posteriores testes de gatilhos de liberação.

Figura 19 - Esferas contendo o padrão de betalaínas(COA-PA), após o período de secagem.



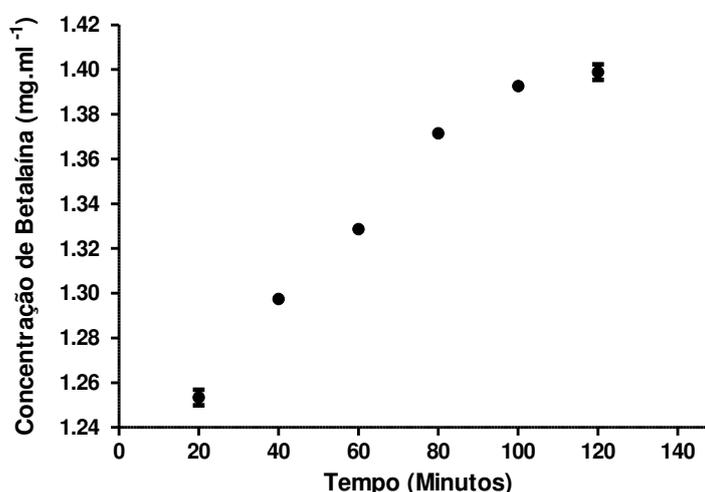
Fonte: Autoria própria.

6.7 Cinéticas de liberação:

6.7.1 DAE

A figura 20 mostra o gráfico após o período de duas horas de contato entre as micropartículas contendo betalaína padrão (DAE-PA) e a solução tampão fosfato citrato pH 7,0. Essa cinética foi feita com intuito de se conhecer o perfil de liberação das micropartículas dentro do sistema tampão escolhido, facilitando os testes posteriores de atividade antioxidante.

Figura 20 - Cinética de liberação da DAE-PA, com intervalos de 20 minutos durante o período de duas horas.



Fonte: Dados da pesquisa.

Na figura 20, é observada que a maior liberação, cerca de 72,02%, ocorre nos primeiros 20 minutos. Logo após, se inicia um aumento lento da concentração das betalaínas na solução. Esse aumento de concentração continua progressivo até o tempo de 100 minutos, quando se obtém 80,02% de liberação do ativo. A partir desse ponto, a liberação do ativo no sistema microparticulado começa a diminuir, sendo percebido no gráfico pela pequena diferença de concentração entre as regiões de 100 e 120 minutos, correspondendo respectivamente a 80,02% e 80,39%.

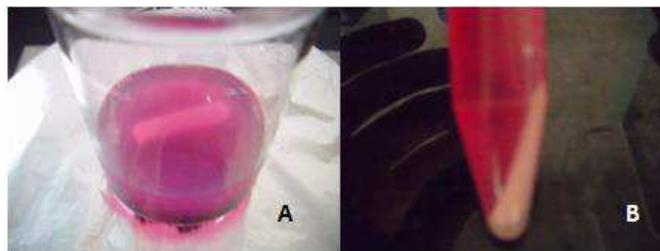
Uma possível saturação do sistema ao qual as micropartículas estão mergulhadas ou a diminuição excessiva de betalaínas dentro das

micropartículas, justificaria uma liberação cada vez menos expressiva. É observado ainda, na figura 20, entre o tempo de 20 até 120 minutos, um aumento de apenas $0,14 \text{ mg.mL}^{-1}$, indicando uma liberação imediata do ativo assim que as micropartículas entram em contato com o sistema tampão. Ao final do teste, observa-se uma liberação total de 80,39% do ativo.

6.7.2 Coacervação complexa

Em relação à coacervação, logo no início do teste de cinética se observou a liberação de um material residual oriundo das partículas, que deixou o sistema turvo, figura 21.

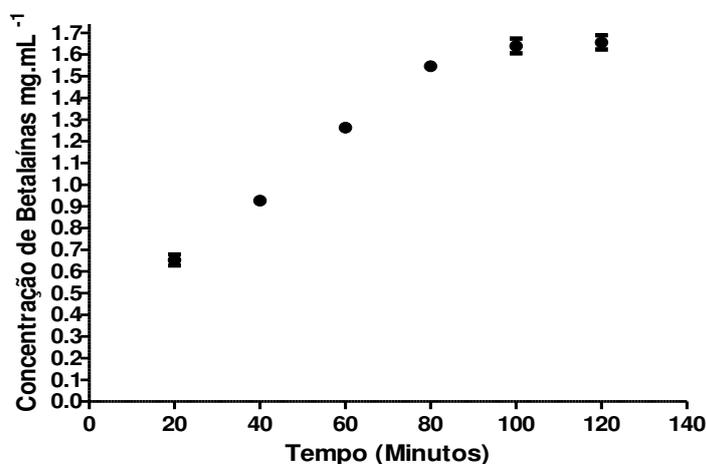
Figura 21- Material residual obtido durante o teste de cinética com COA-PA. A- Turvação do sistema, logo após o contato das partículas e o tampão. B- amostra retirada do meio reacional, após a centrifugação.



Fonte: Autoria própria.

A figura 22 mostra o gráfico após o período de duas horas de contato entre as micropartículas contendo betalaína padrão (COA-PA) e a solução tampão fosfato citrato pH 7,0. Essa cinética foi feita com o intuito de conhecer o perfil de liberação dessa formulação dentro desse sistema tampão, facilitando assim os testes posteriores de atividade antioxidante.

Figura 22- Cinética de liberação da COA-PA, com intervalos de 20 minutos durante o período de duas horas.



Fonte: Dados da pesquisa.

No tempo entre 20 e 40 minutos ocorre a liberação de 37,52% de ativo, bem menor quando comparado a DAE-PA que libera 72,02%. Possivelmente isto ocorre, devido à necessidade de hidratação dessas partículas, fazendo com que inicialmente se observe uma menor liberação da COA-PA quando comparado a DAE-PA. Porém, à medida que o teste continua, as micropartículas vão se hidratando ainda mais, devido à penetração da solução tampão; a velocidade de liberação das betalaínas dispersas na formulação é aumentada.

Quando se chega ao tempo de 80 minutos, a quantidade liberada é de 88,86%, sendo superior a DAE-PA (78,82%). A partir desse tempo, o aumento de concentração se torna discreto. Possivelmente isto ocorre por dois motivos principais: o primeiro está associado ao sistema tampão que começa a ficar saturado levando a diminuição da velocidade de liberação e o segundo está relacionado à menor quantidade de betalaínas na formulação que ainda será liberada. Ao final do teste, obteve-se uma liberação de 95,18%.

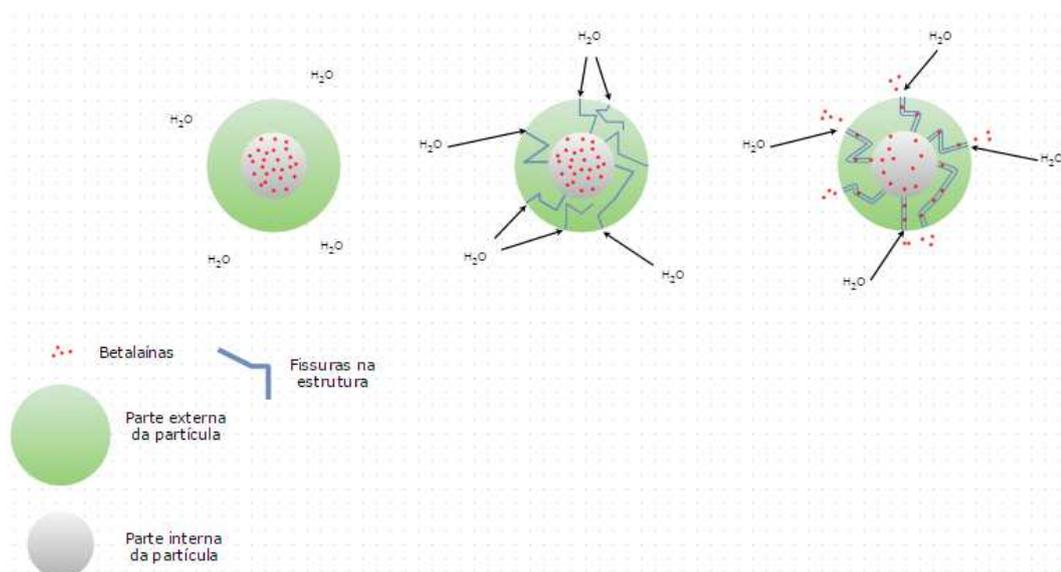
6.8 Grau de intumescimento das micropartículas

Em relação a DAE, as alterações de massas entre os 20 minutos (T_i) e 120 minutos (T_f) para a DAE-PA ($T_i = 0,2168 \pm 0,001$ g e $T_f = 0,1291 \pm 0,004$ g) e DAE-AC ($T_i = 0,09 \pm 0,003$ g e $T_f = 0,0707 \pm 0,007$ g), são indicativos que essas

partículas possuem um mecanismo de liberação que não envolve o intumescimento, pois não observa-se aumento de massa, inviabilizando o cálculo do grau de intumescimento (G.I) para essas partículas. O mesmo comportamento observa-se com a DAE-PL, onde o sistema microparticulado não apresentou interação com a solução tampão, indicando a necessidade de princípios ativos hidrofílicos para que ocorra a interação entre meio de testes e a formulação.

Esses resultados, corroboram com o estudo de Chambin et al. (2002), que sugere o comportamento das partículas de DAE como um sistema encapsulante inerte, sendo a liberação do fármaco controlada pela solubilidade do princípio ativo encapsulado, a forma como o fármaco está distribuída na partícula, o tamanho das partículas e a difusão através de poros formados na estrutura da DAE, após o contato entre o meio que ocorre os testes e as partículas, figura 23.

Figura 23- Mecanismo de liberação das micropartículas preparadas através da técnica DAE (parte externa composta por sílica hidrofóbica e óleo de rícino/parte interna composta por sílica hidrofílica, água e betalaínas).



Fonte: Autoria própria.

A formulação coacervação complexa apresenta no tempo 20 minutos um G.I de $252,98\% \pm 0,55$ para a COA-PA, $51,56\% \pm 0,21$ e $170,39\% \pm 0,007$ para COA-AC e COA-PL, respectivamente. O aumento da massa em todas as amostras analisadas é justificada pela presença do polímero hidrossolúvel alginato de sódio na formulação. A diferença de intumescimento entre as amostras é influenciada pelo tempo de secagem durante a técnica de preparo, levando a uma maior desidratação com conseqüente enrijecimento das esferas. A técnica de obtenção do princípio ativo também pode ser considerado outro fator que diferencia o GI entre as amostras, onde o padrão foi obtido por liofilização (ávido por água) e o extrato AC por maceração com acetona, seguido de evaporação do solvente. No tempo de 40 minutos, a diferença entre as massas COA-PA, COA-PL e COA-AC diminui, devido à máxima absorção do tampão pelo alginato de sódio e liberação do ativo das micropartículas para a solução.

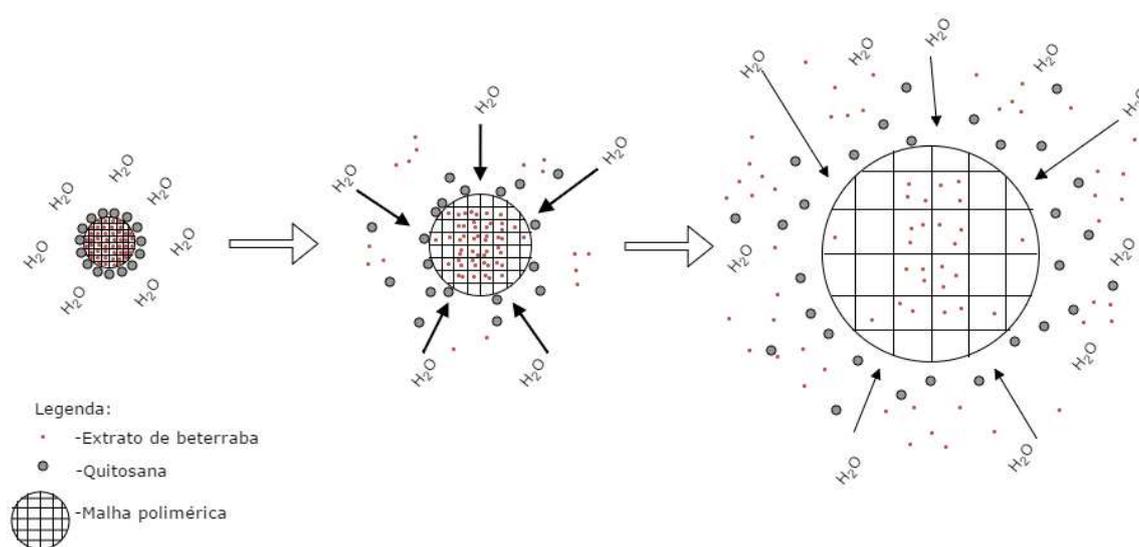
Outro fator observado durante o teste de intumescimento foi à liberação de material residual de todas as micropartículas preparadas através da técnica de coacervação complexa. Segundo Dias et al. (2013), a quitosana apresenta insolubilidade em água e solubilidade em soluções ácidas com pH menor que seis. Desta maneira, existe a possibilidade do material residual ser quitosana que se desprende das micropartículas, sendo este fenômeno possivelmente relacionado ao sistema tampão, que possui pH aproximadamente 7 e é preparado em meio aquoso.

Após o período de 60 minutos as superfícies das micropartículas, anteriormente lisas, começaram a se apresentar pegajosas, indicativo da liberação de quitosana e exposição do alginato de sódio no meio reacional. Isso ocorre, devido à quantidade excessiva de líquido que as penetrou, levando ao início da fragmentação das partículas. Esse fenômeno ocorreu aos 60 minutos nas partículas COA-PA e aos 80 minutos para as partículas COA-AC. Ao término do teste, COA-PA apresentou G.I de $1641,58\% \pm 0,99$, COA-AC obteve G.I de $2120,52\% \pm 0,37$ e COA- PL apresentou G.I de $2713,77\% \pm 0,33$.

Dessa maneira, podemos supor que a liberação do ativo através dessas partículas se resume basicamente a um intumescimento gradual, que é iniciado

provavelmente após a liberação do material residual que envolve a micropartícula. Esse intumescimento gradual pode levar a rupturas da estrutura das partículas, o que aceleraria ainda mais o processo de liberação do ativo (figura 24). Isto corrobora com Pezzini et al. (2007) e Horst (2005) ao relatarem que a cinética de liberação dentro desses sistemas é resultado do envolvimento de diversos processos entre eles intumescimento, difusão do fármaco, erosão da matriz e quebra hidrolítica ou enzimática entre o polímero e a fármaco.

Figura 24- Mecanismo de liberação das micropartículas preparadas através da técnica de coacervação complexa.



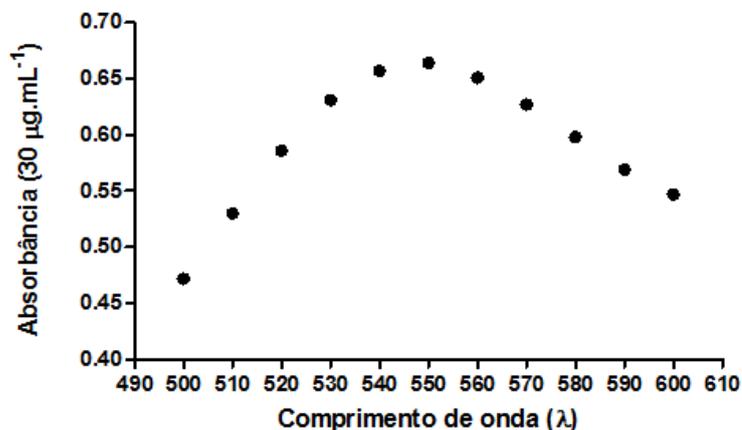
Fonte: Autoria própria.

6.9 Avaliação da atividade antioxidante através do método DPPH

6.9.1 Varredura espectro UV-visível para o DPPH

Inicialmente, foi realizada uma varredura a fim de se descobrir qual o comprimento de onda de maior absorção para o DPPH no sistema tampão fosfato citrato no pH 7,0. Foi utilizada uma solução de DPPH na concentração $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo realizado esse processo entre os comprimentos de onda de 500nm à 600nm, onde foi observado que a região de maior absorção se encontrava à 550 nm, figura 25.

Figura 25- Varredura feita em espectrofotômetro com o DPPH no sistema tampão pH 7,0. Onde o comprimento de onda de maior absorção foi de 550nm.

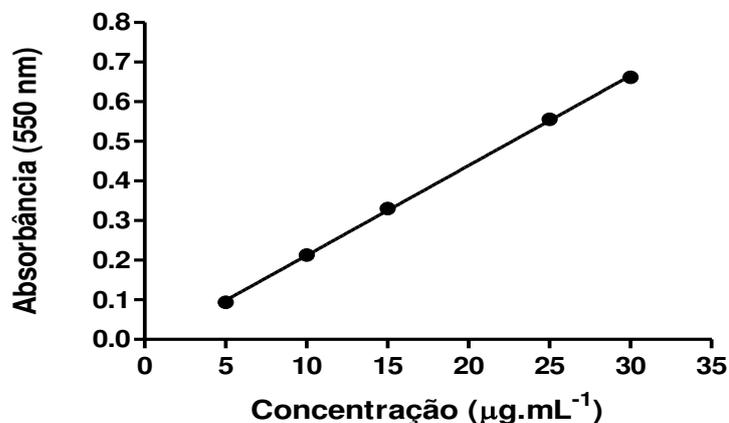


Fonte: Dados da pesquisa.

6.9.2 Curva de calibração do DPPH

Para a leitura, foram preparadas a partir de uma solução metanólica de DPPH à $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ seis diluições em tampão fosfato citrato pH 7,0 que variavam de concentração entre 5 e $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Todas essas soluções foram avaliadas no comprimento de onda 550 nm, figura 26.

Figura 26 - Curva de calibração em tampão fosfato citrato pH 7,0 para o DPPH, $\text{abs} = 0,02271x - 0,01510$; $r^2 = 0,9995$.

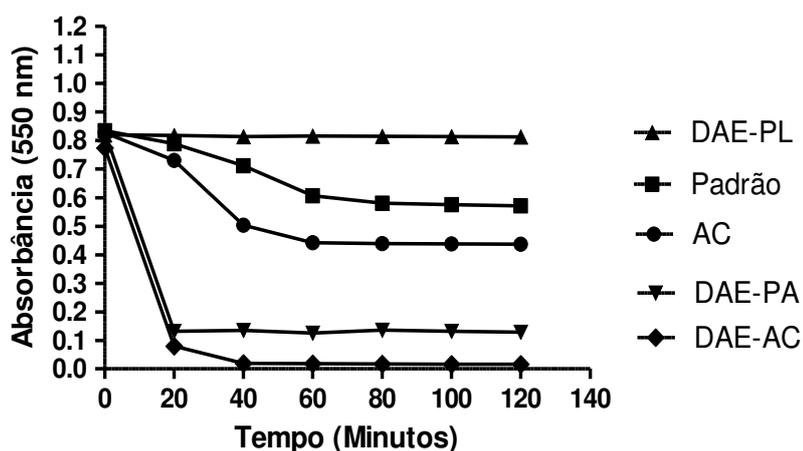


Fonte: Dados da pesquisa.

6.9.3 Avaliação da atividade antioxidante

O padrão de betalaína apresentou uma atividade antioxidante final de 31,61% e o extrato AC apresentou uma atividade antioxidante de 47,22%, figura 27. A explicação para a atividade antioxidante do extrato AC ser maior, reside no fato das propriedades antioxidantes da beterraba não serem exclusivas das betalaínas existindo a presença de outros compostos com atividade antioxidante tais como licopeno, ácido ascórbico e antocianinas (Zabotti; Genena, 2013 e Ramos, 2015).

Figura 27 - Teste de antioxidante realizado com as formulações preparadas pela técnica DAE.



Fonte: Dados da pesquisa.

Em relação à formulação DAE, os resultados mostraram que DAE-PL não apresentou nenhuma atividade antioxidante com DPPH, o que confirma a característica de sistema encapsulante inerte, Figura 28.

Figura 28 - Teste antioxidante realizado com partículas DAE-PL. A- Solução em contato com DAE-PL no tempo inicial do teste; B- Solução em contato com DAE-PL no tempo final do teste.

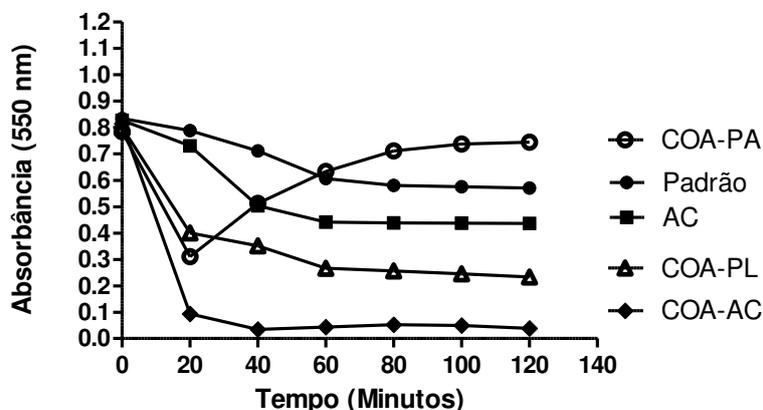


Fonte: Autoria própria.

No tempo de 20 minutos a cinética de liberação da DAE foi de 72,02% do ativo, com essa concentração de ativo liberado do sistema microparticulado, observa-se uma atividade antioxidante de 84,07% para a DAE-PA e 89,67%, para DAE-AC. Ao final do teste, a DAE- AC apresentou uma atividade antioxidante de 97,93%, sendo este valor 13,5% maior que a DAE-PA (84,43%), sendo justificável pelo fato das propriedades antioxidantes da beterraba não serem exclusivas das betalainas, mesmo fenômeno observado na atividade antioxidante do padrão e do extrato.

Em relação à coacervação foi observado que durante o teste realizado com a formulação COA-PL obtiveram-se valores diminuídos de absorbância, o que poderia indicar uma possível atividade antioxidante (figura 29).

Figura 29 - Teste antioxidante realizado com as formulações preparadas pela técnica coacervação complexa.



Fonte: Dados da pesquisa.

No entanto, ao iniciar o processo de intumescimento, percebeu-se nestas micropartículas, uma liberação de material residual para o meio reacional (tampão fosfato citrato pH 7,0), sendo a quitosana um dos componentes liberados da formulação. Ao mesmo tempo, observou-se uma absorção do DPPH diretamente vetorizada ao material residual contendo quitosana, justificando a diminuição da absorbância, a sua coloração roxa e não comprovando a atividade antioxidante da formulação placebo figura 30.

Figura 30 - Teste de antioxidante realizado com COA-PL. A- Solução de DPPH em contato com partículas COA-PL, B- Material liberado no meio reacional após centrifugação.

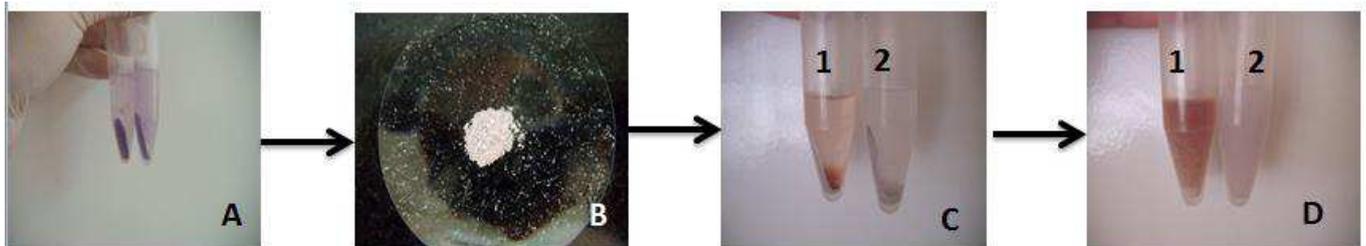


Fonte : Autoria própria.

Com o intuito de avaliar a possível afinidade do DPPH ao material residual liberado pelas micropartículas, realizou-se um teste com o objetivo de forçar a liberação do DPPH que poderia estar aprisionado nesse resíduo.

Desta maneira, o material residual foi coletado e deixado secar a temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas (Figura 31B). Ao término da secagem, parte da amostra foi colocada em metanol e outra parte sistema tampão (Figura 31C). A reação em sistema tampão não demonstrou liberação, porém a realizada em metanol liberou gradativamente cor, indicando assim, que o DPPH realmente possui afinidade pelo material residual liberado das micropartículas feitas por coacervação complexa (Figura 31D).

Figura 31- Comportamento do DPPH em diferentes sistemas solventes: A- Absorção do DPPH ao material residual liberado pela COA-PL. B- Material residual desidratado (roxo). C- Material residual contendo DPPH em diferentes solventes (tubo 1- metanol e tubo 2 - tampão). D- Solubilização do DPPH após agitação (tubo 1- metanol e tubo 2 - tampão).



Fonte: Autoria própria.

Em relação à atividade antioxidante de COA-PA, se observou uma queda inicial da absorbância, seguida por um aumento da mesma, figura 29.

A queda inicial é justificada, devido à afinidade do DPPH ao material residual, fazendo com que ele penetre nesse material e conseqüentemente diminua a absorbância da solução, sendo esse fenômeno já observado no teste realizado com COA-PL.

O aumento da absorbância se deve a liberação de betalaínas, isso é observado ao longo do teste, quando a coloração majoritária da solução passa do roxo para o rosa indicando que houve liberação de betalaínas, ao mesmo tempo que ocorria a absorção do DPPH, figura 32 .

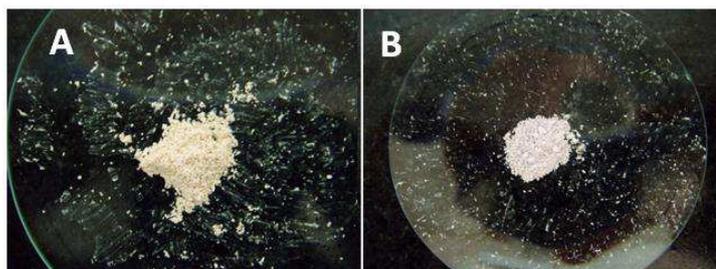
Figura 32 - Mudança da coloração ao longo do teste com COA-PA. A- Início do teste, B – intervalo de 40 minutos, C- 80 minutos, observar a mudança de coloração da solução, D- 120 minutos.



Fonte: Acervo próprio.

Dessa maneira, não se pode afirmar que ocorreu uma reação de inativação do DPPH pelas betalaínas, porém ao final do teste o material residual foi coletado e seco, se apresentando com uma cor amarelada, quando comparado ao obtido pela COA-PL, figura 33. Este resultado pode ser indicativo que a reação entre DPPH e betalaínas ocorreu dentro do material residual, se isso realmente aconteceu não será possível à mensuração da atividade antioxidante pelas técnicas utilizadas.

Figura 33 - Comparação entre a coloração do material residual. A- Material obtido do teste com COA-PA (amarelo) e B-Material obtido do teste de COA-PL (roxo).



Fonte: Acervo próprio

Em relação à atividade antioxidante de COA-AC (Figura 29) se observa no tempo de 20 minutos uma atividade antioxidante de 88,46%, um pouco menor que a obtida por DAE-AC (89,67%). Já no tempo de 120 minutos obtém-se uma atividade antioxidante de 95,21%, valor este bem semelhante a DAE-AC (97,93%).

Durante o teste realizado com COA-AC foi observado alteração de cor da solução ao longo do tempo, que passou do roxo para o amarelo, indicando que houve uma reação entre o DPPH e o extrato liberado, figura 34.

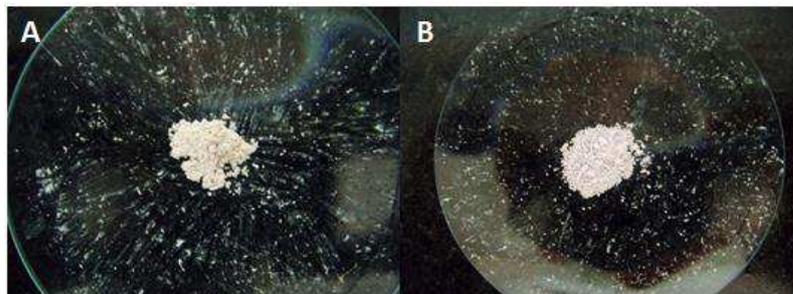
Figura 34 - Mudança da coloração ao longo do teste entre DPPH e COA-AC. T0- Tempo inicial; T1- Após 40 minutos ; T2 – 80 minutos; T3- 120 minutos.



Fonte: Acervo próprio.

O material residual coletado da COA-AC apresentou coloração característica amarelada (Figura 35) o que pode ser indicativo que parte da reação com o DPPH ocorreu dentro do material residual.

Figura 35- Comparação entre a coloração do material residual coletado. Observar as colorações características de cada amostra. A-Material oriundo de COA-AC (amarelo); B- Material oriundo de COA-PL (roxo).



Fonte: Acervo próprio.

Dessa maneira, parte da reação entre DPPH e COA-AC, ocorreu no interior do material residual. Se isso for o caso, os valores calculados de atividade antioxidante para essas partículas, podem não retratar a sua real capacidade antioxidante, sendo necessário comparar os resultados obtidos com outras técnicas que avaliam a atividade antioxidante.

7 CONCLUSÃO

Diante do exposto, verificou-se a necessidade de se observar questões inerentes à degradação de compostos (escolha de solvente, temperatura) para se obter um extrato de beterraba contendo betalaínas com atividade antioxidante.

A técnica de manipulação DAE mostrou ser de fácil preparo para a obtenção de emulsões secas. A cinética de liberação indicou um sistema microparticulado de liberação imediata, atingindo 72,02% de liberação aos 20 minutos e finalizando com uma liberação total de 80,39%. Além disso, os sistemas de microencapsulação oriundos da DAE potencializaram a atividade antioxidante do padrão e do extrato AC. Os testes de intumescimento realizados para essa técnica corroboraram com os estudos já realizados, confirmando assim, a característica de sistema encapsulante inerte que essa formulação possui.

Em relação à técnica de coacervação complexa, percebeu-se que o tamanho do orifício de gotejamento, o tempo de contato entre gel e solução de eletrólito, juntamente com a velocidade de gotejamento foram fatores que influenciaram na homogeneidade das partículas. A cinética dessa formulação indicou um sistema de liberação mais lenta, porém maior que as partículas obtidas pela DAE, obtendo valores de liberação de 37,52% aos 20 minutos e atingindo 95,18% aos 120 minutos. Nessa técnica, percebeu-se ainda uma associação entre intumescimento e liberação de ativo, indicando um dos possíveis mecanismos de liberação dessa formulação.

Outro ponto em relação à coacervação é a liberação de material residual por essas partículas que dificultam a avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH. Dessa maneira, fica como sugestão para as futuras pesquisas, a comparação dos resultados com outras técnicas de atividade antioxidante.

Comparar técnicas de manipulação para sistemas microparticulados devem ser estimuladas pela comunidade científica, principalmente quando envolve incorporação de antioxidantes às formulações. Isto porque, esses compostos

possuem instabilidades inerentes ao ativo que podem ser contornadas por sistemas microparticulados. Além disso, existe a possibilidade do aumento da atividade antioxidante, com técnicas de microencapsulação relativamente simples, levando ao uso mais econômico desses compostos e aumentando o valor agregado do produto final.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAERLOCHER. **baerlocher additives metallic stearates**, Unterschleissheim, Alemanha , 2005.

BASTOS, B. M. GRANDINI, C. P. LOBO, I. SANTOS, M. A. ANTELO, F. **Avaliação da cinética de degradação térmica de antocianinas e betalaínas extraídas de beta vulgaris I**. In: 12ª mostra de produção universitária, Rio Grande/RS, Brasil, 2013.

BASTOS , B. M. GRANDINI , C. P. RODRIGUES , S. K. C. SANTOS , M. A. LOPES, T. J. ANTELO, F. S. **AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA DE BETALAÍNAS EXTRAÍDAS DE Beta vulgaris L**. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química ,Florianópolis/SC, Brasil, 2014.

BARROS, Frederico Augusto Ribeiro. STRINGHETA, Paulo César. **MICROENCAPSULAMENTO DE ANTOCIANINAS: UMA ALTERNATIVA PARA O AUMENTO DE SUA APLICABILIDADE COMO INGREDIENTE ALIMENTÍCIO**. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, ano IX, Pg. 18, Nº 36, Brasília-DF, Janeiro/junho de 2006.

CARVALHO, Joana Sanches Roque de. **ENCAPSULAMENTO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORIGANUM VIRENS L. EM MATRIZES DE GELATINA E GELATINA/SACAROSE**. 76f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar)-Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

CHAMBIN, O. BELLONE, C. CHAMPION, D. ROCHAT-GONTHIER, M. H. POURCELOT, Y. **DRY ADSORBED EMULSION: 1. CHARACTERIZATION OF AN INTRICATE PHYSICO-CHEMICAL STRUCTURE**. Journal of pharmaceutical sciences, VOL. 89, NO. 8. Pg. 992-999, august 2000.

CHAMBIN, O. BÉRARD, V. ROCHAT-GONTHIER, M. H. POURCELOT, Y. **DRY ADSORBED EMULSION: 2. DISSOLUTION BEHAVIOUR OF AN INTRICATE FORMULATION.** International Journal of Pharmaceutics, V. 235, Pg. 169-178, 2002.

CUCHINSKI ,A. S. CAETANO, J. DRAGUNSKI, D. C. **EXTRAÇÃO DO CORANTE DA BETERRABA (BETA VULGARIS) PARA UTILIZAÇÃO COMO INDICADOR ÁCIDO-BASE.** , Ecl. Quím., São Paulo, 35 - 4: Pg 17 – 23, 2010.

COMUNIAN, Talita Aline **.MICROENCAPSULAÇÃO DE ÁCIDO ASCORBICO POR COACERVAÇÃO COMPLEXA E DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS:ESTUDO ESTRUTURAL, ESTABILIDADE E APLICAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS,** 194f.Dissertação (Mestrado em Ciências), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos- Universidade de São Paulo, Pirassununga,2013.

COSTA, Adriana Elaine da. **ADSORÇÃO E PURIFICAÇÃO DE CORANTES NATURAIS COM SÍLICA AMORFA.**79 f. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2005.

COSTA, Silvana Cartaxo da. **DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE XILANA PELA TÉCNICA DE RETICULAÇÃO POLIMÉRICA INTERFACIAL USANDO TRIMETAFOSFATO DE SÓDIO.** 45f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas)- Curso Superior de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2011.

DALLAGNOL, Viviane Cristina. **AVALIAÇÃO DO EXTRATO DE BETERRABA MICROENCAPSULADO.** 47f. Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação em tecnólogo de alimentos)-Curso Superior de Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná,Campo Mourão,2013.

DIAS, K. B. SILVA, D. P. FERREIRA , L. A. FIDELIS,R. R. COSTA , J. L. SILVA, A. L. L. SCHEIDT, G. N. **QUITINA E QUITOSANA: CARACTERÍSTICAS, UTILIZAÇÕES E PERSPECTIVAS ATUAIS DE PRODUÇÃO**. Journal of Biotechnology and Biodiversity, Vol. 4, N.3, pg. 184-191, August, 2013.

DRUNKLER, Deisy Alessandra. FALCÃO, Leila Denise. BORDIGNON-LUIZ, Marilde Terezinha. **INFLUÊNCIA DOS ÁCIDOS TÂNICO E GÁLICO NA ESTABILIDADE DE BETACIANINAS DO EXTRATO BRUTO DE BETERRABA VERMELHA (*BETA VULGARIS L.*)**. Alim. Nutr. Araraquara, v.15, n.1, p.35-41, 2004.

DUARTE, Allana Bruna Sucupira, **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO β -CAROTENO EXTRAÍDO DO PIMENTÃO VERMELHO (*Capsicum anuum L.*) EM CREMES PELO MÉTODO DPPH**. EDUCAÇÃO CIÊNCIA E SAÚDE, v.2, n.1, p. 83 a 99, 2015.

DUARTE-ALMEIDA, Joaquim Maurício. SANTOS, Ricardo José dos. GENOVESE, Maria Inês. LAJOLO, Franco Maria. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO SISTEMA β -CAROTENO/ÁCIDO LINOLÉICO E MÉTODO DE SEQÜESTRO DE RADICAIS DPPH**.Ciênc. Tecnol. Aliment, Campinas, V.26,Nº. 2,Pg. 446-452, abr.-jun. 2006.

EMBRAPA, **HORTALIÇAS NA WEB - 50 HORTALIÇAS**, Disponível em: <http://www.cnph.embrapa.br/hortalicasnaweb/beterraba.html> Acessado: 12 de abril de 2014.

EMBRAPA. SEBRAE. **CATÁLOGO BRASILEIRO DE HORTALIÇAS SAIBA COMO PLANTAR E APROVEITAR 50 DAS ESPÉCIES MAIS COMERCIALIZADAS NO PAÍS**. Brasília (DF), 2010.

FRANÇA, Emanuel Laurertan Tavares. QUEIROZ, Thayane Melo de. ARAÚJO, Ana Raquel da Silva. Macêdo , Ana Angélica Mathias.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH DE EXTRATO VEGETAL DA CASCA DA AROEIRA (*MYRACRODRUON URUNDEUVA* FR. ALL.). VII CONNEPI - Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação. Tocantins, 2012.

GONÇALVES, L. C. P. MARCATO, A. C. RODRIGUES, A. C. B. PAGANO, A. P. E. FREITAS, B. C. MACHADO, C. O. NAKASHIMA, K. K. ESTEVES, L. C. LOPES, N. B. BASTOS, E. L. **BETALAÍNAS: DAS CORES DAS BETERRABAS À FLUORESCÊNCIA DAS FLORES.** Rev. Virtual Quim., , Vol. 7 N° 1, pg. 292-309, 2015.

HARRIS, Maria Inês Nogueira de Camargo. **PELE: ESTRUTURA , PROPRIEDADES E ENVELHECIMENTO .** São Paulo: Editora Senac São Paulo, 165 pg. 2003.

HORST, Bethânia Luiza. **ESTUDO DA ESTABILIDADE DO CORANTE NATURAL BETALAÍNA MICROENCAPSULADO COM MATRIZ POLIMÉRICA DE QUITOSANA/ALGINATO.** Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, , novembro de 2005.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). **COMPENDIUM OF CHEMICAL TERMINOLOGY GOLD BOOK.** Disponível em: <http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf> , Acessado em 09 de maio de 2014.

KAUR, Amardeep. CHAND, Bhag. KAMAL, Anita S. **DEVELOPMENT AND EVALUATION OF DRY ADSORBED EMULSION FOR EXTENDED RELEASE OF NIACINAMIDE.**, IJAPBC, Ed. 2, Vol. 2. Pg. 291-326, Apr- Jun 2013.

LEIMANN, Fernanda Vitória **.MICROENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM LIMÃO UTILIZANDO O PROCESSO DE COACERVAÇÃO SIMPLES.** 115f. Dissertação (Mestrado em Engenharia

Química)- Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis,2008.

LIVREA, Maria A. TESORIERE, Luisa. **HEALTH BENEFITS AND BIOACTIVE COMPONENTS OF THE FRUITS FROM OPUNTIA FICUS-INDICA [L.] MILL.** Journal of the Professional Association for Cactus Development. 2006.

LOPES, Nathana B. GONÇALVES, Letícia C. P. OLIVEIRA JR, Vani X. de. BAADER, Wilhelm J. BASTOS, Erick L. **COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA A PURIFICAÇÃO DE BETANINA.** II Simpósio de Iniciação Científica da Universidade Federal do ABC. 2009.

MARTINS, Mayra Conceição Peixoto. **PARTIÇÃO DE CLOROFILA E BETALAÍNA UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS.** 80 f. Tese(Doutorado)-Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais,2012.

MARTINS,Carolina de Aguiar. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO E INVIVO DO GUARANÁ(PAULLINIA CUPANA) EM PÓ.** Dissertação(Mestrado), 115 f. Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, 2010.

NASCIMENTO, Juliana Couto. LAGE, Luiz Fernando Oliveira. CAMARGOS, Cláudio Rodrigues Dayrell. AMARAL, Juliana Coelho. COSTA, Lucas Martins. SOUSA, Adriana Nascimento de. OLIVEIRA, Franciella Queiroz. **DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH E DOSEAMENTO DE FLAVONÓIDES TOTAIS EM EXTRATOS DE FOLHAS DA BAUHINIA VARIEGATA L.** Rev. Bras. Farm. V. 92, Nº. 4, Pg. 327-332, 2011.

OLIVEIRA, Alane Cabral de. VALENTIM, Iara Barros. GOULART, Marília Oliveira Fonseca. SILVA, Cícero Alexandre. BECHARA, Etelvino José Henriques. TREVISAN, Maria Teresa Salles. **FONTES VEGETAIS**

NATURAIS DE ANTIOXIDANTES. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 3, 689-702, 2009.

PARIZE, Alexandre Luis. **DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MICROPARTICULADOS E DE FILMES A BASE DE QUITOSANA E CORANTE NATURAL CÚRCUMA.** 187f. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

PEZZINI, Bianca Ramos ; SILVA, Marcos Antônio Segatto; FERRAZ, Humberto Gomes. **FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS ORAIS DE LIBERAÇÃO PROLONGADA: SISTEMAS MONOLÍTICOS E MULTIPARTICULADOS.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, Vol. 43, N. 4, out./dez., 2007.

RAMOS, JULIANA ARRUDA. **ACEITABILIDADE E QUALIDADE NUTRICIONAL DE BETERRABAS IN NATURA E PRÉ-PROCESSADAS SUBMETIDAS A DIFERENTES MÉTODOS DE COCÇÃO.** 112f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, BOTUCATU, 2015.

RIBEIRO, Núbia Moura; NUNES, Carolina Rodeiro. **ANÁLISE DE PIGMENTOS DE PIMENTÕES POR CROMATOGRÁFIA EM PAPEL.** *Química Nova na Escola*, São Paulo, n. 29, p. 34-37, 2008.

ROSSAN, Marcos Roberto. **PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRO E NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS PARA APLICAÇÃO EM COSMÉTICO.** 2011, 215f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas-SP, 2011.

RUFINO, Maria do Socorro Moura; ALVES, Ricardo Elesbão; BRITO, Edy Sousa de; MORAIS, Selene Maia de; SAMPAIO, Caroline de Goes; JIMÉNEZ, Jara Pérez; CALIXTO, Fulgencio Diego Saura. **METODOLOGIA CIENTÍFICA: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL**

EM FRUTAS PELA CAPTURA DO RADICAL LIVRE DPPH. Comunicado técnico. Fortaleza-CE, Julho, 2007.

SCARDELATO, Juhan Augusto; LEGRAMANDI, Victor Hugo Pella; SACRAMENTO, Luis Vitor Silva do. **OCORRÊNCIA DE CRISTAIS EM PLANTAS MEDICINAIS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DA NEFROLITÍASE: PARADOXO?** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada; Nº 34, Pg. 161-168, 2013.

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende. **DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE SISTEMAS NANO E MICROPARTICULADOS CONTENDO MELATONINA.** Tese (Doutorado), 276f. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SCHIOZER, A. L.; BARATA, L. E. S. **ESTABILIDADE DE CORANTES E PIGMENTOS DE ORIGEM VEGETAL.** Revista Fitos, junho. Vol.3 Nº02, 2007.

SEVERINO, Patrícia. SANTANA, Maria Helena A. PINHO, Samantha C. SOUTO Eliana B. **POLÍMEROS SINTÉTICOS BIODEGRADÁVEIS: MATÉRIAS-PRIMAS E MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE MICROPARTÍCULAS PARA USO EM *DRUG DELIVERY* E LIBERAÇÃO CONTROLADA.** Polímeros, vol. 21, nº 4, p. 286-292, São Carlos-SP, 2011.

SIENER, Roswitha. HÖNOW, Ruth .SEIDLE, Ana .VOSS, Susanne. HESSE, Albrecht. **OXALATE CONTENTS OF SPECIES OF THE POLYGONACEAE, AMARANTHACEAE AND CHENOPODIACEAE FAMILIES.** Food Chemistry, Volume 98, Pages 220–224, , 2006.

SOUZA, Rosilane Moreth **CORANTES NATURAIS ALIMENTÍCIOS E SEUS BENEFÍCIOS À SAÚDE.** 65f. Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação em Farmácia), UEZO- Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, 2012.

STULZER, Hellen Karine. **DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE SISTEMAS MICROPARTICULADOS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA A BASE DE QUITOSANA CONTENDO O ANTIVIRAL ACICLOVIR**. Tese (Doutorado), 268f. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

TAN, Angel. SIMOVIC, Spomenka. DAVEY, Andrew K. RADES, Thomas. PRESTIDGE, Clive A. **SILICA-LIPID HYBRID (SLH) MICROCAPSULES: A NOVEL ORAL DELIVERY SYSTEM FOR POORLY SOLUBLE DRUGS**. Journal of Controlled Release, V. 134, Pg 62–70, 2009.

TOSONI, Solange Fávoro. RODRIGUES, Vanessa Carvalho. **CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E ANTIOXIDANTES DE PRÓPOLIS MICROENCAPSULADA COM DIFERENTES TIPOS DE MATERIAIS ENCAPSULANTES**. 37f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em tecnólogo de alimentos)-Curso Superior de Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2013.

VOLP, Ana Carolina Pinheiro. RENHE, Isis Rodrigues Toledo. STRINGUETA, Paulo César. **PIGMENTOS NATURAIS BIOATIVOS**. Alim. Nutr., Araraquara jan./mar. v.20, n.1, p. 157-166, 2009.

ZABOTTI, Caroline. GENENA, Aziza Kamal. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO OBTIDO A PARTIR DA BETERRABA VERMELHA (*BETA VULGARIS* L.) POR MEIO DO USO DE ÁGUA COMO SOLVENTE DE EXTRAÇÃO**. Cascavel: Cultivando o Saber, v. 6, n. 4, p. 195 – 200, 2013.