



# ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA

ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA

## **Micronização de Ácido Fusídico**

**PATRÍCIA ALEXANDRA ANICETO MATOS**

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica – Ramo Química)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre  
em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Doutor José Augusto Paixão Coelho

Doutora Maria Beatriz Pinto Pereira Palma Nobre

Júri:

Presidente: Doutora Isabel Maria da Silva João

Vogais:

Doutora Maria Beatriz Pinto Pereira Palma Nobre

Doutor Manuel José de Matos

**Julho 2019**



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, um especial agradecimento aos meus dois orientadores. À Dra. Beatriz Nobre por todos os ensinamentos, por toda a ajuda dada, pela dedicação e pela calma e motivação transmitida quando tudo parecia correr mal. Ao Dr. José Coelho por ter depositado confiança em mim ao propor-me este trabalho, pela ajuda e disponibilidade constantes e pela transmissão de calma e confiança quando algo corria mal.

Agradeço igualmente ao Professor António Palavra por me ter acolhido no seu grupo de investigação e por todos os conhecimentos transmitidos.

A todos que contribuíram para a conclusão deste trabalho, em especial à Dra. Vânia André pela disponibilidade em ajudar-me com a difração de raios-X e ao Professor José Paulo Farinha por ter disponibilizado o NanoSight.

Aos meus amigos agradeço pela amizade demonstrada, pela companhia e bons momentos nas alturas certas.

Ao meu namorado agradeço a ajuda dada sempre necessário, a palavra certa na altura certa e toda a paciência demonstrada nos últimos tempos.

A toda à minha família agradeço todo o apoio dado. Obrigada mãe por teres estado sempre do meu lado e por me dares o teu apoio quando as coisas não correram bem. Pai obrigada por estares sempre presente, por me manteres os pés na terra e me acalmares quando parece que tudo está a desabar ao meu redor. Obrigada aos dois por terem sempre acreditado em mim e por me transmitirem uma confiança sem limites.

## Resumo

Neste trabalho foi realizado um estudo de micronização com anti-solvente supercrítico do ácido fusídico, um antibiótico utilizado em formulações tópicas e oftálmicas. A micronização do ácido fusídico tem como objetivo o aumento da sua biodisponibilidade, bem como a alteração do seu tamanho de partícula de forma a ser utilizado nas diferentes formulações.

O processo foi realizado num aparelho de micronização supercrítica, onde o fluido supercrítico, CO<sub>2</sub>, é utilizado como anti-solvente e a acetona é utilizada como solvente. Neste processo foi estudado os efeitos das diferentes condições no tamanho médio de partícula utilizando o desenho experimental.

Numa primeira fase foi utilizado o *Fractional Factorial Design* com quatro fatores de estudo, a temperatura com valores entre 40 °C e 60 °C, a pressão entre 100 bar e 200 bar, a concentração entre 10 mg/mL e 40 mg/mL e o caudal de injeção de solvente entre 0,5 mL/min e 3 mL/min, e um fator de resposta, o tamanho médio de partícula. A análise estatística do FFD mostrou que a temperatura e o caudal são os fatores significativos deste processo.

Com os resultados do estudo estatístico é possível realizar a otimização do sistema utilizando o *Central Composite Design* onde a pressão foi estabelecida a 100bar e a concentração da solução foi mantida a 40 mg/mL, e fez-se variar a temperatura e o caudal de injeção entre 40 e 60 °C e de 0,5 a 3 mL/min, respetivamente. Numa segunda, e última, fase a otimização do processo é efetuada de forma a obter a previsão das condições experimentais para minimizar o tamanho médio de partícula. A previsão obtida pela otimização estimou que o menor tamanho médio de partícula seria de 0,223 µm às condições de trabalho de 40 °C, 100 bar, 40 mg/mL e 0,5 mL/min. Através desta otimização foi possível, também, obter a previsão das condições de trabalho para tamanhos médios de partícula entre 1 e 3 µm, valores necessários para produzir formulações oftálmicas, onde estas variam entre 40 e 45,08 °C e de 0,560 a 2,552 mL/min, mantendo a pressão a 100 bar e a concentração a 40 mg/mL.

**Palavras-chave:** Ácido fusídico; micronização; fluidos supercríticos; anti-solvente; dióxido de carbono; desenho experimental.

## Abstract

A micronization study with supercritical anti-solvent of fusidic acid, which is an antibiotic used in topical and ophthalmic formulations, was carried out in this work. The fusidic acid micronization aims at increasing its bioavailability, as well as the change of the particle size in order to be used in the various formulations.

The process was carried out in a supercritical antisolvent micronization (SAS) apparatus where supercritical fluid, CO<sub>2</sub>, is used as antisolvent and acetone is used as the solvent. In this process the effect of different conditions on the mean particle size was studied, using the design of experiments.

Initially a Fractional Factorial Design was used with four study factors, the temperature, with values between 40 °C and 60 °C, the pressure, varied between 100 bar and 200 bar, concentration ranging between 10 mg/ml and 40 mg/ml and the solvent injection flow rate with values between 0.5 mL/min and 3 mL/min, being the mean particle size the response factor. The statistical analysis of FFD showed that temperature and flow were the significant factors of this process.

With the results of the statistical study and using the Central Composite Design it was possible to perform the optimisation of the system where the pressure was established at 100 bar and the concentration of the solution was maintained at 40 mg/mL and the temperature and the injection flow rate were varied between 40 to 60 °C and 0.5 to 3 mL/min, respectively. In a second and final stage a process optimisation was performed to obtain the prediction of the experimental conditions in order to minimize the mean particle size. The prediction obtained by the optimisation estimated that the smallest mean particle size would be 0.223 µm at the working conditions of 40°C, 100 bar, 40 mg/mL and 0.5 mL/min. Through this optimisation was also possible to obtain the expected working conditions to obtain a mean particle size between 1 and 3 µm, values that are required to produce ophthalmic formulations, which were temperature ranging from 40 to 45.08 °C and concentration from 0.560 to 2.552 mL/min, maintaining the pressure at 100 bar and the concentration at 40 mg/mL.

**Keywords:** Fusidic acid; micronization; supercritical fluids; anti-solvent; carbon dioxide; design of experiments.

# Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo .....	ii
Abstract .....	iii
Índice.....	iv
Índice de figuras .....	vii
Índice de tabelas.....	xii
Lista de Abreviaturas .....	xiii
1. Objetivo .....	1
2. Introdução.....	2
2.1 Engenharia de Partículas .....	2
2.2 Micronização .....	5
2.2.1 Fluidos Supercríticos .....	6
2.2.1.1 Expansão rápida de soluções supercríticas (RESS).....	8
2.2.1.2 Precipitação de soluções saturadas em gás (PGSS).....	9
2.2.1.3 Atomização Assistida Supercrítica (SAA) .....	10
2.2.1.4 Anti-solvente Supercrítico (SAS) .....	11
2.2.1.4.1 Morfologias .....	12
2.2.1.4.2 Estado de arte da micronização SAS.....	16
3. Técnica Experimental .....	19
3.1 Materiais.....	19
3.1.1 Ácido Fusídico .....	19
3.2 Descrição do Equipamento .....	20
3.3 Procedimento Experimental.....	23
3.4 Caracterização das Amostras.....	23
3.4.1 Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM).....	23
3.4.2 <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> (NTA).....	23
3.4.3 Espectroscopia de Infravermelhos (FTIR).....	23

3.4.4 Difração por Raio-X .....	24
3.5 Desenho Experimental (DOE) .....	24
4. Resultados.....	26
4.1 Desenho Experimental .....	26
4.1.1 Fractional Factorial Design (FFD) .....	26
4.1.1.1 Análise macroscópica.....	28
4.1.1.2 Análise microscópica.....	30
Ensaio 1 – 40 °C 100 bar 10 mg/mL 0,5 mL/min .....	33
Ensaio 2 – 60 °C 100 bar 10 mg/mL 3 mL/min .....	34
Ensaio 4 – 60 °C 200 bar 10 mg/mL 0,5 mL/min .....	36
Ensaio 5 – 40 °C 100 bar 40 mg/mL 3 mL/min .....	39
Ensaio 6 – 60 °C 100 bar 40 mg/mL 0,5 mL/min .....	41
Ensaio 7 – 40 °C 200 bar 40 mg/mL 0,5 mL/min .....	43
Ensaio 8 – 60 °C 200 bar 40 mg/mL 3 mL/min .....	46
Ensaio 9 – 50 °C 150 bar 25 mg/mL 1,75 mL/min .....	48
4.1.1.3 Análise da pureza – Espectroscopia de Infravermelhos (FTIR) .....	50
4.1.1.4 Análise de pureza – Difração por Raio-X.....	55
4.1.1.5 Análise Estatística – FFD .....	58
4.1.2 Central Composite Design (CCD) .....	61
4.1.2.1 Análise Microscópica.....	62
Ensaio CCD1 – 60 °C 100 bar 40 mg/mL 3 mL/min.....	62
Ensaio CCD2 – 50 °C 100 bar 40 mg/mL 3 mL/min.....	65
Ensaio CCD3 – 60 °C 100 bar 40 mg/mL 1,75 mL/min.....	67
Ensaio CCD7 – 50 °C 100 bar 40 mg/mL 1,75 mL/min.....	69
4.1.2.2 Análise da pureza – Espectroscopia de Infravermelhos (FTIR) .....	70
4.1.2.3 Análise Estatística – CCD.....	73
5. Conclusão.....	78
Bibliografia.....	80
Anexo A.....	i

Anexo B.....	ii
Anexo C.....	iii
Anexo D.....	iv
Anexo E.....	v
Anexo F.....	vi
Anexo G.....	vii
Anexo H.....	viii
Anexo I.....	xiii

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> – Diagrama e fases do dióxido de carbono [9]. .....	7
<b>Figura 2</b> - Síntese dos mecanismos de precipitação de partículas amorfas. EMP – Micropartículas expandidas [25]. .....	13
<b>Figura 3</b> - Representação da mudança do equilíbrio líquido vapor de um sistema binário (linha contínua), quando um terceiro componente (Z) é adicionado (linha tracejada) em uma determinada concentração [26]. .....	15
<b>Figura 4</b> – Estrutura química do Ácido Fusídico. ....	19
<b>Figura 5</b> – Diagrama esquemática do aparelho SAS. G, garrafa de CO <sub>2</sub> com tubo prolongador; S, bureta; C, condensador; B1 e B2, bombas de alta pressão; BP1 e BP2, reguladores de pressão; DR1, DR2 e DR3, discos de rutura; BT, banho termostático; VP, vaso de precipitação; VM, válvula micrométrica; VS, vaso de recolha de solvente; V1 e V2, válvula; Q, medidor de caudal; CG, contador de gás; T, indicador de temperatura; P, indicador de pressão. ....	20
<b>Figura 6</b> – Aparelho de micronização supercrítica. ....	21
<b>Figura 7</b> - Vaso de precipitação de alta pressão de aço inoxidável. ....	22
<b>Figura 8</b> – Recolha do ácido fusídico micronizado: Aspeto do produto obtido, a) Ensaio 1; b) Ensaio 8 .....	28
<b>Figura 9</b> - Recolha do ácido fusídico micronizado: diferentes formas de precipitação no vaso, a) Ensaio 1; b)Ensaio 4 .....	28
<b>Figura 10</b> – Imagem SEM do ácido fusídico fornecido pela Sigma Aldrich com ampliação de 1000 vezes. ....	30
<b>Figura 11</b> – Imagem SEM do ácido fusídico fornecido pela TCI com ampliação de 1000 vezes. ....	30
<b>Figura 12</b> – Imagens SEM dos produtos micronizados obtido: a) Ensaio1; b) Ensaio 2; c) Ensaio4; d) Ensaio 5; e) Ensaio 6; f) Ensaio7; g) Ensaio 8; h) Ensaio 9.....	32
<b>Figura 13</b> - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 1: a) Ampliação de 100x e b) ampliação 3000x.....	33
<b>Figura 14</b> – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	34
<b>Figura 15</b> - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 2: a) Ampliação de 100x e b) ampliação 3000x.....	35
<b>Figura 16</b> – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	36
<b>Figura 17</b> - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 4: a) Ampliação de 100x e b) ampliação 500x.....	37

<b>Figura 18</b> – Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 4 a uma ampliação de 3000x.....	38
<b>Figura 19</b> – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	39
<b>Figura 20</b> - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 5 a uma ampliação de 100x.....	39
<b>Figura 21</b> - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 5 com uma ampliação de 3000x em zonas distintas.....	40
<b>Figura 22</b> – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	41
<b>Figura 23</b> - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 6: a) Ampliação de 75x e b) ampliação 1000x.....	42
<b>Figura 24</b> – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	43
<b>Figura 25</b> - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 7: a) Ampliação de 1000x e b) ampliação 5000x.....	44
<b>Figura 26</b> - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 7 com uma ampliação de 5000x.....	45
<b>Figura 27</b> – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	46
<b>Figura 28</b> - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 8 com uma ampliação de 400x.....	46
<b>Figura 29</b> - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 8: a) Ampliação de 1000x e b) ampliação 3000x.....	47
<b>Figura 30</b> – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	48
<b>Figura 31</b> - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 9 com uma ampliação de 750x.....	48
<b>Figura 32</b> - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 9 com uma ampliação de 3000x.....	49
<b>Figura 33</b> – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	49
<b>Figura 34</b> – Representação do espectro de infravermelho do ácido fusídico fornecido pela Sigma e pela TCI. ....	50

<b>Figura 35</b> – Representação dos espectros de infravermelho do ácido fusídico micronizado obtido para cada ensaio FFD efetuado. ....	52
<b>Figura 36</b> – Comparação entre os espectros de infravermelho do ácido fusídico micronizado obtido no ensaio 1 e no ensaio 7. ....	52
<b>Figura 37</b> – Comparação entre os espectros de infravermelho do ácido fusídico micronizado obtido no ensaio 2, ensaio 5, ensaio 6 e no ensaio 9. ....	53
<b>Figura 38</b> – Comparação entre os espectros de infravermelho do ácido fusídico micronizado obtido no ensaio 4 e no ensaio 8. ....	53
<b>Figura 39</b> – Representação do difratograma de raio-X obtido para o ácido Fusídico fornecido pela TCI. ....	55
<b>Figura 40</b> – Representação do difratograma de raio-X do ácido fusídico micronizado obtido para cada ensaio FFD efetuado. ....	56
<b>Figura 41</b> – Comparação entre difratogramas de raio-X do ácido fusídico micronizado obtido no ensaio 1 e no ensaio 7. ....	56
<b>Figura 42</b> – Comparação entre difratogramas de raio-X do ácido fusídico micronizado obtido no ensaio 2, ensaio 4 e no ensaio 9. ....	57
<b>Figura 43</b> – Comparação entre difratogramas de raio-X do ácido fusídico micronizado obtido no ensaio 5, ensaio 6 e no ensaio 8. ....	57
<b>Figura 44</b> - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio CCD1 com uma ampliação de 50x. ....	63
<b>Figura 45</b> - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio CCD1 com uma ampliação de 50x. ....	63
<b>Figura 46</b> - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio CCD1: a) Ampliação de 2000x e b) ampliação 1000x. ....	64
<b>Figura 47</b> – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	64
<b>Figura 48</b> - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio CCD2 com uma ampliação de 100x. ....	65
<b>Figura 49</b> - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio CCD2 com uma ampliação de 3000x. ....	65
<b>Figura 50</b> – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	66
<b>Figura 51</b> - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio CCD3 com uma ampliação de 650x. ....	67
<b>Figura 52</b> - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio CCD3 com uma ampliação de 1500x. ....	67

<b>Figura 53</b> – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	68
<b>Figura 54</b> - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio CCD7 com uma ampliação de 100x. ....	69
<b>Figura 55</b> - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio CCD7 com uma ampliação de 3000x. ....	69
<b>Figura 56</b> – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	70
<b>Figura 57</b> - Representação dos espectros de infravermelho do ácido fusídico micronizado obtido para cada ensaio CCD efetuado. ....	71
<b>Figura 58</b> - Comparação entre os espectros de infravermelho do ácido fusídico micronizado obtido no ensaio CCD5 e CCD6. ....	71
<b>Figura 59</b> - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 1: a) Ampliação de 1000x e b) ampliação 5000x. ....	i
<b>Figura 60</b> - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	i
<b>Figura 61</b> - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 2: a) Ampliação de 100x e b) ampliação 3000x. ....	ii
<b>Figura 62</b> - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	ii
<b>Figura 63</b> - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 4: a) Ampliação de 100x e b) ampliação 3000x. ....	iii
<b>Figura 64</b> - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	iii
<b>Figura 65</b> - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 5: a) Ampliação de 100x e b) ampliação 3000x. ....	iv
<b>Figura 66</b> - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	iv
<b>Figura 67</b> - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 6: a) Ampliação de 75x e b) ampliação 1000x. ....	v
<b>Figura 68</b> - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	v
<b>Figura 69</b> - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 7: a) Ampliação de 1500x e b) ampliação 3000x. ....	vi

<b>Figura 70</b> - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	vi
<b>Figura 71</b> - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 8: a) Ampliação de 750x e b) ampliação 1000x.....	vii
<b>Figura 72</b> - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	vii
<b>Figura 73</b> - Imagens de SEM da amostra obtida na repetição 1: a) Ampliação de 750x e b) ampliação 3000x.....	viii
<b>Figura 74</b> - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	ix
<b>Figura 75</b> - Imagens de SEM da amostra obtida na repetição 2: a) Ampliação de 750x e b) ampliação 3000x.....	ix
<b>Figura 76</b> - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	x
<b>Figura 77</b> - Imagens de SEM da amostra obtida na repetição 3: a) Ampliação de 750x e b) ampliação 3000x.....	x
<b>Figura 78</b> - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	xi
<b>Figura 79</b> - Imagens de SEM da amostra obtida na repetição 4: a) Ampliação de 1000x e b) ampliação 3000x.....	xi
<b>Figura 80</b> - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem. ....	xii
<b>Figura 81</b> - Imagens de SEM da amostra obtida na repetição 1: a) Ampliação de 300x e b) ampliação 3000x.....	xiii
<b>Figura 82</b> - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem para a repetição 1.....	xiv
<b>Figura 83</b> - Imagens de SEM da amostra obtida na repetição 2: a) Ampliação de 100x e b) ampliação 1500x.....	xiv
<b>Figura 84</b> - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem para a repetição 2.....	xv
<b>Figura 85</b> - Imagens de SEM da amostra obtida na repetição 3: a) Ampliação de 100x e b) ampliação 1500x.....	xv
<b>Figura 86</b> - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem para a repetição 3.....	xvi

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> – Ordens de grandeza das propriedades termofísicas dos fluidos supercríticos [10]. .....	6
<b>Tabela 2</b> – Temperatura e pressão crítica de diversos fluidos supercríticos [10]. .....	7
<b>Tabela 3</b> – Esquema de códigos para o FFD do Ácido Fusídico. ....	25
<b>Tabela 4</b> – Matriz FFD com 4 fatores de estudo e 1 fator de resposta obtido pelo Design Expert 10, tamanho médio de partícula e respetivo desvio padrão. ....	27
<b>Tabela 5</b> – Resultados obtidos na análise ANOVA para o fator de resposta tamanho de partícula.....	59
<b>Tabela 6</b> – Valores do modelo após a análise ANOVA.....	59
<b>Tabela 7</b> – Coeficientes de cada fator em estudo e o erro associado.....	60
<b>Tabela 8</b> – Matriz CCD com 2 fatores de estudo e 1 fator de resposta obtido pelo Design Expert 10, tamanho médio de partícula e respetivo desvio padrão. ....	61
<b>Tabela 9</b> - Resultados obtidos na análise ANOVA para o fator de resposta tamanho de partícula.....	74
<b>Tabela 10</b> - Valores do modelo após a análise ANOVA.....	74
<b>Tabela 11</b> - Coeficientes de cada fator em estudo e o erro associado.....	75
<b>Tabela 12</b> - Soluções obtidas através da otimização do modelo. ....	76
<b>Tabela 13</b> - Tamanhos de partícula e desvio padrão associado a cada uma das repetições do ensaio 9.....	viii
<b>Tabela 14</b> - Tamanhos de partícula e desvio padrão associado a cada uma das repetições do ensaio CCD7. ....	xiii

## **Lista de Abreviaturas**

API - Ingrediente farmacêutico ativo

CCD – *Central Composite Design*

DOE – *Design of Experiments* (Desenho Experimental)

FFD – *Fractional Factorial Design*

FTIR – Espectroscopia de infravermelhos

NTA - *Nanoparticle Tracking Analysis*

Pc – Pressão crítica

PGSS - Precipitação de soluções saturadas em gás

RESS - Expansão rápida de soluções supercríticas

SAA - Atomização assistida supercrítica

SAS – Anti-solvente supercrítico

SEM – Microscopia Eletrônica de varrimento

Tc – Temperatura crítica



## **1. Objetivo**

O objetivo deste trabalho final de mestrado é utilizar o processo de micronização por anti-solvente supercrítico (SAS) para obter partículas de um ingrediente farmacêutico ativo com tamanho e morfologia adequados ao seu uso em formulações oftálmicas. Para tal, é utilizado o desenho experimental de forma a perceber que condições são mais favoráveis para a obtenção das partículas com tamanho e morfologia pretendidas.

O composto a estudar, ácido fusídico, é um antibiótico utilizado no tratamento de infecções dos olhos, pele e ossos. A sua utilização em colírios e suspensões para uso oftálmico exige que as partículas tenham tamanho inferior a 3 micron.

## 2. Introdução

### 2.1 Engenharia de Partículas

A engenharia de partícula é uma importante área uma vez que permite incorporar nas partículas dos ingredientes farmacêuticos ativos (API) especificações necessárias à formulação de fármacos como a estreita distribuição do tamanho de partícula, a dispersibilidade e biodisponibilidade otimizada, a não toxicidade e estabilidade, levando sempre em conta as especificações dos requisitos dos fármacos. É possível aumentar a biodisponibilidade do fármaco através da micronização do ingrediente farmacêutico ativo puro, modificando as características deste, como o tamanho e a sua natureza polimórfica. Um processo prático de engenharia de partículas tem que ser vantajoso para o fármaco final, economicamente viável na escala industrial requerida. Idealmente, a engenharia de partículas deve ser apta para reduzir a complexidade de manufatura e os custos associados à sua fabricação, bem como fornecer novas oportunidades para a produção contínua e sustentável ambientalmente [1, 2].

A partículas de ingredientes farmacêuticos ativos e não ativos existem na grande maioria dos produtos farmacêuticos sobre a forma de pó seco, dispersão líquida e semissólida, podendo variar entre nanocoloides e grânulos de tamanho milimétricos. Esta forma depende da dosagem e da via de administração do produto farmacêutico. O tamanho de partícula, a distribuição do tamanho e a sua morfologia definem algumas das principais características do produto e a sua análise é necessária para assegurar a qualidade do fármaco [3, 4].

O tamanho e a forma das partículas influenciam uma grande variedade de propriedades físicas importantes, a manufatura e a qualidade, incluindo,

- 1) Taxa de dissolução e biodisponibilidade do ingrediente farmacêutico ativo;
- 2) Libertação controlada e sustentada do fármaco;
- 3) Taxa de absorção e tempo de permanência, especialmente para aerossóis e sistemas coloidais projetados para a libertação direcionada de fármacos;
- 4) Propriedades relacionadas à estabilidade físico-química, bem como a uniformidade da composição;
- 5) Desempenho de formulações respiratórias;
- 6) Propriedades de fluxo, mistura e segregação de pós;
- 7) Granuloses de partículas sólidas em formulações mastigáveis, tópicas e oftálmicas [3].

A baixa solubilidade do fármaco e a sua taxa de dissolução inadequada são fatores desafiadores no desenvolvimento de drogas, juntamente com o facto de alguns fármacos também poderem apresentar baixa permeabilidade, absorção imprevisível e rápida metabolização ou excreção do metabolismo. Estes fatores levam a uma biodisponibilidade muito baixa que limitará a eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos comercializados. A utilização de diferentes tipos de nano-sistemas, como lipossomas, nanoemulsões, nanocomplexos e nanocristais, melhoram a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, de forma a direcionar os fármacos para o local desejado com maior precisão, controlar a sua libertação, melhorar o seu transporte através de barreiras biológicas, bem como permitir a utilização de vias de administração menos invasivas [5, 6, 7].

O desempenho das partículas é fortemente dependente das suas características, tendo o tamanho de partícula um papel importante. Normalmente, partículas entre 0,1 e 0,3  $\mu\text{m}$  são utilizadas para formulações intravenosas, entre 3 a 10  $\mu\text{m}$  são utilizadas para formulações tópicas, entre 1 e 3  $\mu\text{m}$  para formulações oftálmicas, entre 1 e 5  $\mu\text{m}$  para formulação pulmonar e entre 0,1 a 100  $\mu\text{m}$  para formulação oral [7].

A maioria das formulações intravenosas são produtos à base de soluções onde a análise de tamanho de partícula é efetuada tendo em conta o principal objetivo destas soluções, a deteção de contaminações, a precipitação do fármaco e a incompatibilidade de formulações. As partículas de tamanho superior a 1  $\mu\text{m}$  devem ser excluídas das formulações intravenosas, uma vez que poderão provocar embolia pulmonar e oclusão vascular, para além de diminuir a injetabilidade do fármaco. Partículas de maior tamanho ou a agregação destas pode levar a que ocorra um entupimento da agulha, desta forma o tamanho de partícula deverá ser, aproximadamente, um terço do diâmetro interno da agulha. O tamanho de partículas e a distribuição do tamanho das nanopartículas apresenta um papel fundamental na determinação da área de deposição e os efeitos terapêuticos após a administração do fármaco e a sua interação com a membrana celular e a penetração através das barreiras fisiológicas [3].

Na administração de medicamentos tópicos o tamanho das partículas é bastante crucial em formulações tópicas. Se o ingrediente farmacêutico ativo estiver suspenso o tamanho de partícula torna-se um regulador de fluxo, se o API tiver uma baixa solubilidade no veículo de suspensão a diminuição do tamanho de partículas pode promover o fornecimento do API aumentando a taxa de dissolução das partículas.

O tamanho de partícula influencia significativamente as vias de penetração cutânea, partículas com um tamanho maior a 10  $\mu\text{m}$  permanecem na superfície da pele,

partículas com tamanho entre 3 e 10  $\mu\text{m}$  conseguem penetrar os folículos capilares, apresentando uma maior concentração nessa região, e partículas com tamanho menor que 3  $\mu\text{m}$  conseguem penetrar os folículos capilares e a camada córnea da pele [3].

O tamanho de partícula para formulações óticas é essencial para o equilíbrio entre a taxa de libertação de fármaco, a melhoria da biodisponibilidade, o conforto do paciente e a facilidade de utilização. Quando são formuladas corretamente, as partículas são retidas no canto do olho onde o fármaco é libertado a uma velocidade que não é nem muito rápida nem muito lenta, de forma a permitir a penetração nos tecidos oculares. As nanopartículas, de aproximadamente de 300 nm, sem bioadesão são eliminadas do local pré-corneano a uma velocidade muito elevada. As micropartículas, entre 1 e 3  $\mu\text{m}$ , são mais adequadas para que ocorra a libertação controlada do fármaco e a presença de partículas com tamanho superior a 25  $\mu\text{m}$  torna o fármaco menos tolerável podendo causar irritação no olho. O desenvolvimento destas formulações apresenta a desvantagem de a sua fabricação ser bastante complexa uma vez que o controlo de tamanho de partícula em larga escala é um grande desafio [3].

O desempenho dos dispositivos de inalação depende principalmente das características geométricas e aerodinâmicas da distribuição do tamanho de partículas, forma das partículas e dispersão do pó. Existem três mecanismos principais de deposição de aerossóis para a libertação pulmonar dos fármacos, a dissolução, a sedimentação e a depuração. As partículas abaixo de 5  $\mu\text{m}$  podem ser distribuídas nas vias aéreas menores e essa penetração correlaciona com a resposta clínica para o tratamento desse local. A fração de partículas com tamanho entre 1 e 2  $\mu\text{m}$  é a mais eficiente na deposição nos espaços aéreos alveolares ricos em capilares.

Embora partículas de menor tamanho apresentem maior deposição pulmonar, maior penetração das vias aéreas e maior deposição, as partículas de maior tamanho são mais eficazes e apresentam maior broncodilatação, indicando que as partículas variando entre 1 e 5  $\mu\text{m}$  conseguem depositar nas regiões brônquica e alveolar por sedimentação e apresentam uma maior penetração pulmonar [1, 3]. Partículas com um tamanho maior que 5  $\mu\text{m}$  colidem com as paredes das vias aéreas superiores ficando retidas na faringe ou na boca. As partículas de tamanho menor a 1  $\mu\text{m}$  podem permanecer suspensas no ar inspirado e expirado não chegando a atingir os pulmões [8].

Aerossóis extra finos, entre 1,1 e 2,1  $\mu\text{m}$ , têm melhor acesso ao pulmão distal, com menos deposição na orofaringe, e produzem mudanças benéficas na função pulmonar

distal. Os compostos de inalação devem ser direcionados para esta região distal da via aérea, sendo que as partículas de tamanho inferior a 1 e 5  $\mu\text{m}$  são mais desejáveis para o controlo anti-inflamatório. As nanopartículas são promissoras na libertação pulmonar devido à homogeneidade, ao aumento da eficácia das nano-suspensões e é possível depositar as nanopartículas em maior concentração levando a que a depuração fagocítica seja retardada. As nanopartículas de fármacos pouco solúveis em água têm uma taxa de dissolução mais alta e podem ter uma via de interação muito específica na traqueia e nas regiões alveolares [1, 3].

Para os sprays nasais os requisitos do tamanho de partícula são menos rigorosos e não estão bem estabelecidos. O tamanho ideal para a deposição na cavidade nasal é 10  $\mu\text{m}$ , contudo poderá variar entre 4,8 e 23  $\mu\text{m}$  [3].

O tamanho das partículas para formulações orais encontra-se entre 100 e 200  $\mu\text{m}$ , devido ao comportamento de compactação associado aos comprimidos e às propriedades de transporte de pó. As partículas com um tamanho menor, entre 20 e 50  $\mu\text{m}$ , são utilizadas para comprimidos mastigáveis e para desintegrações rápidas, onde as características de dissoluções controladas e a moagem são importantes. A melhoria da biodisponibilidade de formulações orais com fármacos insolúveis em água pode ser conseguida através da utilização de nanopartículas, através da sua maior eficiência de libertação e do aumento do tempo de residência [3].

## 2.2 Micronização

A preparação de partículas para aplicações farmacêuticas é realizada por moagem, evaporação, *spray drying*, técnicas que utilizam dióxido de carbono supercrítico, tecnologias criogénicas e nanomilling [7, 9].

A moagem utiliza força mecânica para formar as partículas de menor tamanho, normalmente entre 1 e 100  $\mu\text{m}$ . Este método é bastante económico, contudo não é possível controlar o tamanho de partícula, forma e morfologia, levando a que exista uma larga distribuição do tamanho médio de partícula. O método de evaporação de solvente apresenta duas grandes desvantagens, a larga distribuição do tamanho de partícula obtidas e a possibilidade de existir solvente residual nas partículas podendo levar à toxicidade do fármaco.

A técnica de *spray drying* produz pós através da geração de gotas atomizadas que são secas por ar quente. Esta é uma técnica rápida que alcança facilmente estreitas distribuições de tamanho de partícula entre 0,1 e 1000  $\mu\text{m}$ , contudo as elevadas

temperaturas utilizadas para efetuar a secagem poderão levar à degradação do ingrediente farmacêutico ativo.

As tecnologias criogênicas dependem da sublimação para produzir os produtos secos, através de condições de trabalho relativamente suaves, contudo neste processo não é possível controlar o tamanho de partícula, consome bastante energia e é um processo bastante demorado [7].

### 2.2.1 Fluidos Supercríticos

Os fluidos supercríticos apresentam características únicas que tornam estes fluidos solventes atraentes em muitos processos químicos, devido às propriedades termofísicas que apresentam, como a difusividade, tensão superficial e viscosidade.

A densidade do fluido supercrítico é idêntica à densidade dos líquidos, desta forma o poder solvente do fluido supercrítico é, também, semelhante ao dos líquidos e pode ser ajustado pelo controle da pressão e da temperatura. Por outro lado, a difusividade e a viscosidade, dos fluidos supercríticos assemelham-se a valores observados entre gases e líquidos, como é demonstrado na tabela 1 [10, 11].

**Tabela 1** – Ordens de grandeza das propriedades termofísicas dos fluidos supercríticos [10].

<b>Estado</b>	<b>Densidade (kg/m<sup>3</sup>)</b>	<b>Coefficiente de Difusão (m<sup>2</sup>/s)</b>	<b>Viscosidade (N s/m<sup>2</sup>)</b>
<b>Gás</b>	1-100	10 <sup>-4</sup> – 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup> – 10 <sup>-5</sup>
<b>Fluido Supercrítico</b>	250-800	10 <sup>-7</sup> – 10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-3</sup> – 10 <sup>-4</sup>
<b>Líquido</b>	800-1200	10 <sup>-8</sup> – 10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-2</sup> – 10 <sup>-3</sup>

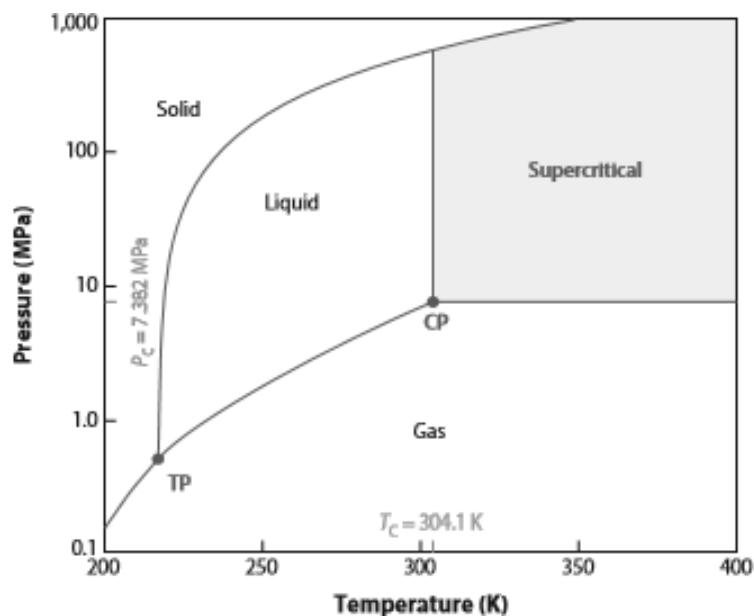
O fluido supercrítico caracteriza-se pela sua temperatura e pressão acima do ponto crítico. Para uma substância pura, o ponto crítico corresponde à temperatura e pressão mais alta a que um gás pode ser liquefeito. Acima deste ponto crítico, não ocorre separação de fases, deixando de haver tensão superficial. Os valores de temperatura crítica,  $T_c$ , e de pressão crítica,  $P_c$ , definem o ponto crítico que é característico de cada substância [11, 12].

Na tabela 2 encontra-se representado as temperaturas e pressões críticas de alguns fluidos supercríticos.

**Tabela 2** – Temperatura e pressão crítica de diversos fluidos supercríticos [10].

Fluido	$T_c$ (K)	$P_c$ (bar)
Etileno	282,4	50,4
Dióxido de carbono	304,1	73,8
Etano	305,4	48,8
Óxido nitroso	309,6	72,4
Propano	369,8	42,5
Etanol	513,9	61,4
Benzeno	562,1	48,9
Tolueno	591,8	41,0
Água	674,3	221,2

A figura 1 ilustra o diagrama de fases do dióxido de carbono, com a representação do ponto crítico. O dióxido de carbono é a substância mais utilizada para trabalhar em condições supercríticas devido às suas características.



**Figura 1** – Diagrama e fases do dióxido de carbono [9].

Os fluidos supercríticos possuem a particularidade de se comportarem como um meio hipercompressível perto do ponto crítico, o que leva a que pequenas alterações na pressão originem grandes alterações na densidade. Contudo, ao aumentar a pressão a uma temperatura constante, ao longo de uma isotérmica crítica, verifica-se que a

densidade apresenta valores melhorados comparando à densidade aparente do fluido homogêneo correspondente. A solubilidade de um soluto num solvente é influenciada pela interação entre moléculas, logo é influenciada pela densidade do solvente. Desta forma, deve-se esperar que um fluido supercrítico seja um mau solvente a densidades mais baixas e seja um bom solvente para densidades mais elevadas [10, 13].

O dióxido de carbono supercrítico é o fluido supercrítico mais utilizado, uma vez que é um solvente inerte, barato, facilmente disponível e não tóxico. Para além destas vantagens o dióxido de carbono supercrítico apresenta uma temperatura crítica (31 °C) e uma pressão crítica (73 bar) relativamente baixas, o que torna este fluido supercrítico ideal para o processamento de compostos termolábeis e torna, também, o processo economicamente mais viável, uma vez que o estado supercrítico é atingido sem ser necessário utilizar uma grande quantidade de energia [10, 11].

O dióxido de carbono está disponível em grande abundância, e apesar das grandes preocupações ambientais e do efeito de estufa associados ao CO<sub>2</sub>, a sua utilização é considerada uma alternativa ambientalmente viável. O dióxido de carbono utilizado nestes processos é reciclado, ou seja, a carga de CO<sub>2</sub> presente na atmosfera permanece inalterada [11, 12].

Devido ao seu comportamento não polar, o dióxido de carbono apresenta baixa afinidade para compostos polares. No entanto, é possível contornar esta baixa solubilidade adicionando um co-solvente, como a água, o etanol ou o metanol, de forma a conseguir aumentar o poder solvente do CO<sub>2</sub> em compostos polares [10].

O dióxido de carbono supercrítico pode ser utilizado como solvente, anti-solvente, soluto e um agente de dispersão, dependendo da pressão e temperatura que proporcionam ao fluido supercrítico propriedades diferentes [7].

#### **2.2.1.1 Expansão rápida de soluções supercríticas (RESS)**

Quando o dióxido de carbono supercrítico é utilizado como um solvente as partículas formam-se através da redução de pressão pelo processo de expansão rápida de soluções supercríticas (RESS) [7].

Para que este processo possa ser aplicado é necessário garantir que o fármaco seja solúvel no fluido supercrítico, sendo mais adaptado para pequenas moléculas e compostos apolares. Devido à baixa solubilidade em gases densos a pressões e temperatura mais baixas é, também, necessário garantir neste processo que a pressão

e a temperatura de trabalho são bastante elevadas. Uma vez que existem muitos polímeros e compostos farmacêuticos que são insolúveis em CO<sub>2</sub> supercrítico, o processo de RESS nem sempre é uma boa opção. Nestes casos, para aumentar a solubilidade do fármaco ou do polímero no fluido supercrítico é necessário adicionar um co-solvente orgânico, o que leva a que possam permanecer vestígios deste solvente nas partículas exigindo que se utilize um passo de secagem adicional [2, 9].

A solubilização do composto farmacêutico no fluido supercrítico é efetuada numa célula de alta pressão, onde o dióxido de carbono supercrítico entra no sistema em fluxo contínuo. A solução homogénea, entre o composto e o fluido supercrítico, sofre uma despressurização após a passagem pelo nozzle. Se a fase rica no fluido supercrítico estiver saturada, a supersaturação obtida após a despressurização será maior, o consumo total de fluido supercrítico será menor e a produtividade do processo aumenta [2, 9].

No RESS as partículas obtidas são muito finas com uma distribuição de tamanho de partícula bastante uniforme. A morfologia do material sólido resultante é dependente da temperatura, da queda de pressão e da geometria do nozzle, uma vez que o fluxo do fluido supercrítico é alterado por estes parâmetros [14, 15].

O processo RESS apresenta várias vantagens. Como a produção de partículas finas, o controlo da distribuição do tamanho de partícula através dos parâmetros operacionais variáveis e é um processo que não necessita de utilizar solventes. Contudo apresenta uma limitação visto que é necessário que o composto a micronizar seja solúvel no dióxido de carbono supercrítico, e grande parte dos compostos de interesse médico apresentam uma solubilidade muito baixa no CO<sub>2</sub> supercrítico [9, 15].

#### **2.2.1.2 Precipitação de soluções saturadas em gás (PGSS)**

A precipitação de soluções saturadas em gás (PGSS) é utilizada para micronizar sólidos que são não miscíveis no dióxido de carbono supercrítico. O principal requisito do PGSS é que a substância ou a mistura de substâncias a micronizar se apresentem numa forma pulverizável, que poderá ser alcançada por dissolução [9, 14].

No processo de PGSS o dióxido de carbono supercrítico é saturado no composto, esta solução contendo o gás é rapidamente expandida numa unidade de expansão e o gás é evaporado. Devido a esta evaporação e expansão do gás a solução arrefece a uma temperatura abaixo da temperatura de solidificação do soluto [9, 16].

Neste processo o gás é mais solúvel no líquido, por esse motivo é necessária uma quantidade menor de dióxido de carbono supercrítico para ser possível precipitar as partículas, sendo bastante importante estudar o equilíbrio sólido-líquido-gás para compreender a influência da alta pressão na temperatura de fusão sólida [14].

Comparando com o processo de expansão rápida de soluções supercríticas (RESS) o PGSS apresenta várias vantagens, como a utilização de temperatura e pressão de trabalho moderadas, o consumo baixo de CO<sub>2</sub> e fácil separação de partículas sólidas formadas na corrente de gás. No processo de PGSS existe um aumento da viabilidade económica devido aos baixos custos de investimento e baixos custos operacionais. Contudo, apresenta algumas desvantagens como a limitação de produzir partículas de tamanho micrométrico e a impossibilidade de produzir partículas submicrométricas [9].

### **2.2.1.3 Atomização Assistida Supercrítica (SAA)**

No processo de atomização assistida (SAA) a solução orgânica ou aquosa e o dióxido de carbono supercrítico formam um líquido expandido e a subsequente atomização leva à produção de nano-gotículas que dão origem, após secagem, a nanopartículas. Dependendo da temperatura do processo e das características do composto a micronizar, o processo SAA produz partículas amorfas ou cristalinas [15].

O objetivo deste processo é saturar a mistura com CO<sub>2</sub> supercrítico, adicionando assim um excesso de dióxido de carbono, em condições acima do ponto crítico da mistura. O CO<sub>2</sub> age como co-soluto melhorando a atomização que ocorre à pressão atmosférica num precipitador aquecido por N<sub>2</sub>, de forma a evaporar as gotículas formadas [14].

O mecanismo do processo de atomização assistida pode ser explicado de duas formas distintas, (1) a sequência de dois processos de atomização, onde o primeiro forma gotas primárias à saída do nozzle por atomização pneumática e no segundo processo ocorre a quebra dessas gotas através da libertação rápida de CO<sub>2</sub> do interior das gotas; (2) A expansão do líquido antes da atomização é caracterizada pela redução da tensão superficial e da redução de viscosidade [14, 15].

Este processo apresenta algumas vantagens, sendo que é possível ter um melhor controle da distribuição do tamanho das partículas e a possibilidade de produzir partículas de menor dimensão. No entanto é necessário considerar a limitação deste processo em relação à temperatura elevada que é exigida, não sendo possível utilizar compostos termolábeis [14, 15].

#### **2.2.1.4 Anti-solvente Supercrítico (SAS)**

O tamanho de partícula e a distribuição do tamanho de partícula são parâmetros críticos na determinação da dissolução do composto farmacêutico em fluidos biológicos e apresentam um efeito significativo na biodisponibilidade dos compostos que possuem baixa solubilidade em água, para os quais a dissolução é o passo limitante para o processo de absorção.

A micronização com anti-solvente supercrítico (SAS) tem sido amplamente utilizado na precipitação de micro e nanopartículas de ingredientes farmacêuticos ativos e na coprecipitação de polímeros e substâncias ativas [17, 18].

No processo de anti-solvente supercrítico uma solução líquida, constituída por solvente orgânico no qual está dissolvido o soluto a precipitar, é pulverizada através de um nozzle de forma a gerar gotas. Este processo que favorece a rápida difusão do fluido supercrítico nessas gotas, que por sua vez se dissolve no solvente, levando a uma elevada e rápida supersaturação do soluto e conseqüente precipitação como pó micronizado. Neste processo é necessário respeitar duas condições,

- 1) O solvente orgânico e o dióxido de carbono têm de ser miscíveis nas condições de trabalho;
- 2) O soluto a ser micronizado, o ingrediente farmacêutico ativo, tem de ser solúvel no solvente orgânico e insolúvel na mistura formada pelo solvente orgânico e o dióxido de carbono [18, 19].

Devido a estas condições, o processo SAS não poderá ser aplicado à precipitação de compostos solúveis em água, devido à baixa solubilidade da água no dióxido de carbono [20].

No final da injeção da solução líquida, o CO<sub>2</sub> supercrítico puro continua a fluir para lavar/secar a câmara do vaso de precipitação, eliminando a solução formada pelo solvente orgânico e o anti-solvente supercrítico. Este passo é fundamental para evitar que ocorra condensação da fase líquida dentro do vaso de precipitação, que poderia levar à solubilização ou à alteração do pó micronizado [20, 21].

O poder solvente do anti-solvente supercrítico é dependente da pressão, o que permite que o solvente orgânico e o fluido supercrítico sejam completamente separados por depressurização, que provoca a sua passagem ao estado gasoso [22].

O processo de anti-solvente supercrítico apresenta diversas vantagens como processo de micro e nanoprecipitação, uma vez que a utilização de fluidos supercríticos promove uma maior qualidade do produto em termos de pureza e de características dimensionais,

uma maior sustentabilidade ambiental e a possibilidade de ajustar as suas propriedades alterando as condições experimentais [19, 23].

A utilização de dióxido de carbono supercrítico como o anti-solvente permite que os produtos sejam obtidos em condições de trabalho moderadas, uma vez que a sua temperatura e pressão crítica são relativamente baixas,  $T_c = 31\text{ °C}$  e  $P_c = 73\text{ bar}$ , permitindo a micronização de compostos termolábeis. O dióxido de carbono apresenta ainda a vantagem de ser não-inflamável, não tóxico, inerte e ser um composto de baixo custo.

As vantagens da utilização dos fluidos supercríticos para a micro e nanoprecipitação são bastante aliciantes para a indústria farmacêutica, onde a produção de produtos de alto valor acrescentado poderá tornar-se economicamente viável [19, 23].

#### **2.2.1.4.1 Morfologias**

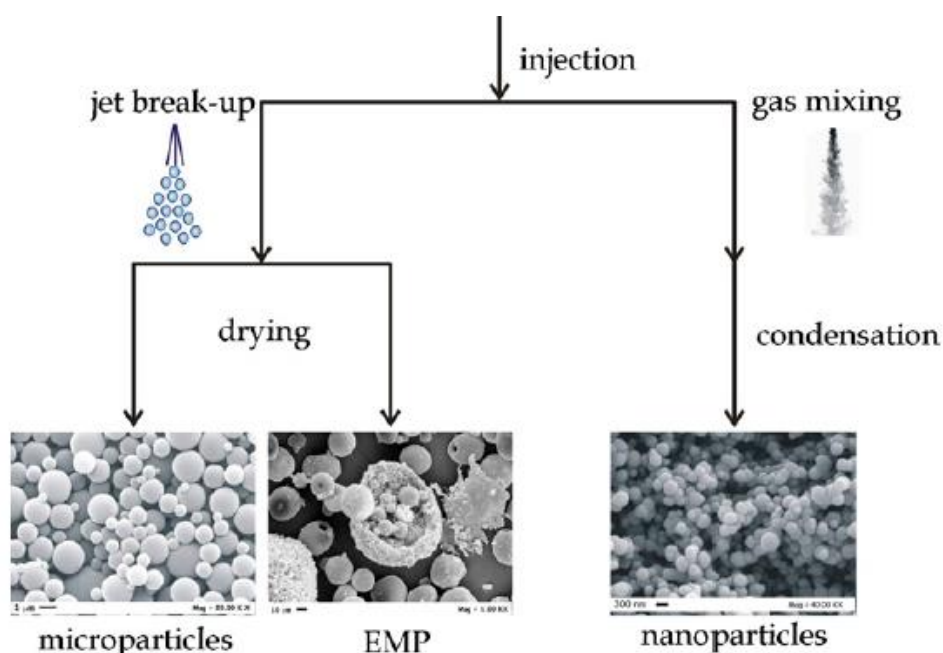
Como referido anteriormente, é possível obter diferentes tipos de morfologias através do processo de micronização por anti-solvente supercrítico. O processo SAS promove a rápida difusão do fluido supercrítico na solução do composto a micronizar dissolvido no solvente orgânico, levando a um elevado grau de saturação que promove a precipitação de micro e nanopartículas [24].

As obtenções das diferentes morfologias no SAS podem ser explicadas pela interação entre a transferência de massa e a dinâmica de fluidos comparando duas características, (1) o tempo de rutura do jato no nozzle, formação de gotículas seguida da secagem por  $\text{CO}_2$  supercrítico e (2) o tempo de desaparecimento da tensão superficial dinâmica criada na difusão do anti-solvente supercrítico com o solvente orgânico [18, 21].

Ilustrando estes dois tempos, o tempo de rutura do jato no nozzle e o tempo de desaparecimento da tensão superficial dinâmica, verifica-se que quando a quebra do jato prevalece, ou seja quando o tempo de rutura é superior ao tempo de desaparecimento da tensão superficial, formam-se gotas líquidas que produzem partículas micrométricas após a extração do solvente orgânico do vaso: Por outro lado quando a mistura de gás se desenvolve à saída do nozzle, sem ocorrer a quebra do jato, ou seja, quando o tempo de rutura é inferior ao tempo de desaparecimento da tensão superficial, ocorre a precipitação de partículas nanométricas [21].

As gotas líquidas formadas quando o tempo de ruptura é superior ao tempo de desaparecimento da tensão superficial apresentam um diâmetro dependente, principalmente, do número de Reynolds, da viscosidade, da tensão superficial e das condições de operação do processo, como a pressão e a temperatura. As partículas esféricas micrométricas derivam de gotas líquidas micrométricas. A rápida difusão do fluido supercrítico na fase líquida produz a precipitação do sólido micronizado, que apresentam uma morfologia esférica amorfa de diâmetro idêntico ao da gota formada originalmente. As gotas líquidas estão sujeitas a um aumento de volume devido à difusão do fluido supercrítico no interior dessa gota, contudo a sua forma e volume é mantida devido à sua tensão superficial.

A mistura de gás formado no jato à saída do nozzle ocorre quando condições completamente miscíveis para o sistema solvente-anti-solvente são atingidas, nunca ocorrendo formação de gotas líquidas, uma vez que, a tensão superficial desaparece antes que ocorra a quebra do jato. Nesta mistura de gás ocorre a nucleação dos sólidos a micronizar e o seu possível crescimento [21, 25]. A figura 2 mostra em síntese os mecanismos mencionados.



**Figura 2** - Síntese dos mecanismos de precipitação de partículas amorfas. EMP – Micropartículas expandidas [25].

Estes diferentes mecanismos de obtenção de micro e nanopartículas são afetados pela variação de pressão e temperatura de trabalho, uma vez que a quebra do jato depende, não só da pressão, mas também da densidade, viscosidade e tensão superficial.

O desaparecimento da tensão superficial dinâmica depende do seu valor inicial na solução, com o composto a micronizar, a injetar no sistema e da sua evolução durante a difusão entre solvente com o anti-solvente supercrítico. Durante este processo de difusão ocorre a formação de gradientes de concentração na fase líquida que podem condicionar o tempo de desaparecimento da tensão superficial. Esta evolução dinâmica está diretamente relacionada com a pressão do processo, sendo mais rápida quando o processo se encontra a uma maior pressão.

A temperatura do processo, por outro lado, apresenta um efeito contrário ao verificado pela pressão. O ponto crítico da mistura anti-solvente supercrítico-solvente líquido move-se para pressões mais altas à medida que a temperatura aumenta, fazendo com que a distância, em pressão, entre o ponto crítico da mistura e o ponto de operação do processo diminua. Assim sendo, os resultados relacionados à pressão e à temperatura podem ser explicados através da alteração da posição do ponto de operação do processo e do ponto crítico da mistura no diagrama de equilíbrio vapor-líquido devido ao aumento da temperatura. Estas alterações levam a conseqüentes mudanças nos tempos de quebra do jato à saída do nozzle e no tempo de desaparecimento da tensão superficial dinâmica [21].

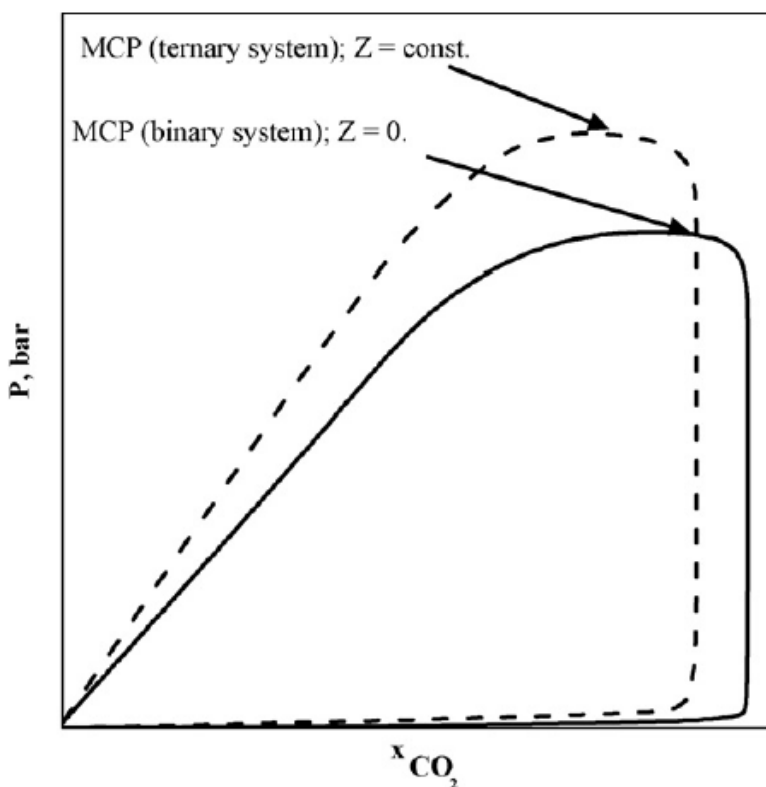
A formação de micropartículas cristalinas com uma variação alargada de tamanhos na casa dos micrómetros, pode ser explicado por dois métodos diferentes, (1) solutos com uma cinética de cristalização muito rápida e (2) um mecanismo idêntico à cristalização líquida.

No caso dos solutos com uma cinética de cristalização muito rápida, normalmente caracterizados pelo seu baixo peso molecular, verifica-se, durante o processo de secagem das gotas líquidas e a formação do sólido micronizado, que o processo de cristalização se sobrepõe à precipitação, criando micropartículas cristalinas. Estas partículas apresentam a particularidade de manter a sua forma esférica, contudo é formada uma superfície rugosa ou uma estrutura cristalina mais complexa.

No mecanismo idêntico à cristalização líquida, verifica-se que o soluto, que inicialmente não é solúvel do fluido supercrítico, pode tornar-se parcialmente solúvel na mistura formada no vaso de precipitação pelo fluido supercrítico e o solvente orgânico. Como consequência o equilíbrio líquido vapor do sistema binário anti-solvente-solvente poderá alterar-se, uma vez que a presença de um terceiro componente não poderá ser desprezada. Desta forma, a presença do soluto pode resultar na alteração do ponto crítico da mistura para pressões mais elevadas.

Neste caso, o soluto precipita-se por supersaturação, formando núcleos, nos quais os cristais podem crescer, de acordo com o mecanismo de cristalização líquida que é caracterizado pelo crescimento de cristais devido à difusão das moléculas de soluto da fase fluida e da sua migração na superfície dos cristais [25].

O comportamento geral do processo de anti-solvente supercrítico é condicionado pelo equilíbrio de fases do sistema solvente-soluto-anti-solvente. O comportamento de solubilidade de um sistema binário pode ser frequentemente alterado pela adição de um terceiro componente, ou seja, a adição deste terceiro componente irá mover o ponto crítico da mistura do sistema ternário para pressões mais elevadas, comparando com o sistema binário [18, 26]. O equilíbrio líquido vapor de um sistema binário e a sua alteração após a adição de um terceiro componente, encontra-se representado na figura 3.



**Figura 3** - Representação da mudança do equilíbrio líquido vapor de um sistema binário (linha contínua), quando um terceiro componente (Z) é adicionado (linha tracejada) em uma determinada concentração [26].

No entanto, para simplificar o mecanismo a presença do soluto foi quase sempre negligenciada durante a análise dos equilíbrios de fase associados ao processo SAS, ou seja, foi considerado que a presença do soluto não modifica o comportamento vapor-

líquido do sistema binário solvente-anti-solvente, considerando assim um sistema pseudo-binário [18].

#### **2.2.1.4.2 Estado de arte da micronização SAS**

A técnica de anti-solvente supercrítico é altamente versátil e por esse motivo é bastante procurada para a realização de micronização de compostos insolúveis em CO<sub>2</sub> supercrítico. Este processo é utilizado na micronização de ingredientes farmacêuticos ativos e demonstra que os compostos micronizados por SAS apresentam uma melhoria significativa na biodisponibilidade através da redução do tamanho de partícula e controle da morfologia [27].

Na última década têm sido realizados diversos trabalhos que incidem sobre o estudo do processo de micronização com anti-solvente supercrítico. Reverchon *et al.* [25] estudou o efeito das interações entre o equilíbrio líquido-vapor, as variações de tensão superficial, a transferência de massa e a nucleação na formação das diferentes morfologias obtidas no processo SAS. De Marco *et al.* [21] utilizou acetato de gadolínio dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) para estudar a dependência do tamanho e morfologia das partículas nos parâmetros do processo como pressão, temperatura e concentração da solução. Em ambos os estudos, os autores verificaram que as diferenças entre os tamanhos e morfologias das partículas obtidas resultavam de duas características que conseguem controlar o processo de precipitação, o tempo de ruptura do jato no nozzle e o tempo de desaparecimento da tensão superficial dinâmica. Marra *et al.* [28] considerou estas duas características e propôs um modelo matemático de forma a ser possível explicar as diferentes morfologias obtidas pelo SAS.

Campardelli *et al.* [18] estudou a influência do sistema ternário na morfologia das partículas obtidas por micronização com anti-solvente supercrítico e foi testado os limites do sistema pseudo-binário.

Recentemente, Prosapio *et al.* [29] analisou os mecanismos envolvidos na co-precipitação através da realização do processo SAS e verificou que o processo é bastante complexo, uma vez que as interações entre o polímero e o princípio ativo a pressões elevadas poderá alterar a forma como os compostos serão processados.

O processo de micronização com anti-solvente supercrítico pode ser aplicado a vários tipos de produtos, desde explosivos a fármacos, e o trabalho de investigação associado

à sua aplicabilidade recai na influência das condições operatórias nas características do produto final obtido.

Reverchon *et al.* realizou ao longo dos últimos anos diversos estudos de investigação na área de precipitação através da técnica SAS, como o estudo de precursores de supercondutores [30, 31, 32], biopolímeros [33] e antibióticos [34, 35, 36].

Kim *et al.* [37] estudou a os efeitos do processo SAS na micronização de Cilostazol, um fármaco que inibe a agregação de plaquetas e atua como um vasodilatador. Devido à baixa solubilidade e biodisponibilidade do fármaco o seu uso na indústria farmacêutica é bastante limitado, através da micronização do Cilostazol foi possível melhorar a sua taxa de dissolução e conseqüentemente a sua biodisponibilidade. Durante o estudo, os autores verificaram que o tamanho e a distribuição das partículas foram influenciados pela concentração da solução de Citostazol, contudo não ocorreu alteração da sua forma cristalina.

Tenorio *et al.* [17] e Montes *et.al* [24] utilizaram o desenho experimental para identificar os fatores significativos na precipitação de Amoxicilina com anti-solvente supercrítico. O desenho experimental foi efetuado com 7 fatores de estudo e 2 fatores de resposta, contudo os autores estudaram valores diferentes para cada um dos fatores. Após aplicado o desenho experimental as conclusões obtidas foram concordantes, ambos os autores verificaram que os fatores mais significativos para o processo são a concentração da solução inicial e o caudal de líquido a injetar no sistema.

Tenorio *et al.* [4] e Montes *et.al* [38] estudaram também a micronização e Ampicilina através do método SAS. Análogo ao estudo da Amoxicilina, neste o desenho experimental também foi utilizado para a obtenção dos fatores significativos do processo, utilizando o mesmo número de fatores de estudo e de resposta. Ambos os autores verificaram que a concentração da solução inicial era o fator mais significativo do processo, contudo Tenorio *et al.* otimizou os fatores em estudo e concluiu que para obter partículas de menor dimensão é necessário utilizar baixos valores de concentração e de caudal de injeção da solução líquida e valores relativamente altos de pressão e de temperatura.

Montes *et.al* [19] aplicou o desenho experimental à micronização de Quercetina. As pressões e temperaturas mais elevadas e as concentrações mais baixas favorecem a precipitação de partículas menores. Fernández-Ponce *et al.* [39] estudou a micronização a Quercetina utilizando como solvente orgânico o acetato de etilo e a coprecipitação com um polímero biocompatível. A micronização com anti-solvente supercrítico deu origem a uma diminuição de partícula bem como a uma diminuição da estrutura

cristalina da Quercetina. A coprecipitação apresentou resultados mais promissores, onde as partículas apresentavam formas quase esféricas com tamanhos de partícula inferiores aos obtidos no processo de micronização e rendimentos superiores.

Montes *et.al* [40] utilizou uma mistura de acetona com DMSO para dissolver a Quercetina na precipitação por anti-solvente supercrítico, onde se estudou a influência dos diferentes parâmetros no tamanho e distribuição das partículas. A conclusão obtida através deste estudo afirma que as partículas de menor tamanho são obtidas a pressão e temperaturas elevadas e a concentrações de solução líquida baixas.

Vorobei *et al.* [41] estudou o efeito do tipo de solvente e da concentração no tamanho de partícula e na morfologia de Arbidol. Foi verificado que o tamanho de partícula diminuía à medida que a concentração aumentava até a um certo valor limite, a partir desse limite os resultados invertem, esta inversão no tamanho de partícula é dependente do tipo de solvente orgânico utilizado no processo.

### 3. Técnica Experimental

#### 3.1 Materiais

Os ensaios de micronização foram realizados utilizando ácido fusídico fornecido pela *Sigma-Aldrich* (grau de pureza superior a 98%) e ácido fusídico fornecido pela *TCI Chemicals* (grau de pureza superior a 97%). O solvente utilizado para a realização dos ensaios foi a cetona pró-análise da *Sigma-Aldrich*. O CO<sub>2</sub> utilizado foi fornecido pela Air Liquide (pureza de 99,998%).

##### 3.1.1 Ácido Fusídico

O ácido fusídico (figura 4) é um composto de origem fúngica, que apresenta uma estrutura semelhante a um esteroide, e é o único antibiótico comercializado da família dos fusidanos [42, 43].

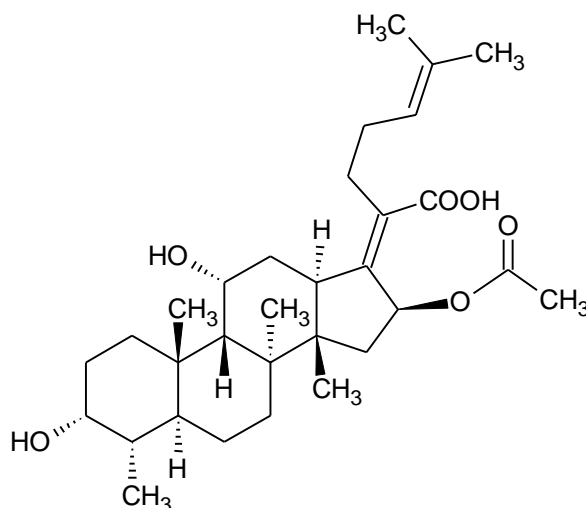


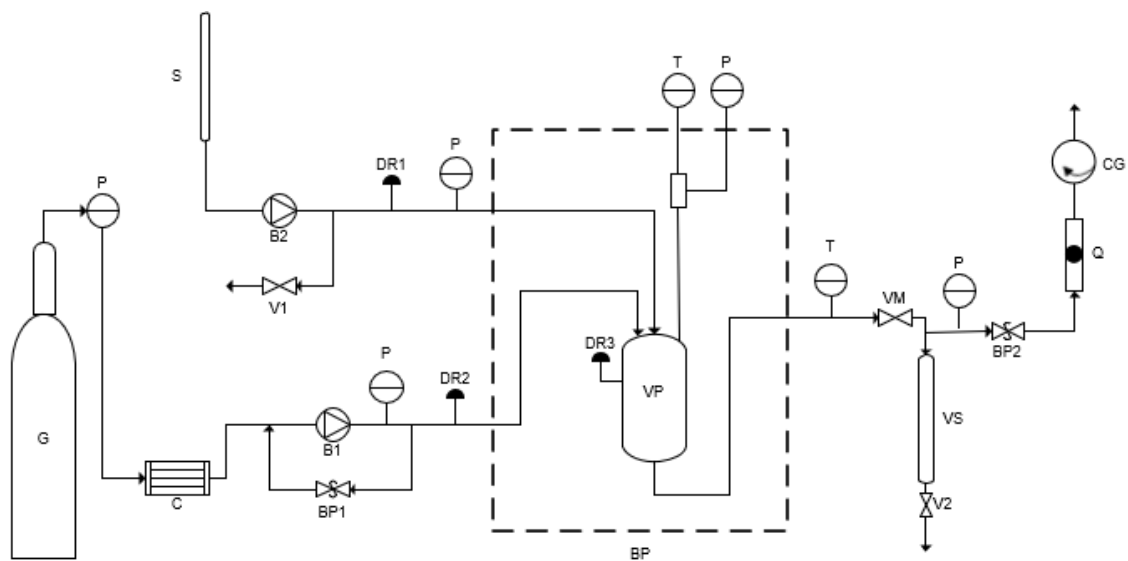
Figura 4 – Estrutura química do Ácido Fusídico.

O ácido fusídico é derivado da fermentação do *Fusidium coccineum* e é um antibiótico terapeuticamente útil, tendo alta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, principalmente causadas por *Staphylococcus* resistentes à meticilina, uma vez que apresenta uma baixa toxicidade. Quando o ácido fusídico se encontra em concentrações clinicamente relevantes apresenta um efeito bacteriostático, contudo pode funcionar como bactericida a concentrações muito elevadas [42, 44]. Para além destes efeitos, o ácido fusídico tem também uma ação quimioterapêutica devido à sua estrutura, similar a um esteroide, capaz de bloquear sínteses de proteínas [43, 45].

O ácido fusídico é um antibiótico frequentemente prescrito para infeções tópicas e oftálmicas e devido à alta resistência aos antibióticos, que as bactérias têm vindo a apresentar, o ácido fusídico transforma-se, assim, num antibiótico bastante valioso [46].

### 3.2 Descrição do Equipamento

Os ensaios de micronização foram realizados num equipamento que se encontra no Instituto Superior Técnico. O aparelho representado na figura 5 e 6 encontra-se descrito na literatura [47, 48].

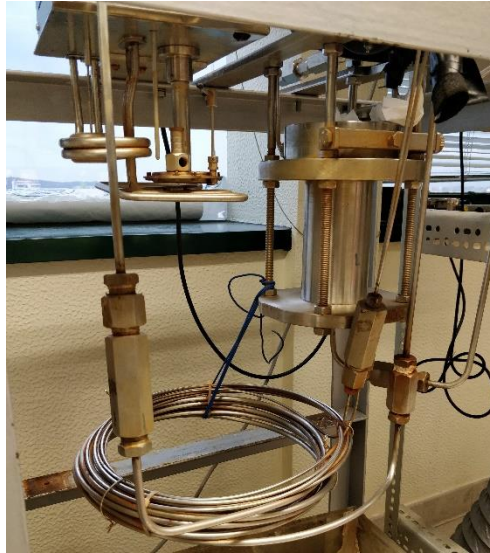


**Figura 5** – Diagrama esquemática do aparelho SAS. G, garrafa de CO<sub>2</sub> com tubo prolongador; S, bureta; C, condensador; B1 e B2, bombas de alta pressão; BP1 e BP2, reguladores de pressão; DR1, DR2 e DR3, discos de ruptura; BT, banho termostático; VP, vaso de precipitação; VM, válvula micrométrica; VS, vaso de recolha de solvente; V1 e V2, válvula; Q, medidor de caudal; CG, contador de gás; T, indicador de temperatura; P, indicador de pressão.



**Figura 6 –** Aparelho de micronização supercrítica.

O aparelho é constituído por um vaso de precipitação de alta pressão de aço inoxidável (figura 7) (VP), de 300mL de volume imerso num banho termostático (BT). O fundo do vaso de precipitação está equipado com um filtro de aço inoxidável, que permite a recolha do produto micronizado. Este vaso é alimentado por uma corrente de CO<sub>2</sub> e outra de solução líquida com a substância a micronizar, ambas mantidas à temperatura do vaso através da passagem pelo banho termostático. A temperatura do vaso é mantida por um termóstato (Tectron Bio, modelo Selecta) e medida, em conjunto com a pressão, através de um termopar e de um manómetro digitais (Omega Engineering, Inc.).



**Figura 7** - Vaso de precipitação de alta pressão de aço inoxidável.

A corrente de gás provém de uma garrafa de  $\text{CO}_2$  (G) e é refrigerada num banho de gelo antes de ser alimentada à bomba (Gilson) (B1), de forma a manter o  $\text{CO}_2$  no estado líquido. A pressão é controlada por uma válvula reguladora de pressão (Tescom) (BP1), que permite manter a pressão contante através da recirculação de  $\text{CO}_2$ , e medida por um manómetro analógico (Omega Engineering, Inc.).

A corrente da solução líquida provém de uma bureta (S) de onde é efetuada a injeção na bomba (Gilson) (B2) que pressuriza a solução até ao vaso, a pressão à saída da bomba é medida por um manómetro analógico (Omega Engineering, Inc.). A solução é injetada no topo do vaso através de um restritor de aço inoxidável com  $125\mu\text{m}$  de diâmetro interno.

A corrente de saída do vaso de precipitação passa por uma válvula micrométrica (Hoke) (VM), aquecida através de uma fita de aquecimento, que permite controlar o caudal de saída e onde ocorre a expansão da mistura supercrítica e a separação do  $\text{CO}_2$  e do solvente, que é recolhido no vaso de recolha do solvente (VS). Aqui o solvente é recolhido através da abertura da válvula do vaso (V2). A pressão é medida por um manómetro analógico (Omega Engineering, Inc.) e regulada por uma segunda válvula reguladora de pressão (Tescom) (BP2).

A corrente gasosa passa por um medidor de caudal (Omega Engineering, Inc.) (Q) e por um contador de gás (AMC) (CG).

### **3.3 Procedimento Experimental**

Os ensaios iniciam-se com o bombeamento do CO<sub>2</sub>, cujo caudal se mantém a 25 mL/min para todos os ensaios, até atingir a pressão de trabalho regulada pela válvula BP1. A pressão no vaso de expansão é, previamente, estabelecida a 30 bar através da regulação da válvula BP2.

Após estabilizar a pressão estabelece-se o caudal de saída pretendido por regulação da válvula micrométrica. Inicia-se, então, a injeção de uma quantidade previamente calculada de solvente orgânico, de forma a garantir o estado estacionário, seguida da injeção da solução com o composto a micronizar e, por fim, ocorre a injeção de um volume de solvente igual à tubagem (cerca de 19 mL).

Após finalizar a injeção o CO<sub>2</sub> continuará a passar pela célula, durante cerca de 75 minutos, de forma a permitir que todo o solvente ainda presente na célula seja arrastado, sobrando apenas o produto micronizado seco.

### **3.4 Caracterização das Amostras**

#### **3.4.1 Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)**

As amostras em pó são cobertas com 250 Å de ouro e foram observadas por um microscópio eletrónico de varrimento *Analytical JEOL 7001F FEG-SEM* equipado com um difrator de elétrons da *Oxford* do modelo *INCA 250 PREMIUM EBSD*.

#### **3.4.2 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)**

A análise do tamanho de partícula para as amostras que apresentavam partículas de tamanho mais pequeno foram realizadas utilizando o *NanoSight LM10* com o auxílio do software *NTA* versão 3.1 Build 3.1.45, fornecido pela *Nano Sight*.

*NanoSight LM10* permite medir partículas com um diâmetro compreendido entre 10nm e 2000nm. As medidas foram efetuadas através da injeção de uma suspensão em água Milipore com a amostra a analisar.

#### **3.4.3 Espectroscopia de Infravermelhos (FTIR)**

Os espectros de infravermelhos efetuados a cada uma das amostras obtidas por SAS foram realizados com recurso a um espectrofotómetro *Bruker*, modelo *Tensor27*, com o auxílio do software *OPUS* versão 5.5, fornecido pela *Bruker*.

A pastilha a ser analisada no espectrofotômetro é composta por uma quantidade mínima do produto a analisar que é misturada com brometo de potássio, KBr. A mistura dos dois compostos é moída e prensada para formar a pastilha que será inserida no espectrofotômetro.

#### **3.4.4 Difração por Raio-X**

Os difratômetros de Raio-X de cada amostra foram efetuados com recurso a um difratômetro *Bruker D8 ADVANCE Powder Diffractometer* com radiação de cobre na geometria de *Bragg Brentano*.

As amostras para serem analisadas têm de passar por um processo de uniformização utilizando um almofariz de ágata. Após este processo a amostra é depositada num porta amostras de vidro, que é introduzido no difratômetro.

#### **3.5 Desenho Experimental (DOE)**

O desenho experimental (DOE) é uma técnica que permite minimizar o trabalho experimental apresentando uma elevada eficácia no campo de fluidos supercríticos utilizados como anti-solventes [17].

O DOE é adequado para estimar os efeitos de todas as condições operacionais (fatores) nos resultados do processo (respostas). Assim, para um determinado sistema (API-solvente-CO<sub>2</sub> supercrítico) é possível identificar os principais fatores do processo SAS com o objetivo de controlar as características do produto final [4, 49].

O método “convencional” consiste em identificar os efeitos de um fator enquanto os restantes fatores são mantidos constantes, ou seja, é um processo onde se altera apenas um fator de cada vez verificando o seu efeito nas características do composto final. Embora este método apresente a vantagem de ser simples, exige que sejam realizados um grande número de ensaios experimentais. Por outro lado, o desenho experimental consiste em alterar simultaneamente os vários fatores, reduzindo o número de ensaios experimentais necessários e permitindo o estudo de um maior número de fatores [4, 49].

O desenho experimental é necessário para examinar os efeitos do processo e para obter uma maior precisão, neste método a grande vantagem é considerar os fatores responsáveis como um todo, sendo combinados uns com os outros. Levando em consideração o equipamento utilizado e os fatores que afetam o processo, escolheu-se

quatro fatores que influenciam os resultados experimentais: a temperatura, a pressão, a concentração da solução líquida e o caudal de injeção da solução líquida [2, 49].

O *Fractional Factorial Design* (FFD) IV ( $2^{4-1}$ ) é utilizado na fase inicial do trabalho experimental, com o objetivo de obter os fatores mais significativos para o sistema. Utilizando o desenho fatorial de dois níveis é possível obter uma matriz experimental de 8 ensaios (que ao efetuar o duplicado de cada ensaio e repetindo cinco vezes o ponto central origina 21 ensaios) ao contrário do método convencional, onde seria necessário realizar 16 ensaios (considerando as repetições no final seriam 32 ensaios).

O esquema de codificação (tabela 3) utilizado para descrever os níveis dos fatores é baseado nos sinais “+” e “-”, onde o sinal positivo representa o valor máximo e o sinal negativo representa o valor mínimo associado a esse fator. Os valores centrais de cada um dos fatores é descrito utilizando o número 0 (zero).

**Tabela 3** – Esquema de códigos para o FFD do Ácido Fusídico.

<b>Ensaio</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Pressão (bar)</b>	<b>Concentração da solução (mg/mL)</b>	<b>Caudal da solução (mL/min)</b>
<b>1</b>	-	-	-	-
<b>2</b>	+	-	-	+
<b>3</b>	-	+	-	+
<b>4</b>	+	+	-	-
<b>5</b>	-	-	+	+
<b>6</b>	+	-	+	-
<b>7</b>	-	+	+	-
<b>8</b>	+	+	+	+
<b>9</b>	0	0	0	0

Numa segunda fase, após ter conhecimento dos fatores significativos obtidos por FFD, é necessário realizar o Central Composite Design (CCD) onde se faz variar os fatores significativos mantendo constantes, num valor predefinido, os outros fatores do sistema. Através deste é possível otimizar os fatores através do Response Surface Methodology.

## 4. Resultados

### 4.1 Desenho Experimental

O desenho experimental é realizado com o auxílio do *software* estatístico *Design Expert 10*, no qual é efetuado primeiramente o *Fractional Factorial* (FFD) onde será explorado o intervalo experimental dos fatores, que influenciam a micronização do ácido fusídico através do processo SAS, sendo possível determinar quais os mais significativos. De seguida, estes fatores serão transferidos para o *Central Composite Design* (CCD) onde serão otimizados por *Response Surface Methodology* de forma a determinar as melhores condições experimentais para a resposta pretendida, o mínimo de tamanho de partícula. Os fatores que influenciam a micronização por anti-solvente supercrítico são a temperatura (T), a pressão (P), a concentração da solução com o ácido fusídico (C) e o caudal de injeção do solvente (Q).

#### 4.1.1 Fractional Factorial Design (FFD)

O *Fractional Factorial Design* (FFD), para determinar os fatores mais significativos que influenciam o tamanho de partícula do ácido fusídico micronizado, é efetuado com os quatro fatores de estudo, apresentados anteriormente, e com um fator de resposta, o tamanho médio de partícula. Para cada um dos fatores de estudo foi selecionado um valor máximo e mínimo, que foram escolhidos com bastante cuidado, tendo em conta o estado supercrítico do CO<sub>2</sub> e o caudal fixo de injeção deste no sistema. De acordo com outros estudos experimentais e com o equipamento utilizado a temperatura foi fixada entre 40 °C e 60 °C, a pressão entre 100 bar e 200 bar, a concentração entre 10 mg/mL e 40 mg/mL e o caudal de injeção de solvente entre 0,5 mL/min e 3 mL/min.

Para escolher estes valores é necessário ter em atenção o estado supercrítico do dióxido de carbono, uma vez que a T<sub>c</sub>=31 °C e a P<sub>c</sub>=73 bar. Assim sendo, a temperatura e a pressão a escolher, para realizar as medidas de micronização, teria de ser elevada o suficiente para garantir o estado supercrítico do anti-solvente, na mistura binária CO<sub>2</sub>/acetona, dentro do vaso, daí a escolha prevalecer sobre os 40 °C e os 100 bar. O valor máximo de temperatura é estabelecido de forma a preservar o ácido fusídico e prevenir a sua degradação enquanto que o valor máximo de pressão é escolhido com base em estudos anteriores [47, 48]. O caudal de injeção do solvente é selecionado consoante a fração molar de acetona existente na sua mistura com o CO<sub>2</sub> supercrítico dentro do vaso de precipitação. O caudal de injeção de CO<sub>2</sub> é mantido constante durante

as diferentes medidas, desta forma, para alterar as frações molares entre o dióxido de carbono e a acetona o caudal desta última varia entre 0,5 e 3 mL/min de forma a obter uma fração molar mínima e máxima em relação ao anti-solvente supercrítico.

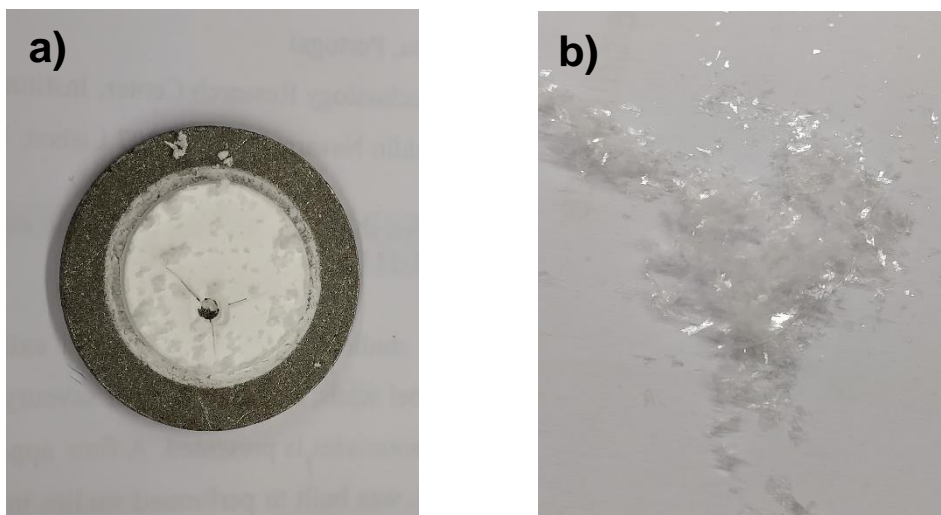
O desenho experimental por *Fractional Factorial* gerado pelo *Design Expert 10* originou uma matriz experimental com 9 medidas, sendo que cada uma é realizada em duplicado à exceção do ponto central que é repetido cinco vezes, originando no total 21 experiências, demonstrado na tabela 4.

**Tabela 4** – Matriz FFD com 4 fatores de estudo e 1 fator de resposta obtido pelo *Design Expert 10*, tamanho médio de partícula e respetivo desvio padrão.

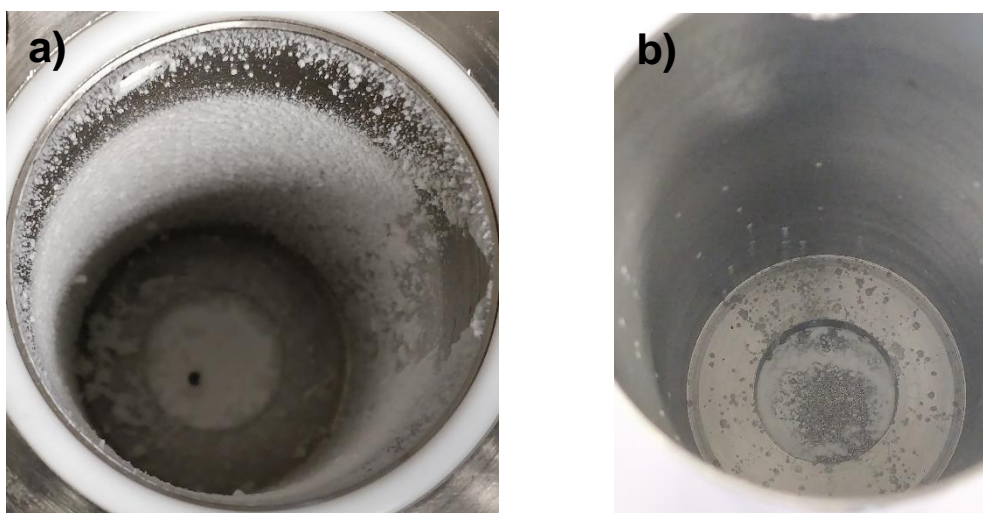
Ensaio	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Concentração da solução (mg/mL)	Caudal da solução (mL/min)	Tamanho médio de partícula (µm)	Desvio Padrão
1	40	100	10	0,5	0,158	0,061
					0,222	0,114
2	60	100	10	3	4,937	7,268
					9,008	7,928
3	40	200	10	3	Não ocorreu micronização	
4	60	200	10	0,5	5,939	4,493
					4,350	2,483
5	40	100	40	3	5,202	7,527
					4,377	6,342
6	60	100	40	0,5	13,987	22,058
					15,462	25,453
7	40	200	40	0,5	0,175	0,077
					0,193	0,116
8	60	200	40	3	5,366	23,196
					4,618	26,585
9	50	150	25	1,75	3,245	21,172
					5,545	22,203
					4,655	4,627
					4,620	5,435
					5,571	6,790

#### 4.1.1.1 Análise macroscópica

O ácido fusídico micronizado à saída do vaso apresenta, principalmente, dois tipos de aparência, cristais visíveis macroscopicamente e um pó branco bastante uniforme, figura 8. Quanto à sua distribuição no copo de precipitação, verifica-se que nos ensaios cujo rendimento é maior o pó encontra-se distribuído por toda a célula enquanto que nos experimentos cujo rendimento é menor o pó encontra-se principalmente concentrado no fundo da célula de precipitação, figura 9.



**Figura 8** – Recolha do ácido fusídico micronizado: Aspetto do produto obtido, a) Ensaio 1; b) Ensaio 8



**Figura 9** - Recolha do ácido fusídico micronizado: diferentes formas de precipitação no vaso, a) Ensaio 1; b) Ensaio 4

O rendimento obtido para cada uma das medidas estudadas afeta a distribuição e uniformização do ácido fusídico dentro do sistema de recolha. O rendimento do processo depende da solubilidade do ácido fusídico na mistura supercrítica CO<sub>2</sub> +acetona nas condições de pressão e temperatura pretendidas, ou seja, se a solubilidade do ácido fusídico no soluto que sai do precipitador for alta, significa que o soluto encontra-se dissolvido na corrente de saída não sendo possível precipitar e recolher o sólido, pois o sistema supercrítico CO<sub>2</sub> +acetona forma uma mistura na qual o ácido fusídico é muito solúvel.

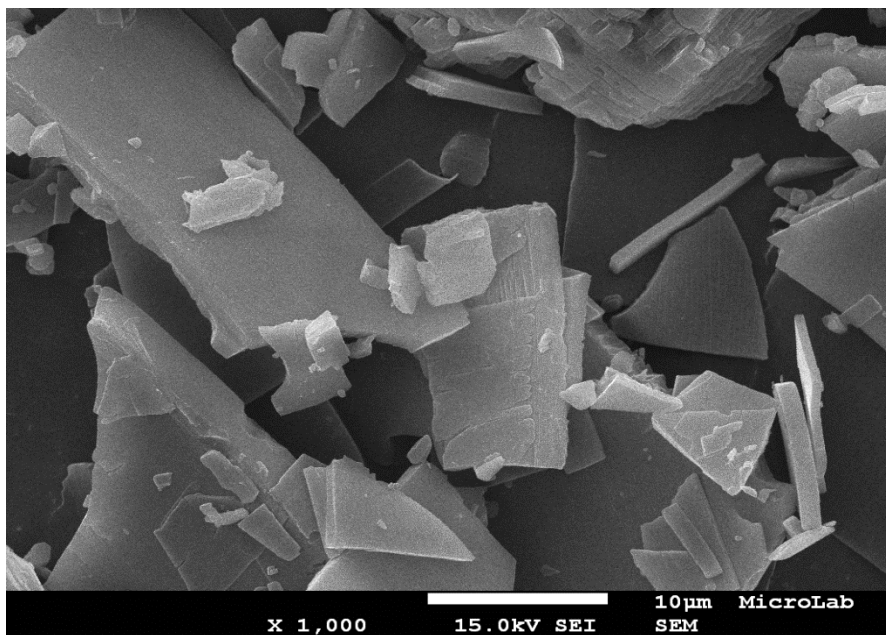
Durante a realização desta matriz verificou-se que para os caudais de 0,5 mL/min o rendimento obtido varia entre 25% e os 38%, sendo possível observar um rendimento superior quando os ensaios são efetuados às condições mínimas, 40 °C, 100 bar, 10 mg/mL e 0,5 mL/min, atingindo valores de aproximadamente 60%. Para os caudais de 3 mL/min verifica-se rendimentos muito menores podendo variar entre 0,52% e 30% e para o caudal intermédio, 1,75 mL/min, o rendimento obtido é de cerca de 30%.

É de salientar que no ensaio 3, a 40 °C, 200 bar e com um caudal de 3 mL/min não foi possível obter produto micronizado. Como referido, o rendimento do processo depende da solubilidade do ácido fusídico na mistura supercrítica CO<sub>2</sub> +acetona. Por sua vez, a solubilidade depende, também, da fração de co-solvente e da densidade do fluido, que se encontra relacionada com a temperatura e pressão de trabalho. Com o caudal de solução de 3 mL/min a fração de acetona na mistura supercrítica é elevada, cerca de 10%, levando a que a acetona desempenhe o papel de co-solvente o que resulta num aumento da solubilidade do ácido fusídico no fluido dentro do precipitador. Por outro lado, a densidade do CO<sub>2</sub> aumenta com a pressão e conseqüentemente a solubilidade do soluto também aumenta. Assim, a 200 bar a solubilidade do ácido fusídico na mistura supercrítica é superior à solubilidade verificada a 100 bar, levando a que o rendimento seja menor a 200 bar.

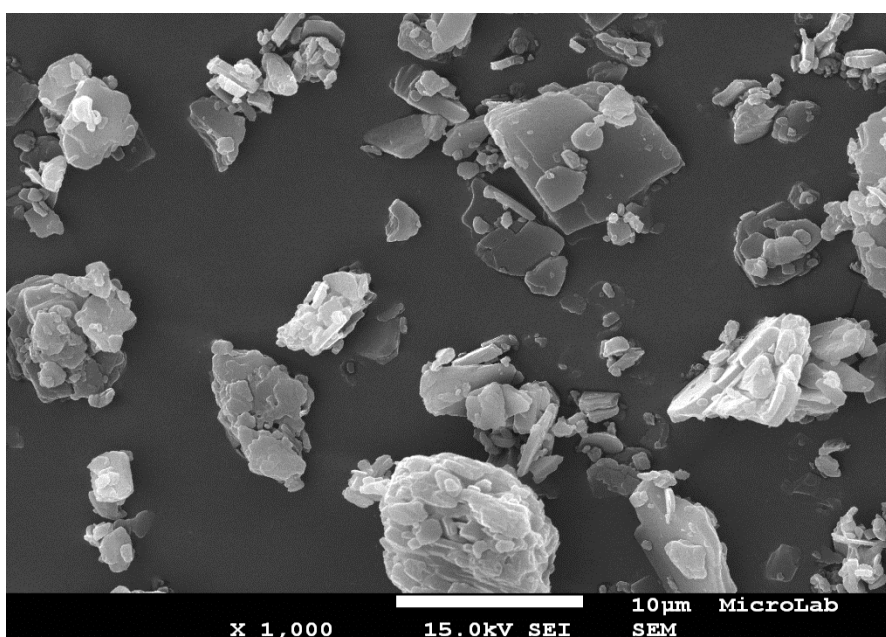
Uma vez que o caudal e a pressão deste ensaio são bastante elevados, poderá considerar-se que o rendimento associado a estas condições será muito baixo e por essa mesma razão seria mais difícil verificar a precipitação do composto no vaso. Em estudos futuros poderia ser vantajoso verificar se de facto a esta condição não ocorre a micronização, aumentando a quantidade do ingrediente farmacêutico ativo a injetar e verificando a viabilidade de obter produto micronizado.

#### 4.1.1.2 Análise microscópica

A análise microscópica do ácido fusídico micronizado e não processado foi efetuada por microscopia eletrônica de varrimento, SEM. Realizou-se a análise do ácido fusídico inicial de forma a possibilitar uma melhor comparação com os produtos micronizados e o produto inicial utilizado. Uma vez que as medidas foram realizadas com ácido fusídico de fornecedores diferentes, teve-se a necessidade de realizar esta análise aos dois produtos iniciais utilizados, figuras 10 e 11.



**Figura 10** – Imagem SEM do ácido fusídico fornecido pela *Sigma Aldrich* com ampliação de 1000 vezes.

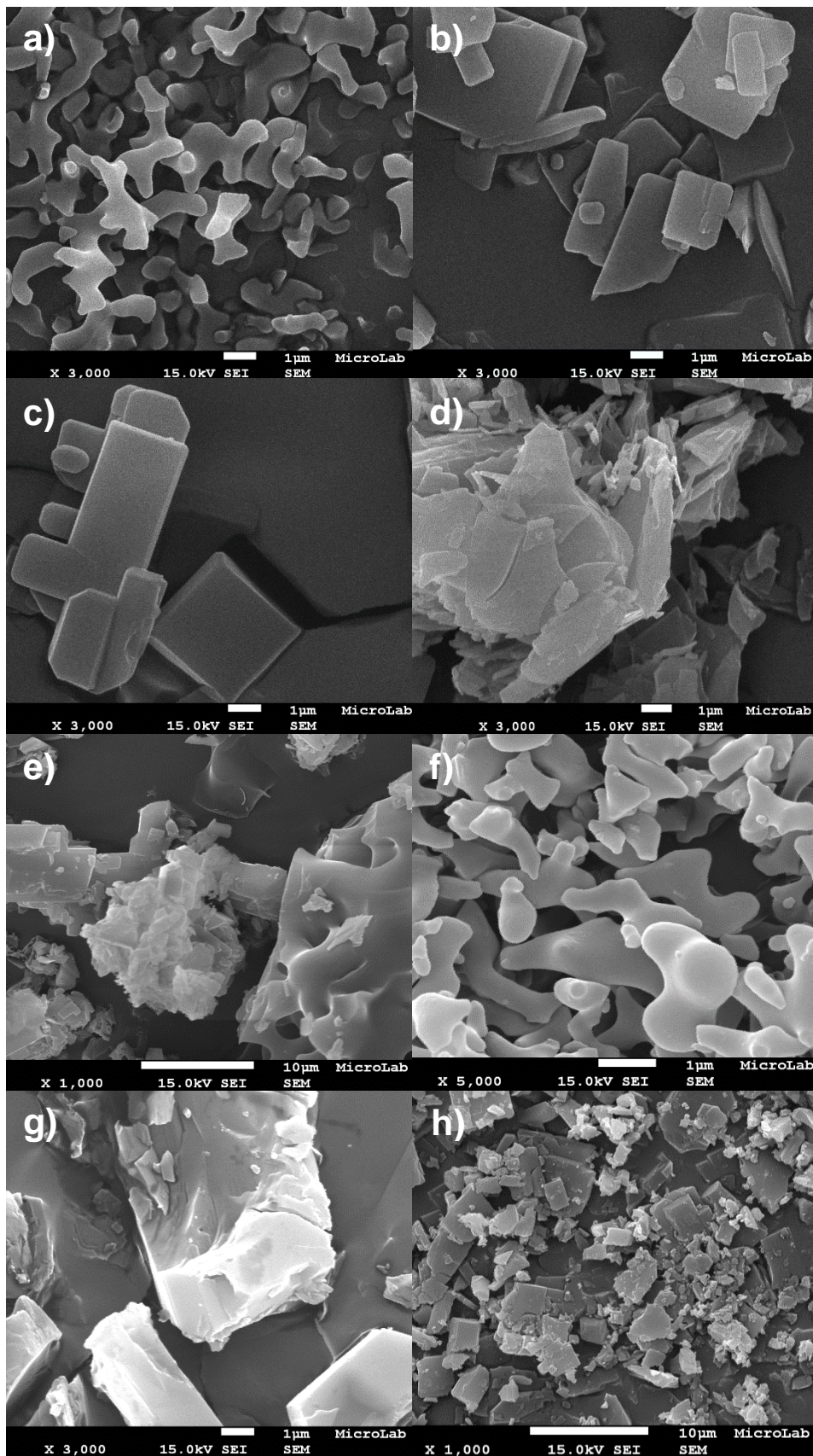


**Figura 11** – Imagem SEM do ácido fusídico fornecido pela *TCI* com ampliação de 1000 vezes.

Observando as figuras, é possível observar que o tamanho e a morfologia das partículas são bastante diferentes nos dois fornecedores. O ácido fusídico fornecido pela *Sigma Aldrich* apresenta um tamanho de partícula muito superior e a sua forma cristalina de arestas bem definidas, enquanto que o ácido fusídico fornecido pela *TCI* apresenta um tamanho de partícula menor, com uma distribuição mais uniforme, contudo a sua forma cristalina não apresenta as arestas bem definidas, existindo partículas arredondadas de aspeto rugoso.

O ácido fusídico micronizado é, também, analisado pelo SEM onde se verifica que as suas partículas apresentam morfologias bastante distintas, podendo ser partículas de dimensão muito pequena sem forma definida ou partículas com um maior tamanho que apresentam uma forma de arestas bem definidas. É de salientar que as partículas de menor dimensão e com forma não definida apenas foram verificadas nos ensaios 1 e 7, onde a temperatura e o caudal eram mais baixos.

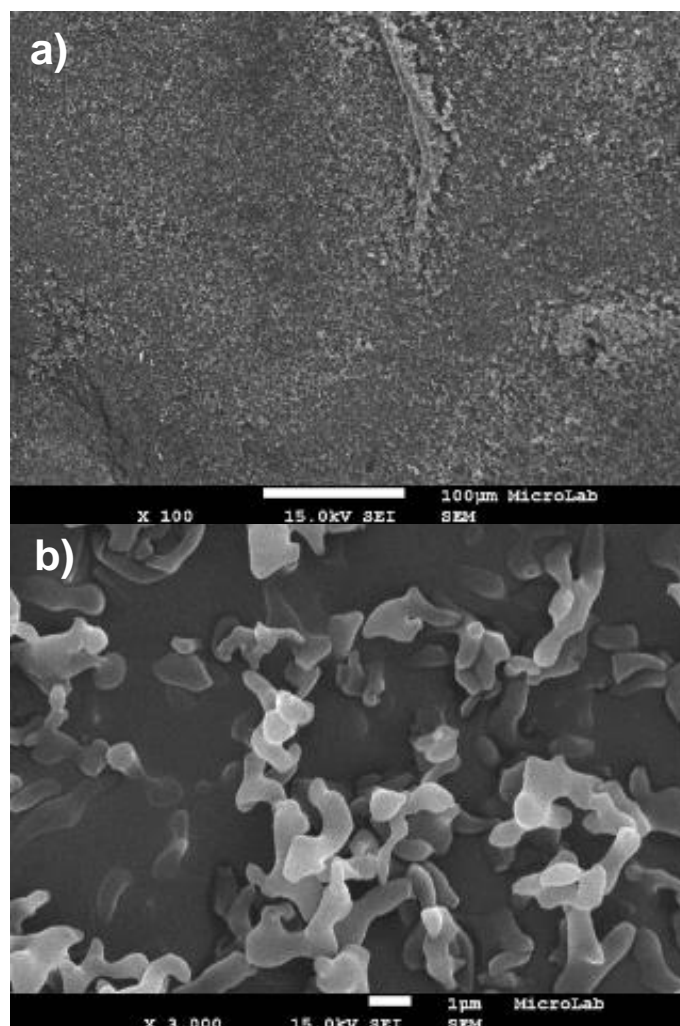
De seguida serão apresentadas as imagens de SEM (figura 12) e respetivos tamanho e distribuição de partículas, de forma a simplificar, tendo em conta que o tamanho de partícula não difere significativamente entre repetições, será apenas demonstrado as imagens e as distribuições para uma das repetições estando a outra representada nos Anexos.



**Figura 12** – Imagens SEM dos produtos micronizados obtido: a) Ensaio1; b) Ensaio 2; c) Ensaio4; d) Ensaio 5; e) Ensaio 6; f) Ensaio7; g) Ensaio 8; h) Ensaio 9.

### Ensaio 1 – 40 °C 100 bar 10 mg/mL 0,5 mL/min

No primeiro ensaio da matriz FFD estudaram-se os fatores mínimos associados ao Desenho Experimental. Na figura 13 encontra-se representado as imagens microscópicas das partículas obtidas. Estas apresentam uma forma arredondada, sem arestas definidas, e uma distribuição de tamanho uniforme, comparando com o ácido fusídico não processado verifica-se que o tamanho de partícula é bastante inferior, e a distribuição de tamanho de partícula é estreito. O composto micronizado apresenta maior uniformidade de tamanhos e de morfologia das partículas. Esta última é, também, muito diferente do ácido fusídico não processado, permitindo concluir que durante o processo de micronização por anti-solvente supercrítico a morfologia do ácido fusídico é alterado.

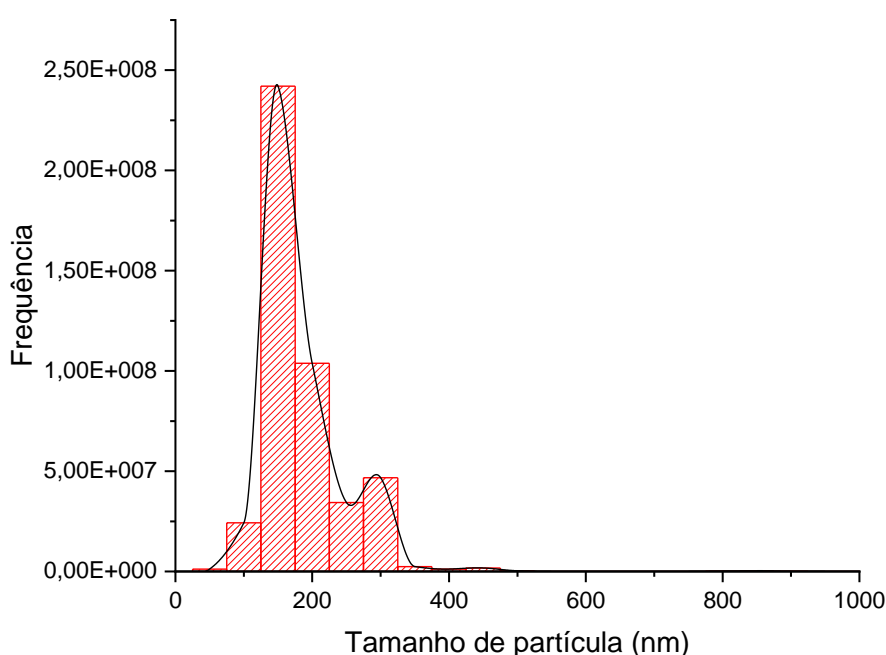


**Figura 13** - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 1: a) Ampliação de 100x e b) ampliação 3000x.

Na figura 13a) a ampliação de 100x permite mostrar com bastante detalhe a uniformidade do tamanho de partícula enquanto que a figura 13b) com a ampliação de 3000x permite compreender com melhor detalhe a morfologia da própria partícula.

De forma a determinar o tamanho de partícula e a distribuição de tamanhos de partícula para este ensaio foi utilizada a técnica *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA).

Este método permitiu obter o tamanho médio de partícula e o desvio padrão para estas condições experimentais, 0,158  $\mu\text{m}$  e 0,061  $\mu\text{m}$  respetivamente. A representação gráfica das contagens de partículas e respetivo tamanho, obtido pelo NTA, encontra-se representado na figura 14.



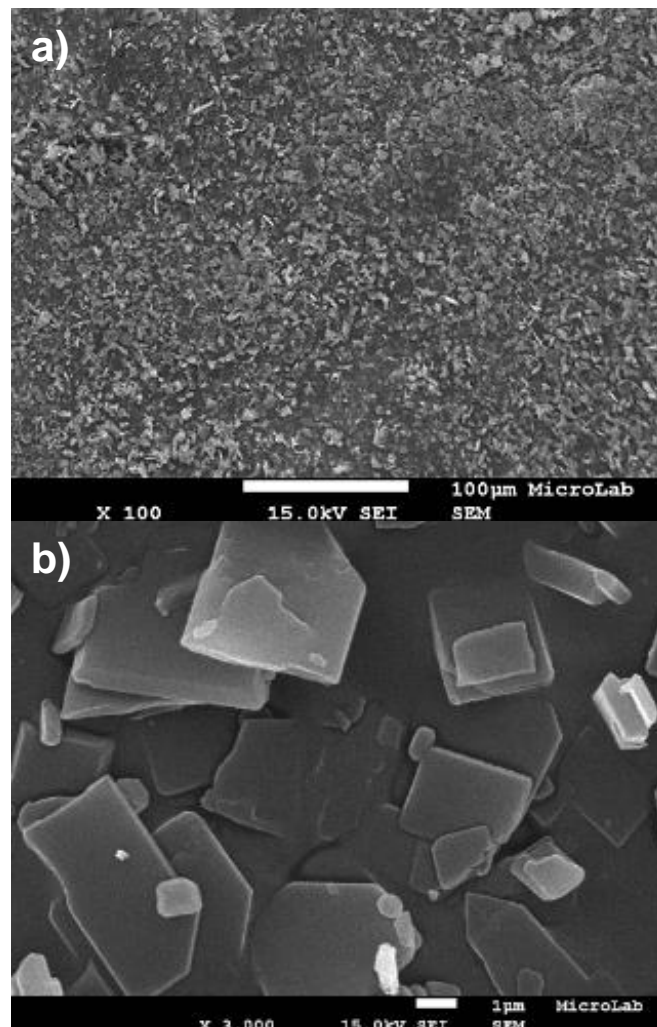
**Figura 14** – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

As imagens de SEM e respetiva distribuição de tamanho de partículas do duplicado efetuado para este ensaio da matriz encontra-se representado no Anexo A.

### **Ensaio 2 – 60 °C 100 bar 10 mg/mL 3 mL/min**

No segundo ensaio da matriz FFD, em detrimento do primeiro ensaio, alterou-se apenas a temperatura e o caudal para os valores máximos dos fatores. Na figura 15 encontra-se representado as imagens microscópicas das partículas obtidas. Estas apresentam uma forma com arestas bem definidas bastante semelhante ao ácido

fusídico não processado, e uma distribuição de tamanho uniforme. Comparando com o ácido fusídico não processado verifica-se que o tamanho de partícula é inferior, sendo que após ser micronizado a estas condições é obtida uma maior uniformidade entre os tamanhos.

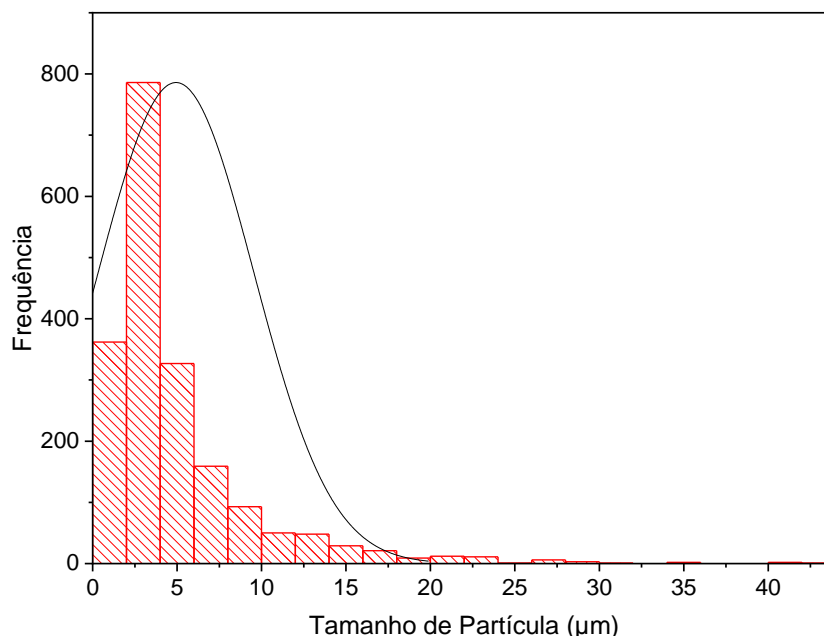


**Figura 15** - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 2: a) Ampliação de 100x e b) ampliação 3000x.

Na figura 15a) a ampliação de 100x mostra a uniformidade do tamanho de partícula enquanto que a figura 15b) com a ampliação de 3000x permite verificar a dimensão e a morfologia da própria partícula.

De forma a determinar o tamanho de partícula e a distribuição de tamanhos de partícula para este ensaio utilizou-se o software de análise de imagens *ImageJ*. Na análise de imagem realizada, dado que as partículas obtidas não são esféricas, aproximando-se de uma forma quadrangular ou retangular, considerou-se como medida do tamanho de partícula o diâmetro de ferret (a distância entre os dois pontos mais distantes de cada

partícula). Assim, o tamanho médio de partícula e o desvio padrão associado a estas condições experimentais são de 4,937  $\mu\text{m}$  e 7,268  $\mu\text{m}$  respectivamente. A representação gráfica das contagens de partículas e respetivo tamanho encontra-se representado na figura 16.



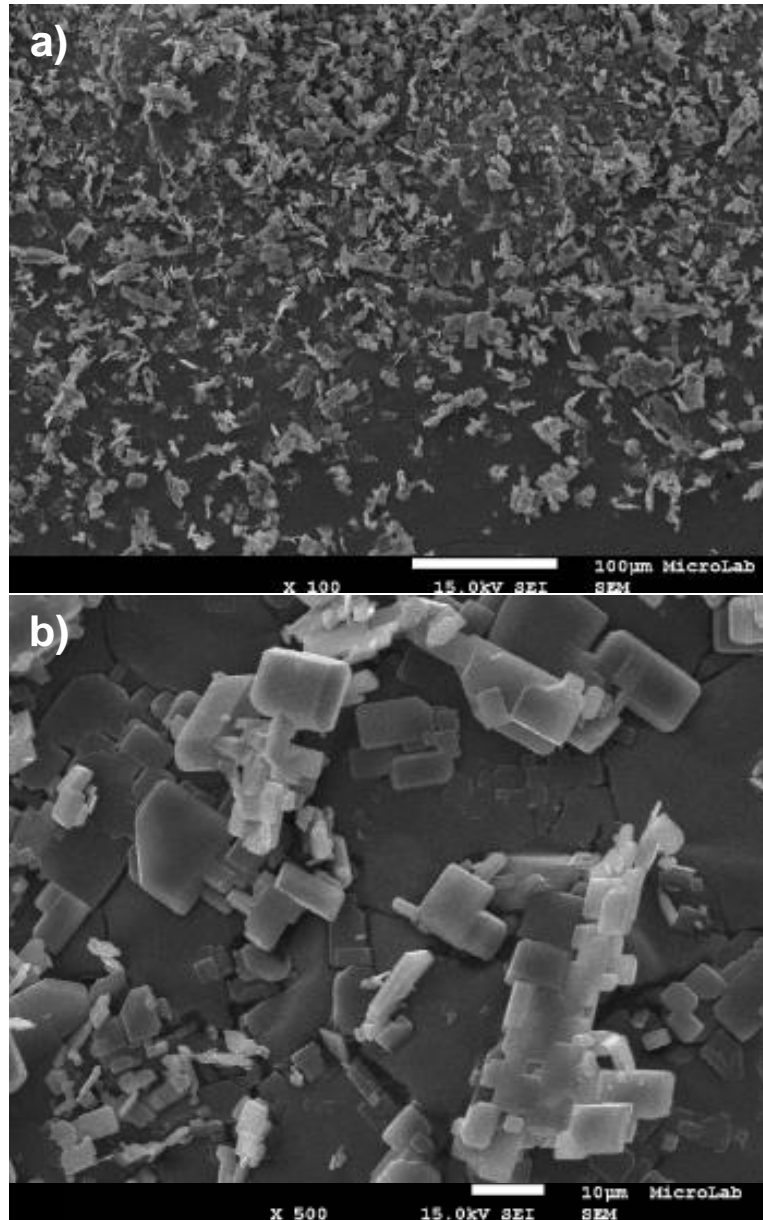
**Figura 16** – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

A representação da distribuição confirmou que a distribuição do tamanho de partícula é bastante uniforme. A repetição deste ensaio encontra-se representada no Anexo B.

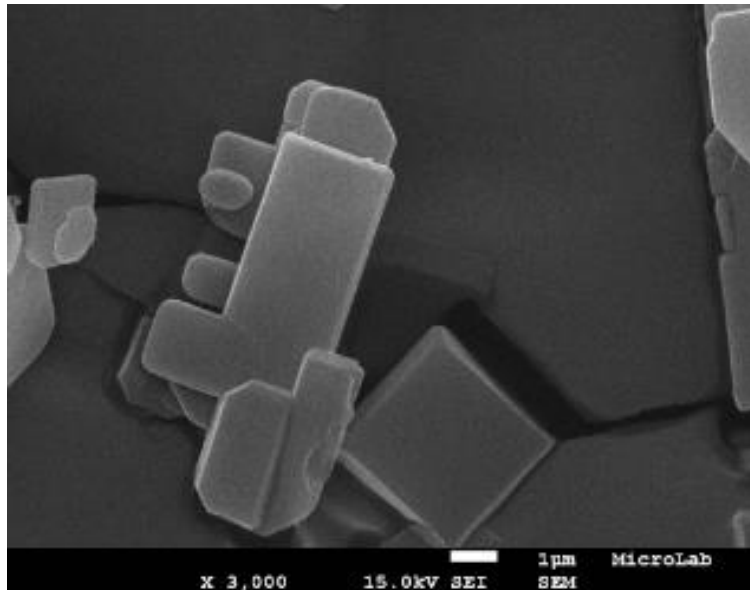
#### **Ensaio 4 – 60 °C 200 bar 10 mg/mL 0,5 mL/min**

No quarto ensaio estudou-se os fatores máximos de temperatura e pressão em conjugação com os valores mínimos dos fatores de concentração e caudal. Nas figuras 17 e 18 encontram-se representadas as imagens microscópicas das partículas obtidas. Estas apresentam, também, uma forma com arestas bem definidas bastante semelhante ao ácido fusídico não processado, e uma distribuição de tamanho uniforme.

Uma característica desta amostra, que se verifica pelas imagens de SEM, é que estas têm tendência a aglomerar, ou seja, apesar de visualmente as partículas apresentarem um tamanho semelhante às partículas obtidas no ensaio anterior, na imagem de SEM com menor ampliação o tamanho parece significativamente maior, devido à aglomeração das partículas e ao elevado número de aglomerados.



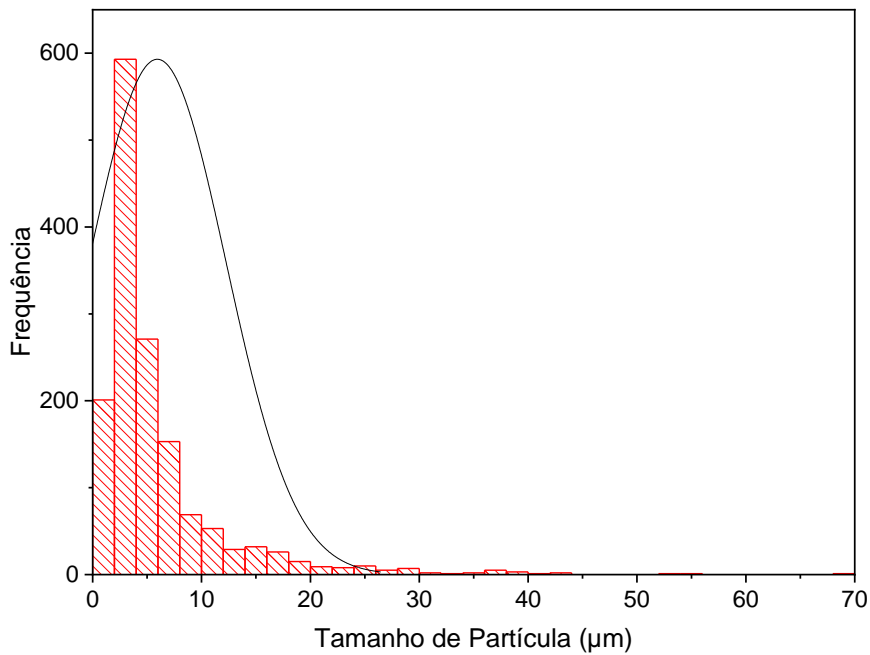
**Figura 17** - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 4: a) Ampliação de 100x e b) ampliação 500x.



**Figura 18** – Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 4 a uma ampliação de 3000x.

Na figura 17a) a ampliação de 100x mostra os aglomerados de partículas e na figura 17b) com a ampliação de 500x é possível compreender melhor como as partículas aglomeram. Na figura 18 com a ampliação de 3000x permite verificar a dimensão e a morfologia da própria partícula.

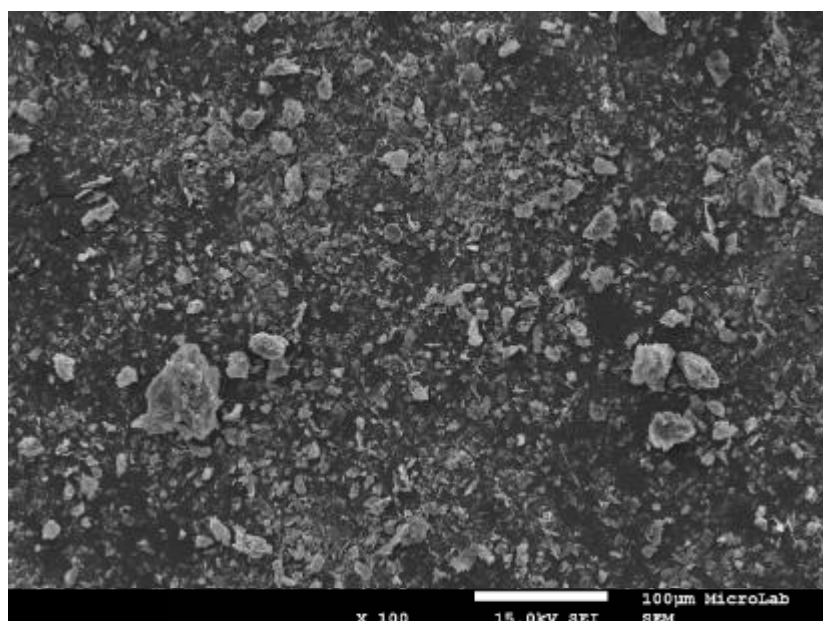
O tamanho de partícula e a distribuição de tamanhos de partícula para este ensaio foram obtidos por análise de imagem. Chegou-se, assim, a um tamanho médio de partícula de 5,939  $\mu\text{m}$  e um desvio padrão de 4,493  $\mu\text{m}$ . Os resultados obtidos através do *ImageJ* estão representados na figura 19. No anexo C encontram-se os dados referentes à repetição.



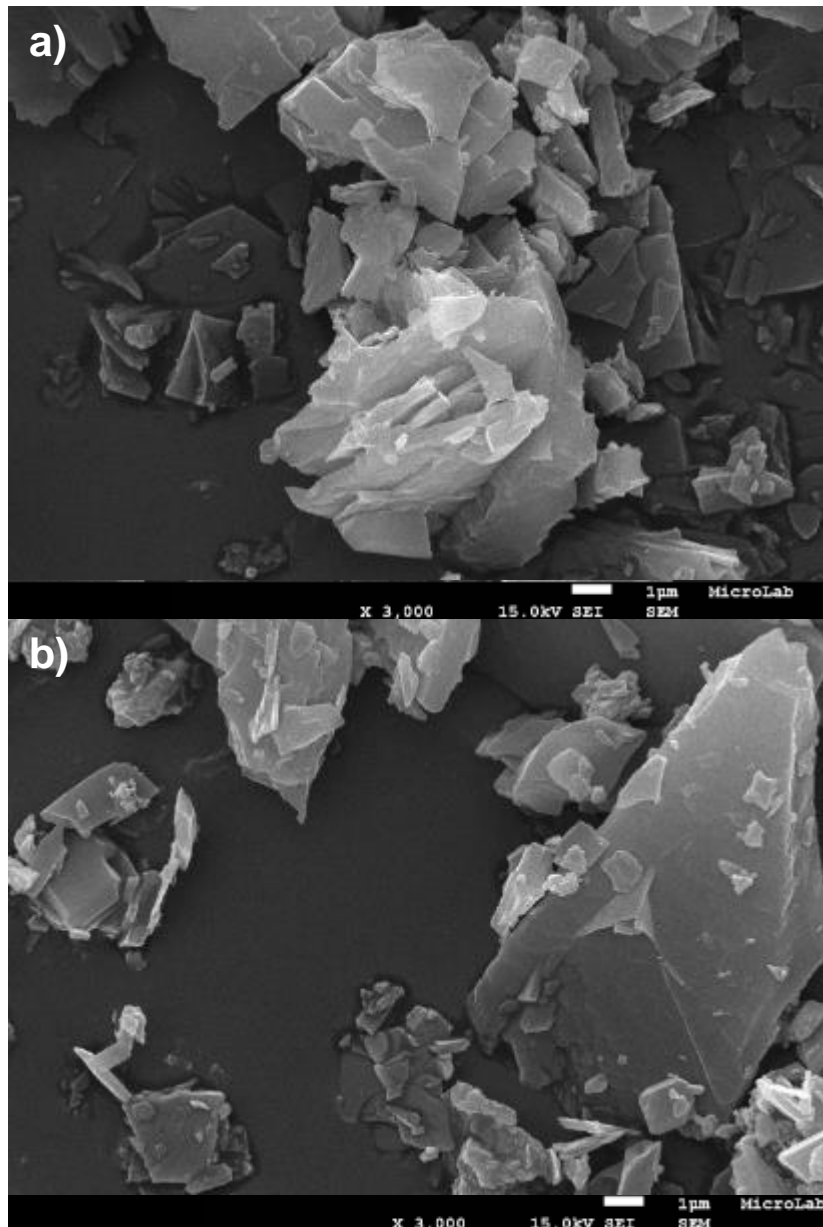
**Figura 19** – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

**Ensaio 5 – 40 °C 100 bar 40 mg/mL 3 mL/min**

No quinto ensaio estudou-se os fatores mínimos de temperatura e pressão e os valores máximos dos fatores de concentração e caudal. Nas figuras 20 e 21 encontram-se representadas as imagens microscópicas das partículas obtidas. Estas apresentam uma forma laminada com arestas bem definidas. A amostra apresenta, tal como a anterior, bastantes aglomerados, contudo neste caso existe também uma menor uniformidade entre as partículas.



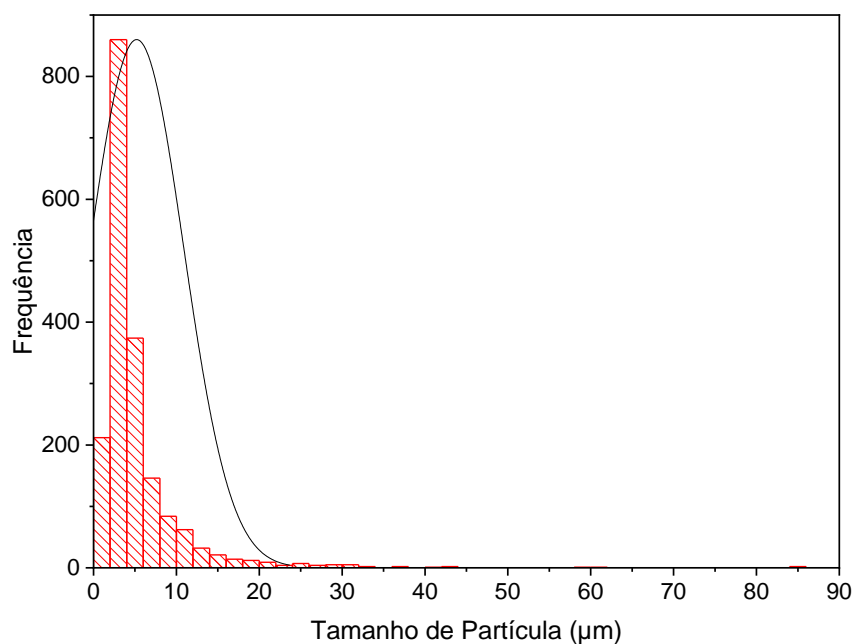
**Figura 20** - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 5 a uma ampliação de 100x.



**Figura 21** - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 5 com uma ampliação de 3000x em zonas distintas.

Na figura 20 a ampliação de 100x mostra os aglomerados de partículas bem como a uniformidade de tamanho existente na amostra, a figura 21a) com a ampliação de 3000x mostra um plano mais aproximado de um desses aglomerados dando, também, para verificar com maior detalhe o aspeto laminado das partículas. Na figura 21b) com a ampliação de 3000x permite verificar as diferentes dimensões entre partículas.

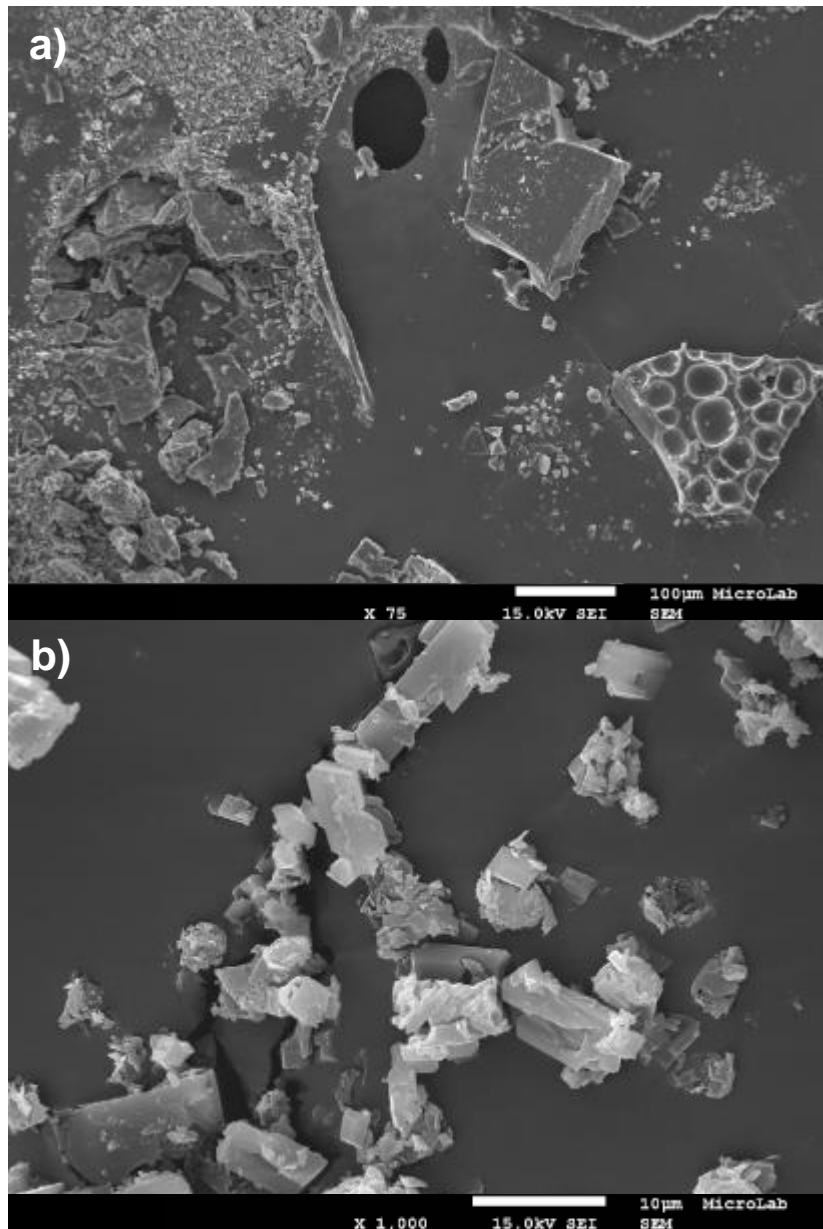
O tamanho de partícula e a distribuição de tamanhos de partícula para este ensaio foram obtidos através do *ImageJ*, apresentando um tamanho médio de partícula de 5,202  $\mu\text{m}$  e com um desvio padrão de 7,527  $\mu\text{m}$ . Os dados obtidos através do *ImageJ* estão representados na figura 22. Em anexo D encontra-se os dados referentes à repetição.



**Figura 22** – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

**Ensaio 6 – 60 °C 100 bar 40 mg/mL 0,5 mL/min**

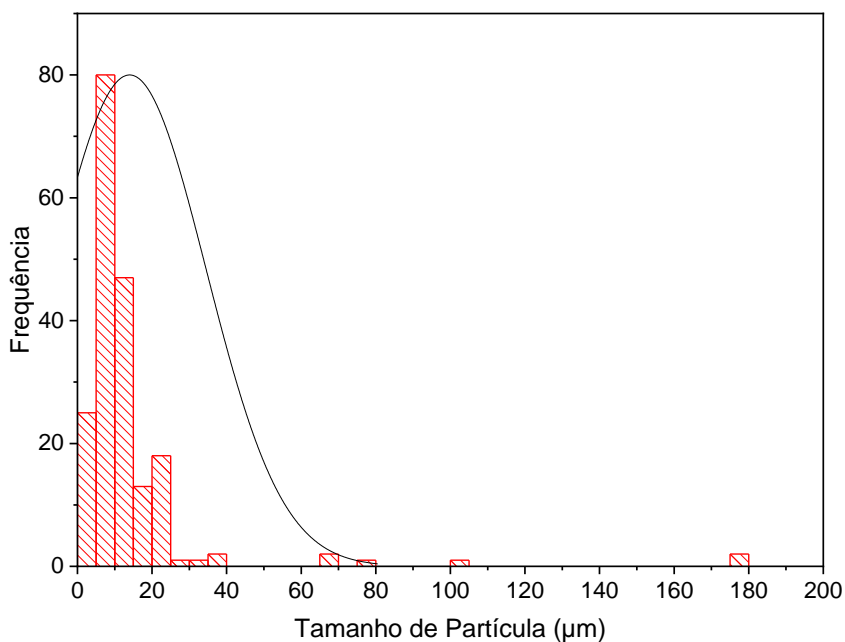
No sexto ensaio estudou-se os fatores mínimos de pressão e caudal e os valores máximos dos fatores de temperatura e concentração. Na figura 23 encontra-se representado as imagens microscópicas das partículas obtidas. Estas apresentam uma forma e tamanho bastante distintos das amostras analisadas anteriormente, à partida essa diferença é resultado da formação de cristais, identificados a olho nu, que visto a microscópio dão origem a partículas com um tamanho de partícula muito superior. Comparando com o ácido fusídico não processado é possível afirmar que a estas condições verifica-se que o composto micronizado apresenta um tamanho de partícula superior ao ácido fusídico não processado.



**Figura 23** - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 6: a) Ampliação de 75x e b) ampliação 1000x.

Na figura 23a) a ampliação de 75x mostra os diferentes tamanhos de partículas desta amostra, sendo possível verificar que as partículas de maior tamanho apresentam uma superfície porosa. A figura 23b) com a ampliação de 1000x mostra um plano mais aproximado das partículas de menor dimensão que apresentam uma morfologia semelhante aos anteriores ensaios. O tamanho de partícula e a distribuição de tamanhos de partícula para este ensaio foram obtidos por tratamento de imagem pelo software já referido, tendo 13,987 µm e 22,058 µm, respectivamente. A distribuição do

tamanho de partícula está representada na figura 24. Em anexo E encontra-se os dados referentes à repetição.

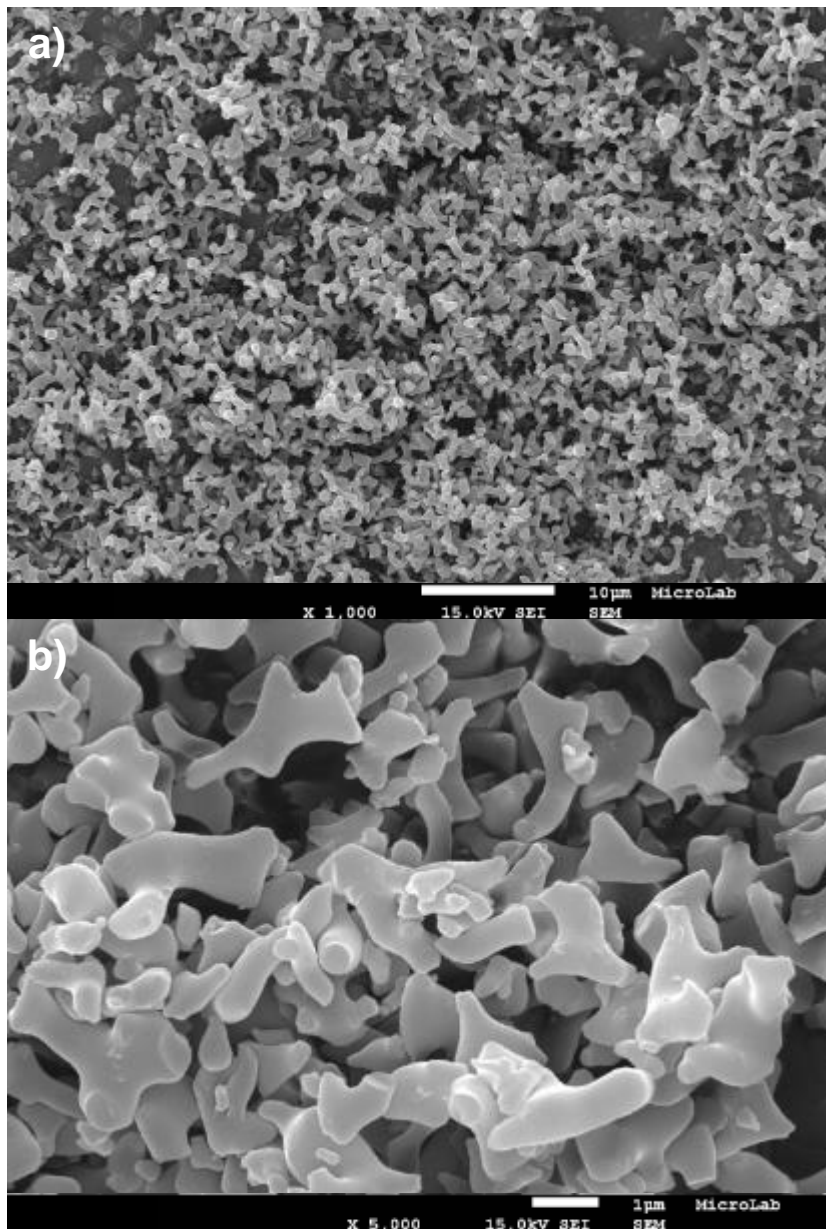


**Figura 24** – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

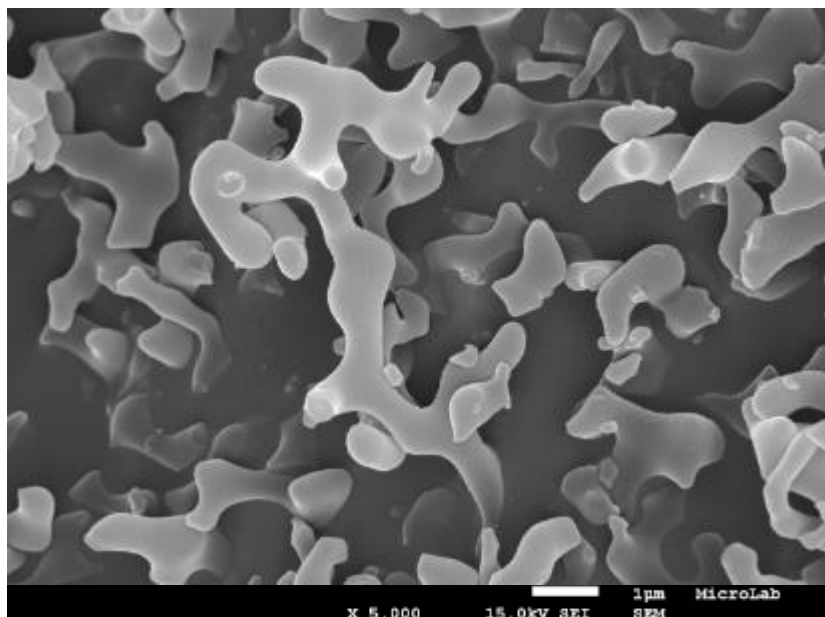
#### **Ensaio 7 – 40 °C 200 bar 40 mg/mL 0,5 mL/min**

No sétimo ensaio estudou-se os fatores mínimos de temperatura e caudal em conjunto com os valores máximos dos fatores de pressão e concentração.

Nas figuras 25 e 26 encontram-se representadas as imagens microscópicas das partículas obtidas. Estas apresentam uma forma e tamanho bastante semelhante ao primeiro ensaio da matriz FFD, não tendo uma forma arestas definidas. Comparando com o ácido fusídico não processado é possível afirmar que a estas condições o tamanho e a morfologia das partículas alteram consideravelmente.



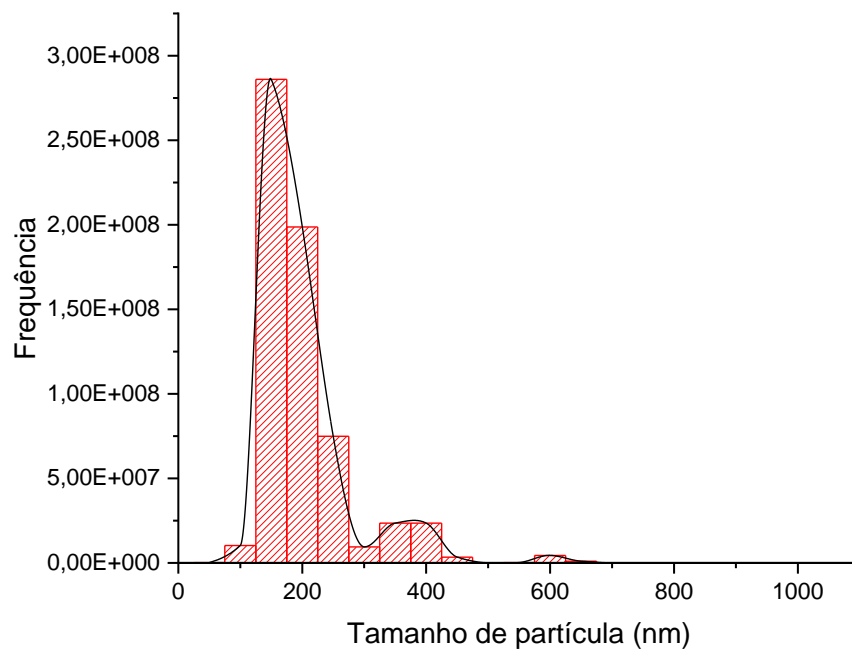
**Figura 25** - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 7: a) Ampliação de 1000x e b) ampliação 5000x.



**Figura 26** - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 7 com uma ampliação de 5000x.

Na figura 25a) a ampliação de 1000x permite mostrar que a amostra é bastante uniforme enquanto que as figuras 25b) e 26 com a ampliação de 5000x mostram em grande detalhe a morfologia e o tamanho das partículas.

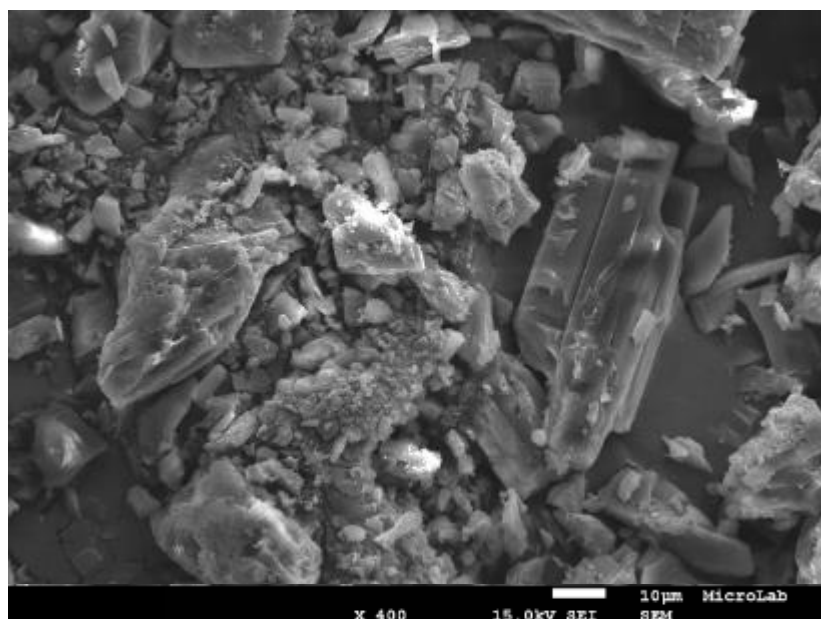
De forma a determinar o tamanho de partícula e a distribuição de tamanhos de partícula para este ensaio foi utilizado o *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA), sendo a amostra suspensa em água. Este método permitiu obter o tamanho médio de partícula e o desvio padrão associado, 0,175  $\mu\text{m}$  e 0,077  $\mu\text{m}$  respetivamente. A representação gráfica das contagens de partículas e respetivo tamanho, obtido pelo NTA, encontra-se representado na figura 27. No anexo F encontra-se os dados referentes à repetição.



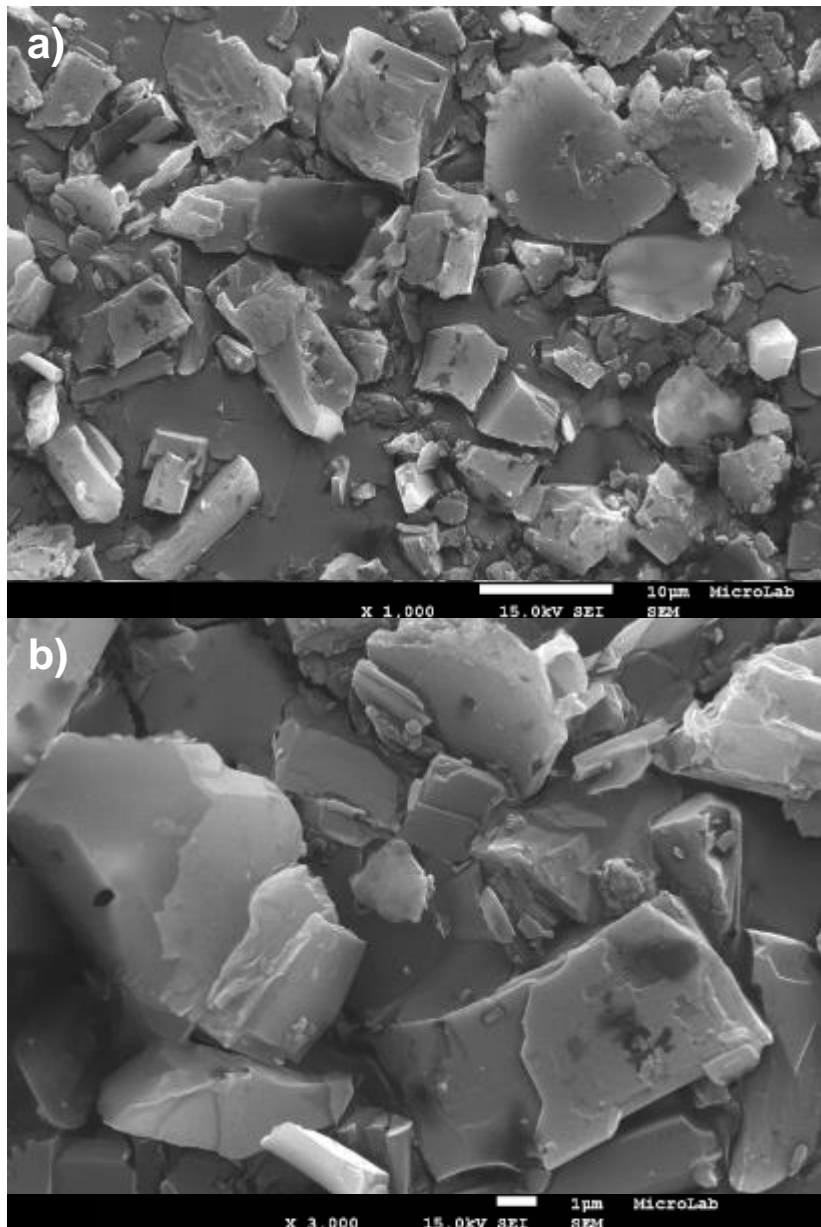
**Figura 27** – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

**Ensaio 8 – 60 °C 200 bar 40 mg/mL 3 mL/min**

No oitavo ensaio estudou-se os fatores máximos dos fatores da matriz FFD. Nas figuras 28 e 29 encontram-se representadas as imagens microscópicas das partículas obtidas. Estas, de forma semelhante com o ensaio 6, apresentam um tamanho de partícula superior devido à formação de cristais de grande dimensão no copo de precipitação.

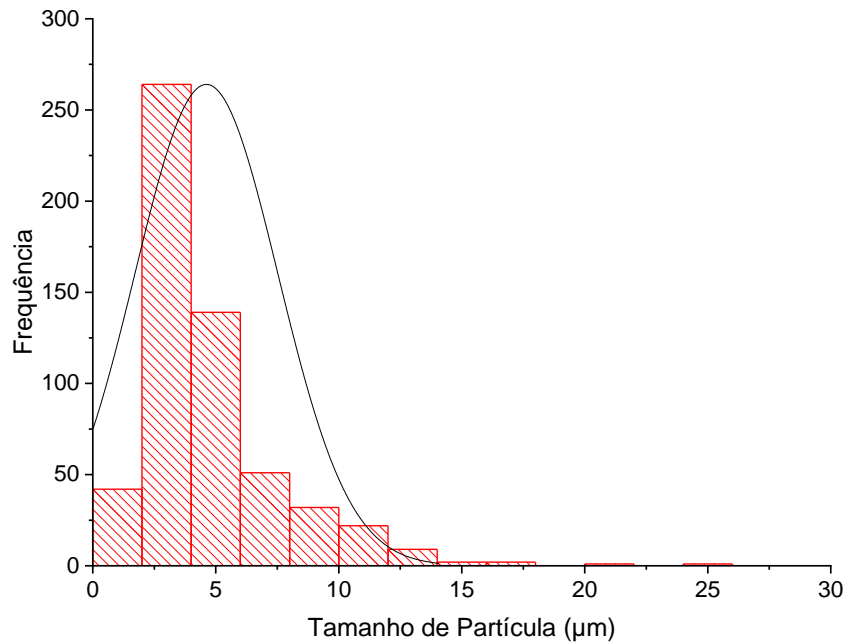


**Figura 28** - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 8 com uma ampliação de 400x.



**Figura 29** - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 8: a) Ampliação de 1000x e b) ampliação 3000x.

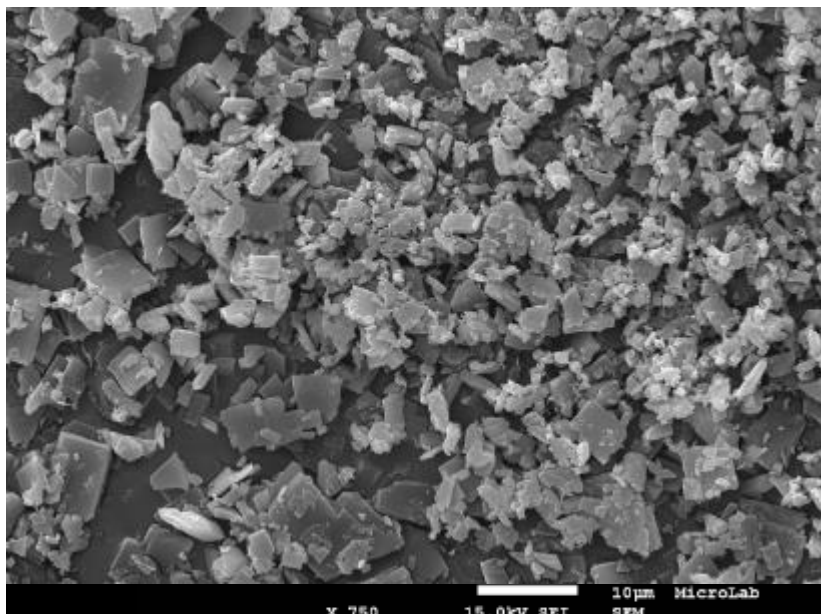
Na figura 28 a ampliação de 400x mostra os diferentes tamanhos de partículas desta amostra. As figuras 29a) e 29b) com a ampliação de 1000x e 3000x mostra um plano mais aproximado das partículas de menor dimensão. O tamanho de partícula e a distribuição de tamanhos de partícula para este ensaio foram obtidos por tratamento de imagem, tendo a amostra um tamanho médio de partícula de 5,366  $\mu\text{m}$  e um desvio padrão de 23,196  $\mu\text{m}$ . A distribuição do tamanho de partícula está representada na figura 30. No anexo G encontram-se os resultados referentes à repetição.



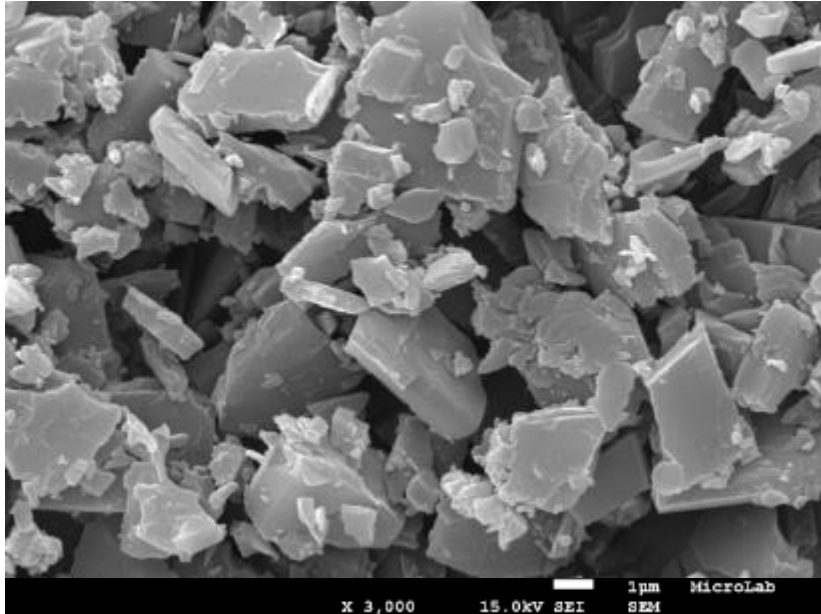
**Figura 30** – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

**Ensaio 9 – 50 °C 150 bar 25 mg/mL 1,75 mL/min**

No nono ensaio da matriz FFD estudou-se os efeitos dos valores médios dos fatores no tamanho e morfologia das partículas. Nas figuras 31 e 32 encontra-se representado as imagens microscópicas das partículas obtidas. Estas, de forma semelhante com o ensaio 6, apresentam um tamanho de partícula superior devido à formação de cristais de grande dimensão no copo de precipitação.

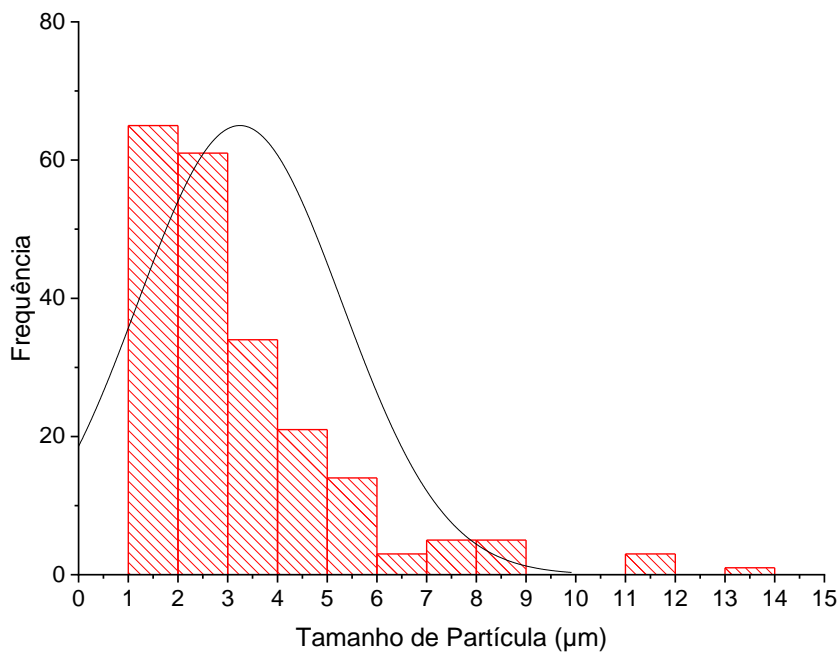


**Figura 31** - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 9 com uma ampliação de 750x.



**Figura 32** - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 9 com uma ampliação de 3000x.

Na figura 31 a ampliação de 750x mostra a uniformidade desta amostra. A figura 32 com a ampliação de 3000x mostra um plano mais aproximado das partículas permitindo ter uma melhor noção sobre as suas dimensões. O tamanho de partícula e a distribuição de tamanhos de partícula para este ensaio foram obtidos por tratamento de imagem, tendo a amostra um tamanho médio de partícula de 3,245  $\mu\text{m}$  e desvio padrão de 21,172  $\mu\text{m}$ . A distribuição do tamanho de partícula está representada na figura 33. No anexo H encontram-se os dados referentes à repetição.



**Figura 33** – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

#### 4.1.1.3 Análise da pureza – Espectroscopia de Infravermelhos (FTIR)

Os produtos micronizados obtidos foram analisados por espectroscopia de infravermelhos, onde foi testada a pureza do composto e confirmado se ocorreu degradação do composto.

A espectroscopia de infravermelhos ao ácido fusídico comercializado (figura 34) foi utilizada como referência e comparação entre o produto micronizado e o produto não processado.

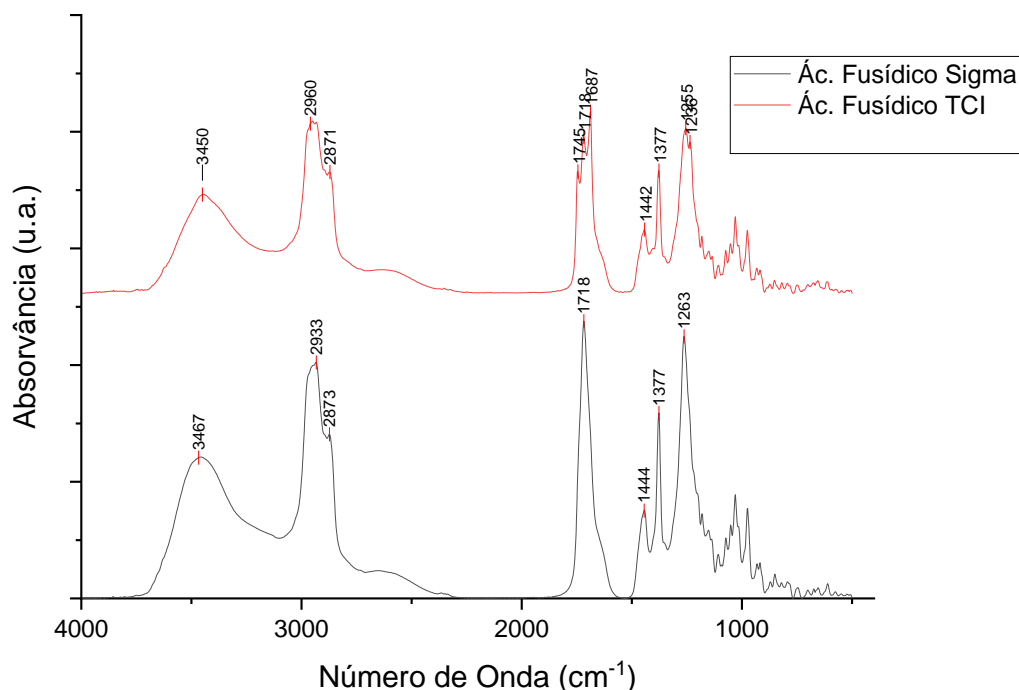


Figura 34 – Representação do espectro de infravermelho do ácido fusídico fornecido pela Sigma e pela TCI.

Analisando os espectros de FTIR do ácido fusídico não processado, verifica-se uma diferença entre o ácido fusídico fornecido pela *Sigma* e o produto fornecido pela *TCI*, na região dos 1650 e 1750 cm<sup>-1</sup>. Os espectros obtidos apresentam as bandas características do ácido fusídico, a aproximadamente 3460 cm<sup>-1</sup> encontra-se a banda associada à ligação O-H, a cerca de 2950 cm<sup>-1</sup> encontra-se vibração *stretching* da ligação C-H, a 1720 cm<sup>-1</sup> encontra-se a vibração *stretching* da ligação C=O do grupo carbonilo e acetilo, e por fim a 1377 cm<sup>-1</sup> e 1260 cm<sup>-1</sup> estão representadas as bandas correspondentes às vibrações *bending* C-H e *stretching* da ligação C-O do grupo carbonilo, correspondentemente.

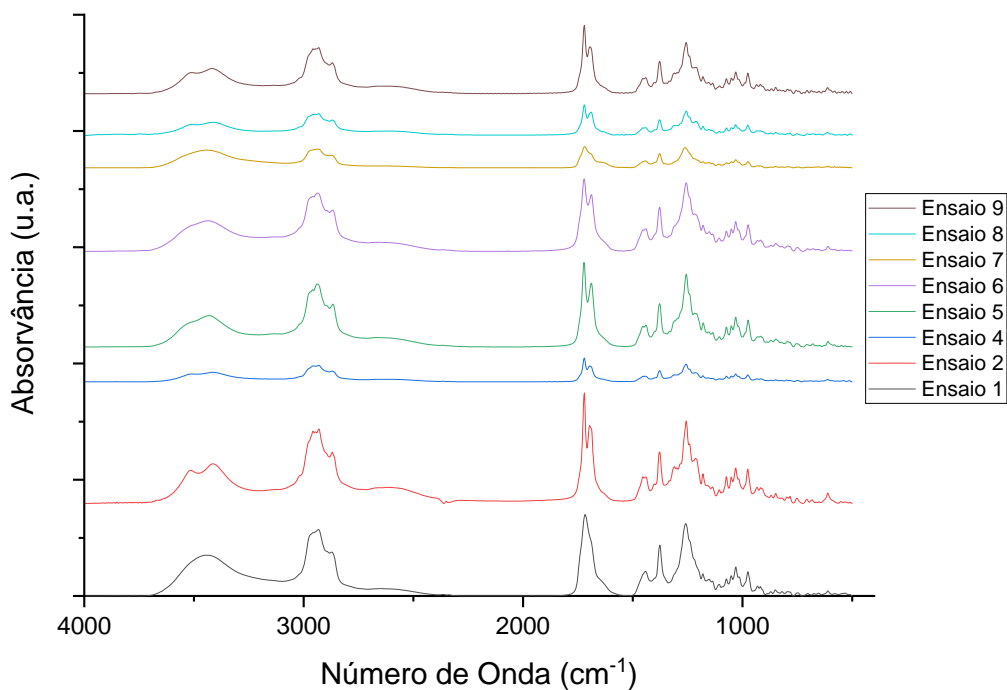
Na região dos 1650 e 1750  $\text{cm}^{-1}$  encontra-se a grande diferença entre os dois ácidos utilizados, no ácido fusídico fornecido pela *TCI* existe a formação de um pico duplo a 1718  $\text{cm}^{-1}$  e 1687  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto que o ácido fusídico fornecido pela *Sigma* apresenta apenas um pico a 1718  $\text{cm}^{-1}$ . Esta diferença foi estudada por Guo *et al.* [50] e por Byrne *et al.* [42] e deve-se ao polimorfismo associado ao ácido fusídico.

O polimorfismo é um fenómeno que caracteriza compostos químicos com mais do que uma forma cristalina, e cada forma é denominada de polimorfo. Os diferentes polimorfos de um determinado composto podem apresentar propriedades físico-químicas diferentes, como solubilidade, ponto de fusão e densidade. Estas diferenças nas propriedades físico-químicas podem ter um impacto na estabilidade do composto, na sua biodisponibilidade e na forma como será processado na indústria farmacêutica. Devido a estas implicações na qualidade e desempenho dos produtos farmacêuticos, é necessário verificar a existência de polimorfismo de forma a garantir produtos de alta qualidade.

O ácido fusídico existe numa única forma amorfa e em quatro formas cristalinas, denominadas como I-IV. A forma polimórfica III é a utilizada em produtos farmacêuticos, uma vez que representa uma forma polimórfica termodinamicamente mais estável. Esta forma polimórfica, estudada por Guo *et al.* [50] e por Byrne *et al.* [42], é caracterizada pelo pico duplo na zona entre 1650 e 1750  $\text{cm}^{-1}$ , enquanto que a forma polimórfica I é caracterizada pela presença de um único pico nessa mesma zona. Assim, é possível concluir que o ácido fusídico fornecido pela *Sigma* é um polimorfo I enquanto que o ácido fusídico fornecido pela *TCI* é um polimorfo do tipo III.

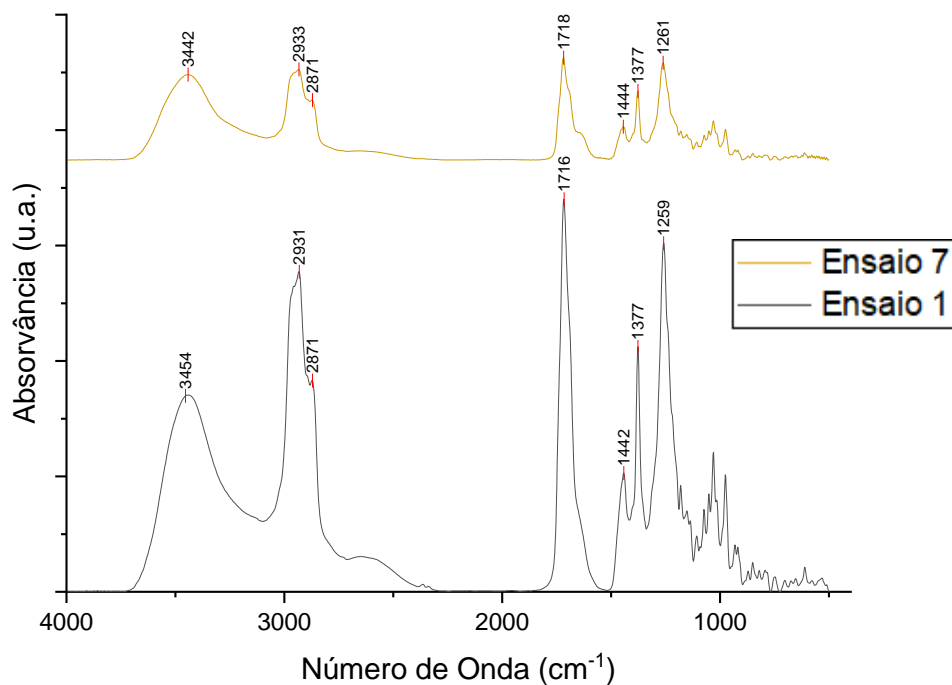
Os compostos micronizados foram, também, sujeitos à espectroscopia de infravermelhos, de forma a comprovar que não ocorreu degradação do princípio ativo durante o processo de micronização por anti-solvente supercrítico, mas também para determinar que tipo de polimorfo foi obtido após o ácido fusídico ser processado.

Na figura 35 encontram-se representados os espetros de infravermelhos obtidos para todos os ensaios efetuados, as representações correspondem apenas a uma das repetições não sendo necessário demonstrar ambas visto que são iguais entre si.

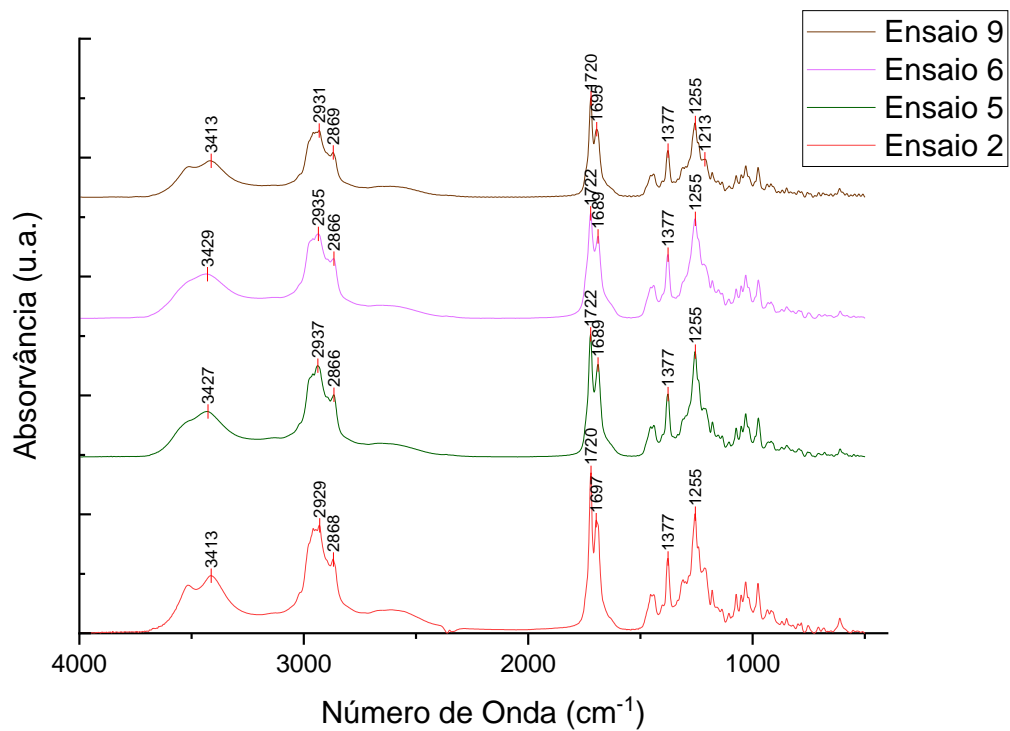


**Figura 35** – Representação dos espectros de infravermelho do ácido fusídico micronizado obtido para cada ensaio FFD efetuado.

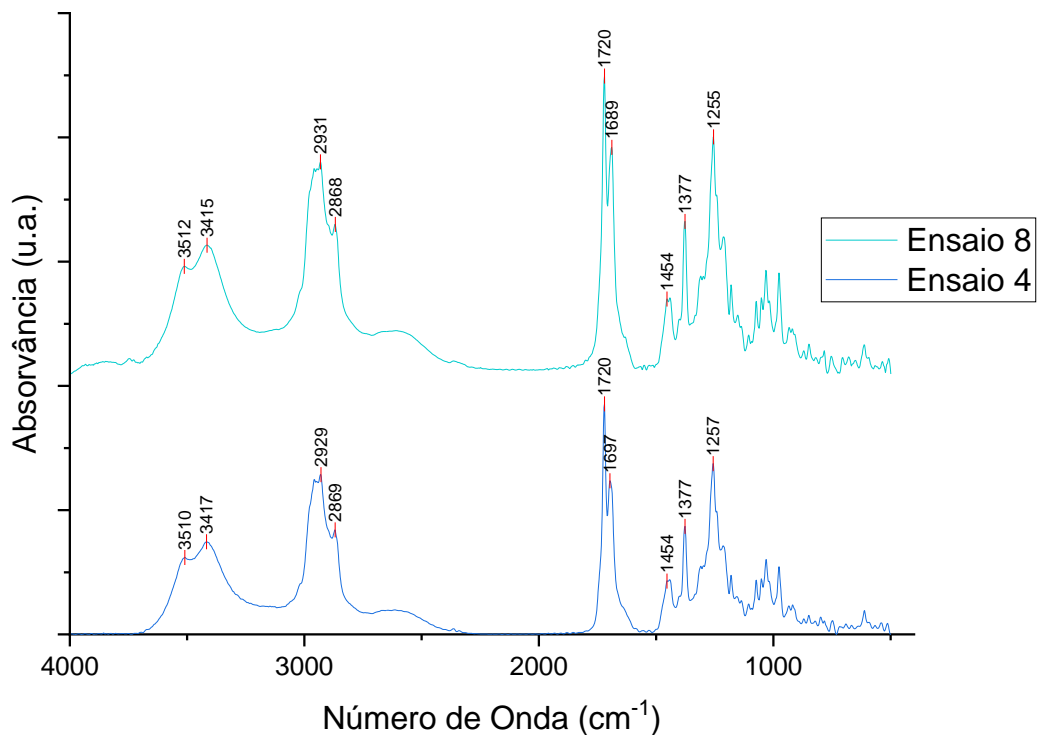
Para compreender mais detalhadamente as diferenças entre os picos de cada ensaio, será apresentado, nas figuras 36, 37 e 38, os espectros divididos por polimorfos já conhecidos.



**Figura 36** – Comparação entre os espectros de infravermelho do ácido fusídico micronizado obtido no ensaio 1 e no ensaio 7.



**Figura 37** – Comparação entre os espectros de infravermelho do ácido fusídico micronizado obtido no ensaio 2, ensaio 5, ensaio 6 e no ensaio 9.



**Figura 38** – Comparação entre os espectros de infravermelho do ácido fusídico micronizado obtido no ensaio 4 e no ensaio 8.

Os ensaios 4 e 8 foram analisados separadamente, uma vez que a sua concentração na pastilha analisada era menor, levando a que a intensidade dos picos fosse, também, menor e comparando com os espectros cuja intensidade era superior tornava a sua análise mais difícil e o seu espectro menos intenso e visível.

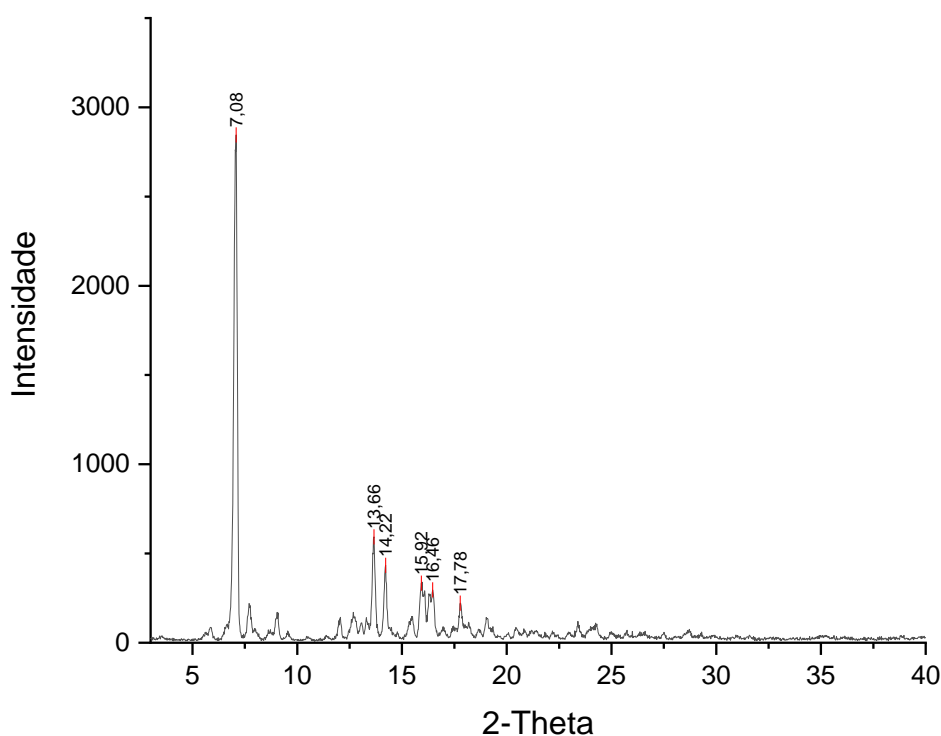
Analisando os espectros de infravermelhos obtidos é possível concluir que o produto micronizado não sofreu degradação apresentando os picos característicos das diferentes ligações do ácido fusídico. Verifica-se, também, que maioritariamente foi obtido ácido fusídico na forma polimórfica III.

O produto micronizado obtido nos ensaios 1 e 7 são da forma polimórfica I, estes ensaios correspondem a um tamanho de partícula menor e uma morfologia diferente dos restantes produtos micronizados. Os ensaios 2, 4, 5, 6, 8 e 9 correspondem ao ácido fusídico de forma polimórfica III, estes ensaios estão também associados a uma morfologia de forma mais quadrada com as arestas muito bem definidas e a um tamanho de partícula superior, comparando com os ensaios 1 e 7.

#### 4.1.1.4 Análise de pureza – Difração por Raio-X

A análise das formas polimórficas do ácido fusídico foi efetuado por difração de raio-X, onde é possível ter uma melhor compreensão sobre os polimorfos obtidos.

Novamente, o estudo da difração por raio-X inicia-se com a análise do espectro do composto não processado. Neste caso, efetuou-se apenas a difração de raio-X para o ácido fusídico fornecido pela *TCI* (figura 39).

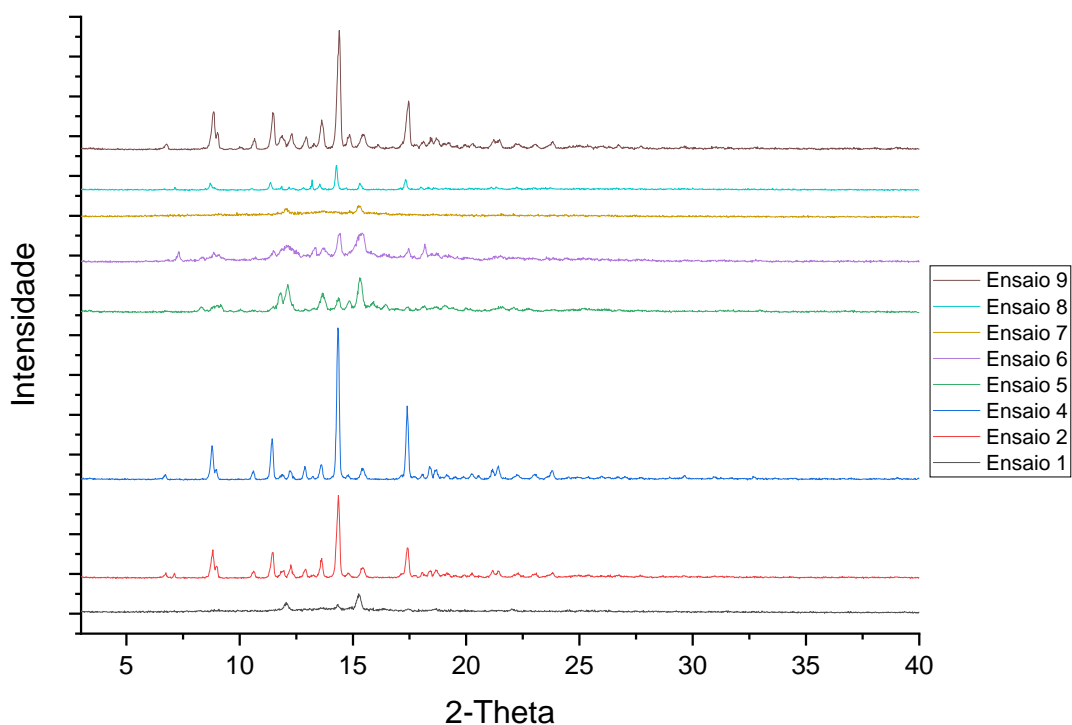


**Figura 39** – Representação do difratograma de raio-X obtido para o ácido Fusídico fornecido pela *TCI*.

Gilchrist *et al.* [46] caracterizou as quatro formas polimórficas do ácido fusídico por difração de raio-X. Onde a forma I possui picos de maior difração a 7,23°, 12,67°, 13,12° e 18,18°, a forma II possui maior difração a 11,18°, 13,7°, 15,82°, 17,4° e 18,19°, a forma III é caracterizada por picos de maior difração a 7,18°, 13,7°, 15,99°, 16,42° e 17,91°, por último a forma polimórfica IV apresenta picos em 11,78°, 13,1°, 15,12°, 16,44° e 18,11°.

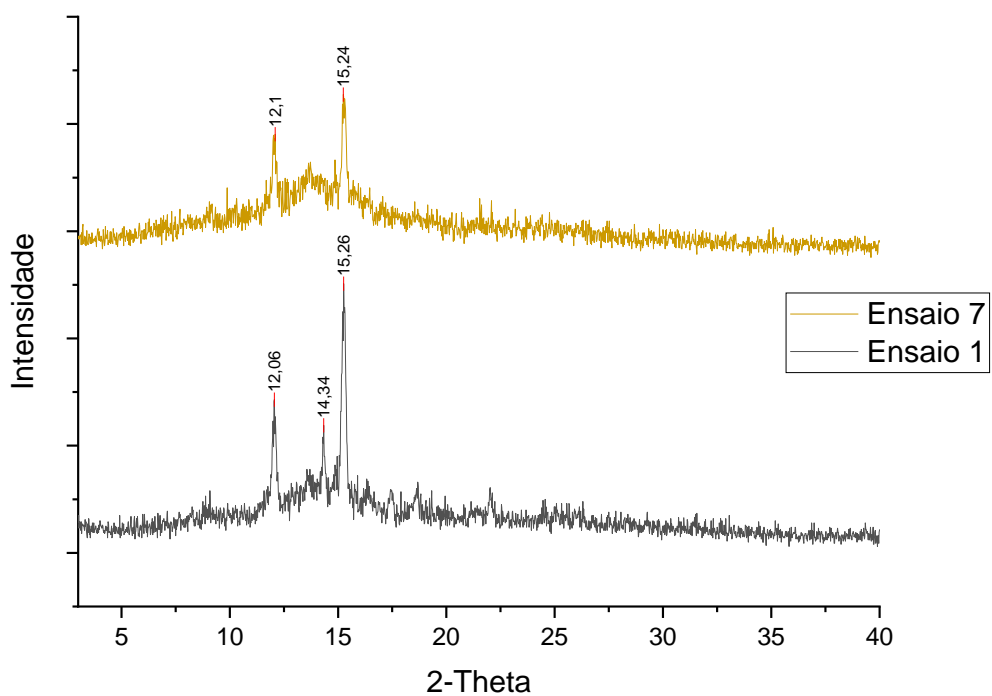
Analisando o espectro de difração de raio-X do ácido fusídico fornecido pela *TCI* e comparando com o estudo do Gilchrist *et al.* [46] foi possível confirmar a forma polimórfica deste ácido é a III.

Os compostos micronizados foram, também, caracterizados por difração de raio-X (figura 40, 41, 42 e 43) e recorreu-se ao estudo realizado por Gilchrist *et al.* [46] para determinar a que forma polimórfica corresponde cada um dos produtos micronizados.



**Figura 40** – Representação do difratograma de raio-X do ácido fusídico micronizado obtido para cada ensaio FFD efetuado.

De forma a ser possível analisar mais detalhadamente as diferenças de cada ensaio, e concluir a que polimorfo corresponde cada um, nas figuras encontram-se representados os espectros divididos para conseguir uma melhor perceção de cada.



**Figura 41** – Comparação entre difratogramas de raio-X do ácido fusídico micronizado obtido no ensaio 1 e no ensaio 7.

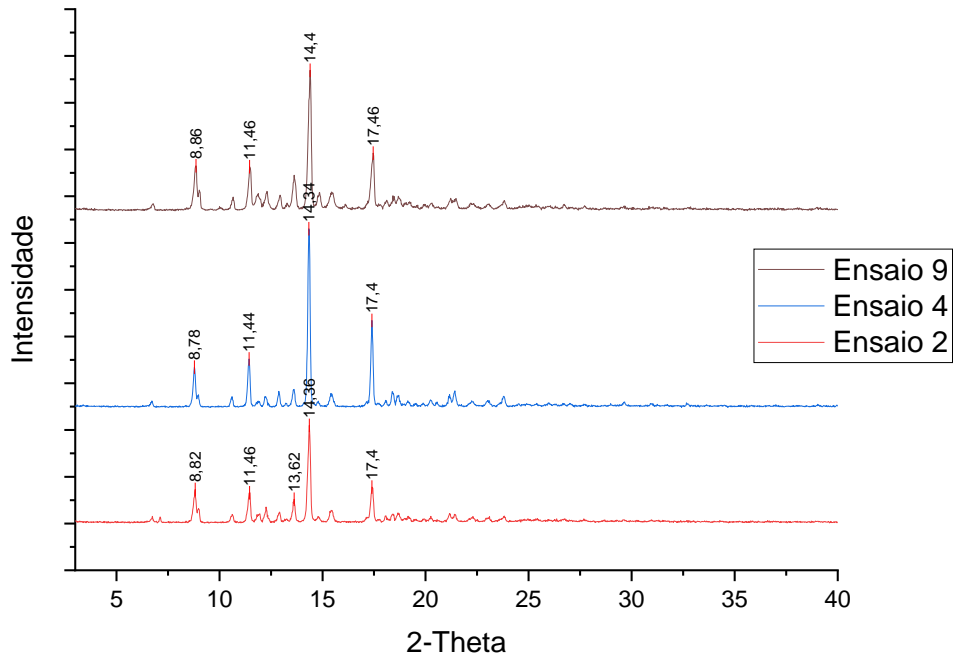


Figura 42 – Comparação entre difratogramas de raio-X do ácido fusídico micronizado obtido no ensaio 2, ensaio 4 e no ensaio 9.

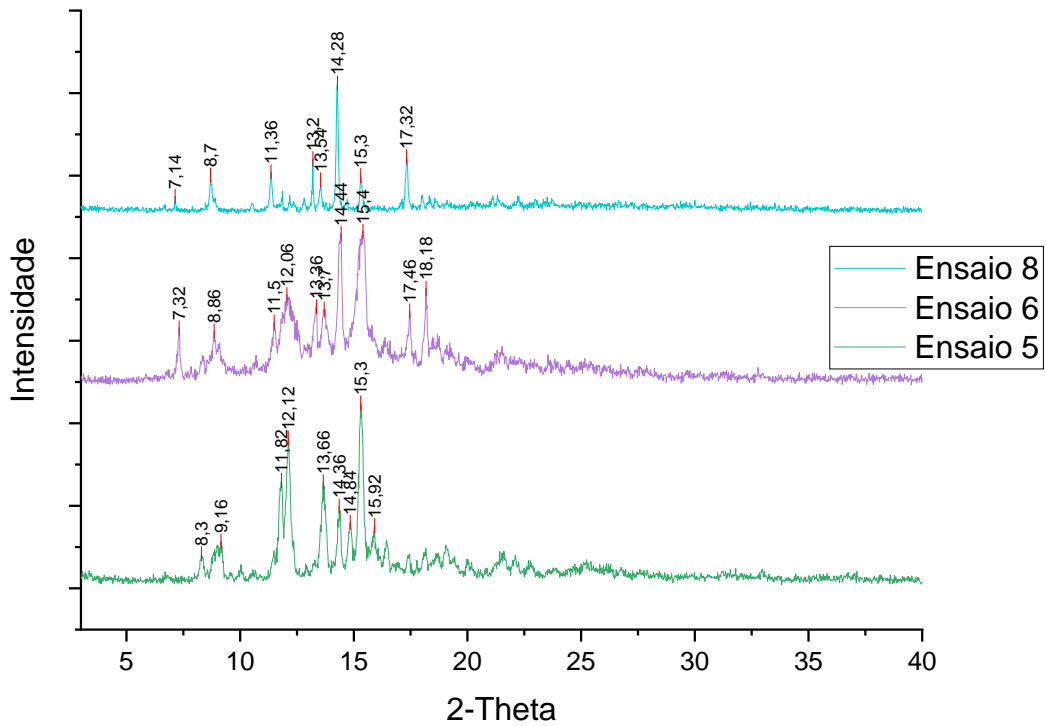


Figura 43 – Comparação entre difratogramas de raio-X do ácido fusídico micronizado obtido no ensaio 5, ensaio 6 e no ensaio 8.

É de salientar que a difração de raios-X fornece informações estruturais essenciais para identificar os diferentes polimorfos, contudo a aparência dos padrões de difração pode ser afetada pelo tamanho de partícula e pela orientação preferencial da amostra [50].

Iniciando pelos ensaios 1 e 7, que correspondem às amostras com um menor tamanho de partícula, verifica-se que estas possuem menor cristalinidade, devido à presença de poucos picos com uma baixa intensidade presentes nos difratogramas. Os ensaios 2, 4, 8 e 9, apresentam picos de difração intensos a valores de  $2\theta$  idênticos. Sendo o pico a  $14,3^\circ$  o mais intenso e o mais característico. Novamente comparando com os resultados obtidos por Gilchrist *et al.* [46] verifica-se que este pico, bastante intenso, é característico da forma polimórfica I. Nos ensaios 5 e 6, apesar de este pico existir no difratograma, verifica-se que este encontra-se em menor intensidade, tendo uma intensidade semelhante ao pico seguinte que ocorre a aproximadamente  $15,5^\circ$ . Contudo, nestes dois ensaios verifica-se um pico mais intenso a  $12,1^\circ$ . Este pico de difração é característico da forma polimórfica IV, contudo o pico mais intenso a  $15,5^\circ$  é característico da forma I.

#### **4.1.1.5 Análise Estatística – FFD**

A análise estatística do *Fractional Factorial Design* foi efetuada pelo software *Design Expert* 10, apesar de inicialmente a matriz apresentar 21 pontos a análise estatística foi realizada a apenas 19 pontos, uma vez que não foi possível obter produto no ensaio 3 e que a repetição do ensaio 2 foi considerada não representativa e retirada da matriz. A análise estatística teve início na avaliação do modelo. Esta avaliação foi realizada com um modelo polinomial de ordem linear onde são avaliados os efeitos dos fatores.

A avaliação do modelo foi validada pelo grau de liberdade associado à matriz FFD que é suficiente para determinar o *lack of fit* (falta de ajuste do modelo). Para garantir um teste válido é necessário um mínimo de 3 graus de liberdade para o *lack of fit* e de 4 graus de liberdade para o erro. No modelo obtido obteve-se 3 e 12 graus de liberdade, respetivamente. Outro termo que determina a validação do modelo é a Eficiência G, que está relacionada inversamente com a máxima variância e tende a reduzir com as repetições. Para a avaliação do modelo a Eficiência G obtida foi de 80%.

Após efetuada a avaliação do modelo é necessário realizar a análise de variância (ANOVA) ao fator de resposta da matriz FFD de forma a conseguir obter os principais fatores. Uma vez que o pretendido desta análise estatística é determinar quais são os

fatores em estudo mais significativos no processo não é necessário, na ANOVA, recorrer a uma transformação para o tratamento de dados.

A tabela 5 apresenta a análise ANOVA para o fator de resposta, tamanho de partícula, cuja ordem é *Design Model*.

**Tabela 5** – Resultados obtidos na análise ANOVA para o fator de resposta tamanho de partícula.

	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média dos quadrados</b>	<b>F-value</b>	<b>P-value</b>
<b>Modelo</b>	282,20	7	40,31	61,18	$2,074 \times 10^{-7}$
<b>A-Temperatura</b>	27,53	1	27,53	41,78	$7,224 \times 10^{-7}$
<b>B-Pressão</b>	0,97	1	0,97	1,48	0,252
<b>C-Concentração</b>	0,96	1	0,96	1,45	0,256
<b>D-Caudal</b>	9,13	1	9,13	13,86	0,004
<b>AB</b>	2,74	1	2,74	4,16	0,069
<b>AC</b>	2,61	1	2,61	3,95	0,075
<b>AD</b>	12,95	1	12,95	19,65	0,001
<b>Erro</b>	6,59	10	0,66		
<b>Cor Total</b>	288,79	17			

O *f-value* do modelo é 61,18 o que significa que o modelo é significativo. Os fatores cujo *p-value* é inferior a 0,05 são considerados termos significantes do modelo. Assim, é possível concluir que a temperatura, o caudal e a interação entre o fator temperatura caudal são termos significativos deste modelo. Na tabela 6 encontra-se os valores do modelo.

**Tabela 6** – Valores do modelo após a análise ANOVA.

<b>Desvio padrão</b>	0,81
<b>Média</b>	4,92
<b>C.V. %</b>	16,48
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9772
<b>Precisão</b>	26,869

O R<sup>2</sup> obtido para este modelo é de 0,9772 e o valor da precisão mede o sinal do ruído, uma vez que este valor é superior a 4 indica que o sinal é adequado e o modelo é válido e pode ser utilizado na análise ANOVA.

A equação do modelo é obtida pelo *Design Expert 10* e na tabela 7 estão representados os coeficientes relacionados a cada fator em estudo e o erro associado.

**Tabela 7** – Coeficientes de cada fator em estudo e o erro associado.

<b>Fator</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>Erro</b>
<b>Interceção</b>	-27,723	5,964
<b>A-Temperatura</b>	0,696	0,108
<b>B-Pressão</b>	0,066	0,054
<b>C-Concentração</b>	-0,225	0,186
<b>D-Caudal</b>	8,324	2,236
<b>AB</b>	-0,002	0,001
<b>AC</b>	0,006	0,003
<b>AD</b>	-0,172	0,039

Assim a equação final (Eq.1) dos fatores para a análise ANOVA do tamanho de partícula é dada por:

$$\begin{aligned} \text{Tamanho de partícula} = & -27,723 + 0,696 \times \text{Temperatura} + 0,066 \times \text{Pressão} - 0,225 \times \\ & \text{Concentração} + 8,324 \times \text{Caudal} - 0,002 \times \text{Temperatura} \times \text{Pressão} + 0,006 \times \\ & \text{Temperatura} \times \text{Concentração} - 0,172 \times \text{Temperatura} \times \text{Caudal} \quad (\text{Eq.1}) \end{aligned}$$

Tendo em conta estes resultados obtidos pela análise ANOVA fixaram-se dois fatores (pressão e concentração) para prosseguir a otimização do processo e realizar o *Central Composite Design*. Os valores fixos selecionados foram 100 bar e 40 mg/mL, esta seleção teve como maior objetivo a viabilidade do processo, e desta forma é possível estudar os valores dos fatores que tornariam o processo economicamente mais viável, utilizando uma menor pressão associada a uma maior concentração. Por outro lado, a temperatura será variada entre 40 °C e 60 °C enquanto que o caudal varia entre 0,5 mL e 3 mL.

#### 4.1.2 Central Composite Design (CCD)

Com os fatores mais significativos, que influenciam o tamanho de partícula do ácido fúsdico, obtidos pelo *Fractional Factorial Design* (FFD) construiu-se a matriz Central Composite Design (CCD) através do software *Design Expert 10*.

A matriz foi desenhada com dois fatores de estudo, temperatura e caudal, e com um fator de resposta, tamanho de partícula. Como foi referido anteriormente, a temperatura irá variar entre 40 °C e 60 °C, e o caudal entre 0,5 e 3 mL/min. Enquanto que a pressão será mantida em 100 bar e a concentração será 40 mg/mL de forma a tornar o processo economicamente mais vantajoso, gastando menos CO<sub>2</sub> por medida a uma maior concentração, ou seja, utilizando uma maior quantidade de composto por medida.

Na tabela 8 encontra-se a matriz CCD obtida pelo *Design Expert*, com os valores mencionados acima.

**Tabela 8** – Matriz CCD com 2 fatores de estudo e 1 fator de resposta obtido pelo *Design Expert 10*, tamanho médio de partícula e respetivo desvio padrão.

Ensaio	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Concentração (mg/mL)	Caudal (mL/min)	Tamanho de partícula (µm)	Desvio Padrão (µm)
CCD1	60	100	40	3	14,779	55,178
CCD2	50	100	40	3	28,840	22,142
CCD3	60	100	40	1,75	7,382	6,973
CCD4	40	100	40	0,5	0,187	—
CCD5	40	100	40	3	5,202	7,527
CCD6	60	100	40	0,5	13,987	22,058
					21,620	24,734
					8,260	15,725
CCD7	50	100	40	1,75	23,805	23,336
					24,246	25,570

Os ensaios CCD5 e CCD6 são comuns em ambas as matrizes, FFD e CCD. Estes correspondem aos ensaios 5 e 6, respetivamente, na matriz FFD.

É de notar, também, que por motivos de avaria de uma parte do equipamento não foi possível realizar o ensaio CCD4 em tempo útil de entrega da dissertação de mestrado. Por esse motivo, e de forma a ser possível concluir a análise da matriz, assumiu-se que

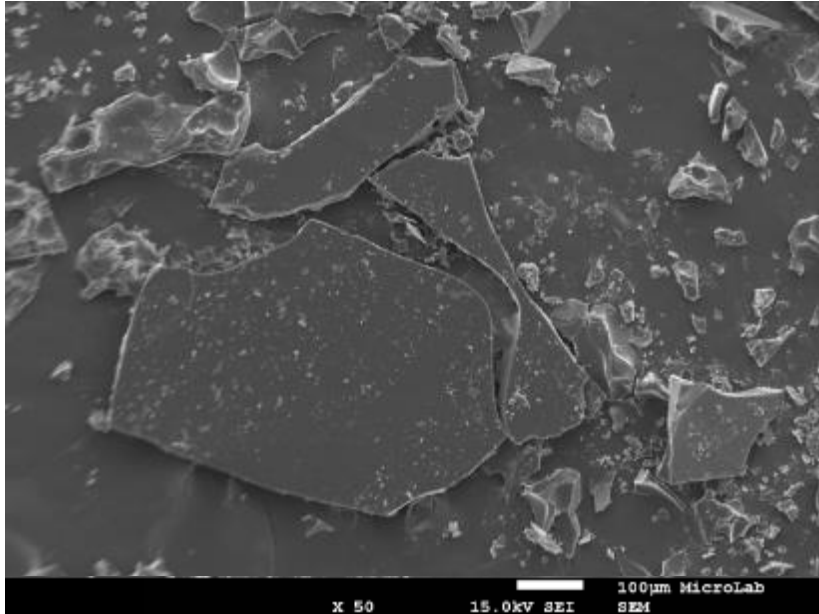
o tamanho médio de partícula nas condições do ensaio CCD4 se encontraria no intervalo de valores obtidos nos ensaios 1 e 7 da matriz FFD. Esta consideração foi feita tendo por base os resultados obtidos para o *Fractional Factorial Design*. Assim, tendo em conta que os ensaios 1 e 7 da matriz FFD apresentam valores similares e que a análise estatística mostrou que a pressão e a concentração não são parâmetros significativos, foi assumido que nas condições do ensaio CCD4 o tamanho médio de partícula esperado se encontraria dentro do intervalo de valores obtidos para os referidos ensaios do *Fractional Factorial Design*.

#### **4.1.2.1 Análise Microscópica**

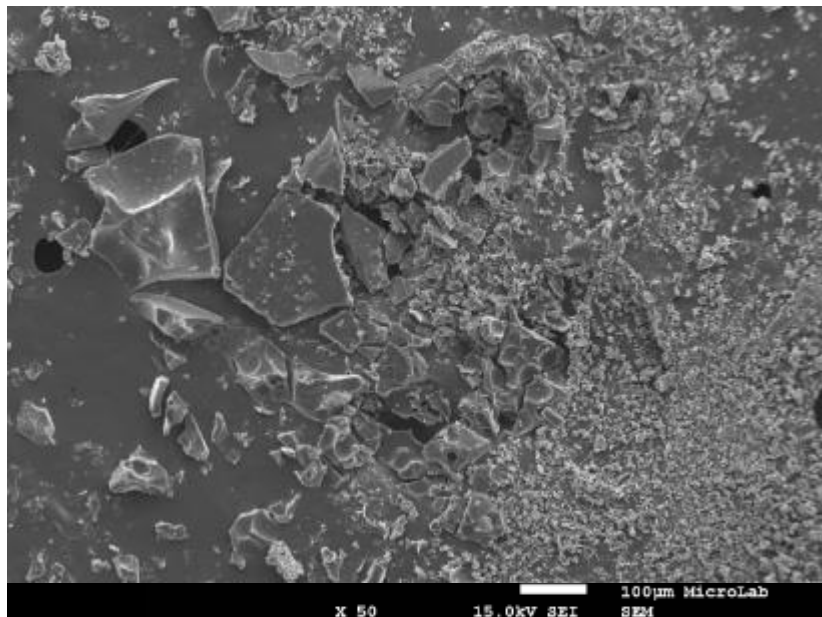
Como referido anteriormente os ensaios CCD5 e CCD6 são comuns à matriz FFD e por tal, foram analisados microscopicamente na secção 3.1.1.2, de forma a não tornar a análise repetitiva estes dois ensaios serão omitidos da análise microscópica aos ensaios da matriz CCD.

#### **Ensaio CCD1 – 60 °C 100 bar 40 mg/mL 3 mL/min**

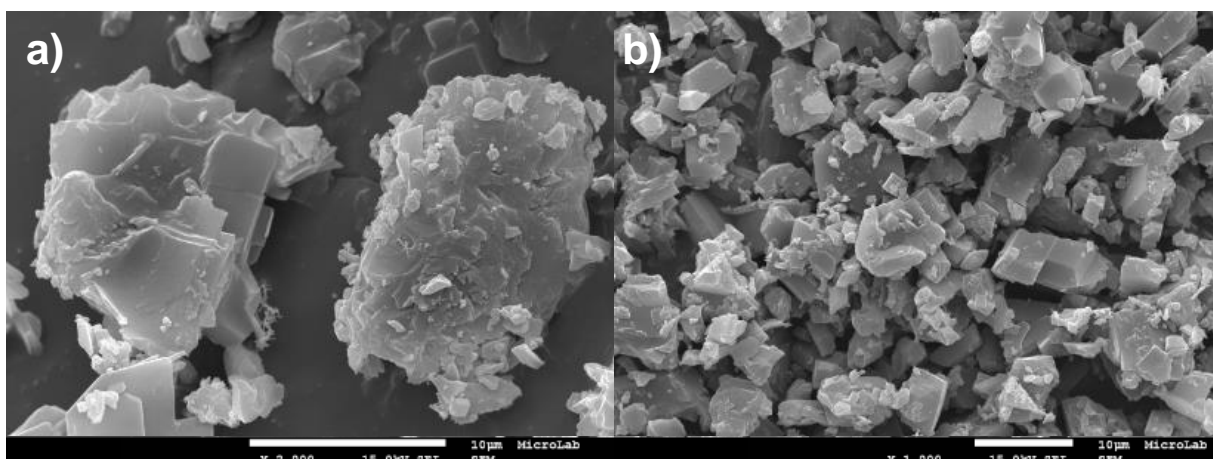
No primeiro ensaio da matriz CCD estudou-se os fatores mínimos associados ao Desenho Experimental. A análise macroscópica ao produto micronizado foi efetuada logo após a extração deste do copo de precipitação, verificou-se a presença de bastantes cristais o que indica, por conclusões tiradas das análises anteriores ao ácido fusídico micronizado, que as partículas, por análise microscópica, apresentarão uma distribuição de partícula muito alargada, contendo partículas com grande tamanho misturado com partículas de menor tamanho. Após a análise das imagens de SEM, figuras 44, 45 e 46, esta distribuição de partículas é confirmada e desta análise é possível, ainda, verificar que as partículas apresentam formas bem definidas, sendo que as de maior tamanho têm as arestas mais bem definidas que as partículas de menor tamanho.



**Figura 44** - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio CCD1 com uma ampliação de 50x.

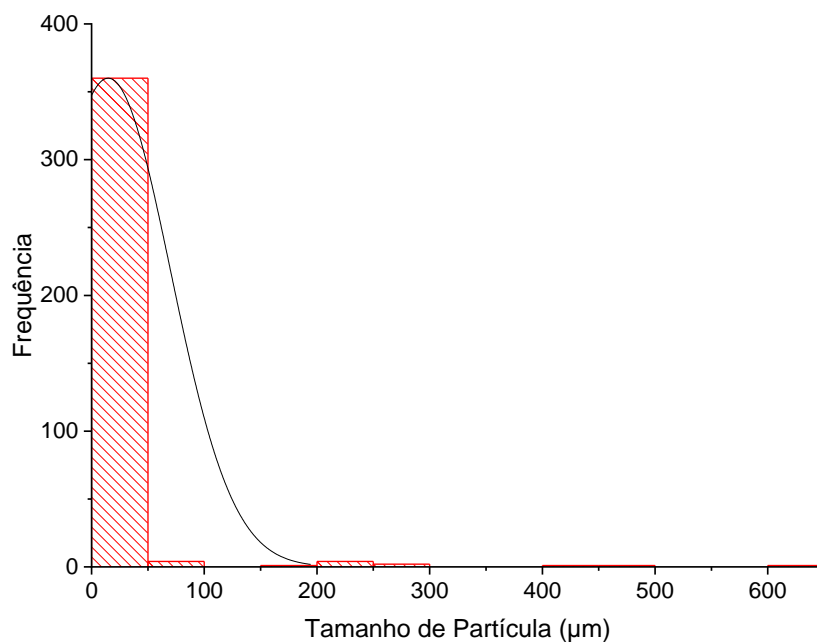


**Figura 45** - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio CCD1 com uma ampliação de 50x.



**Figura 46** - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio CCD1: a) Ampliação de 2000x e b) ampliação 1000x.

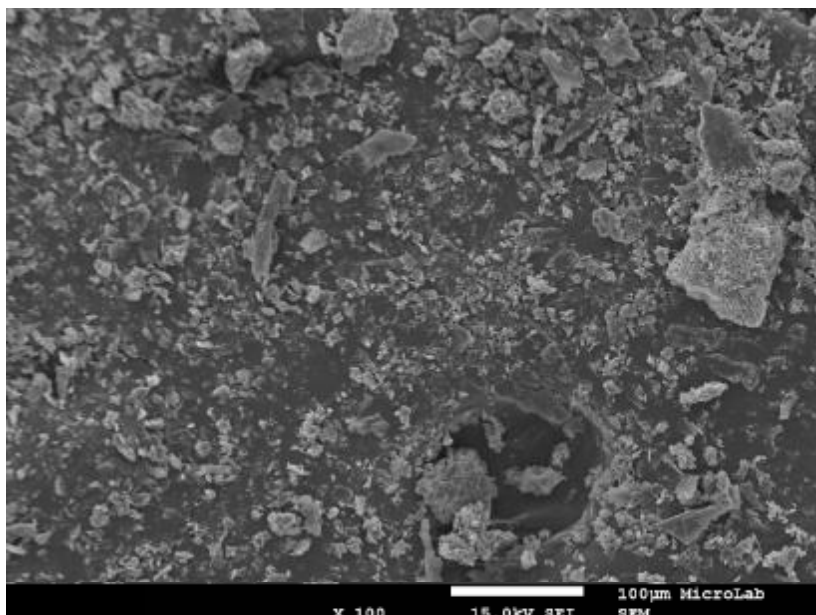
Na figura 44 e 45 é possível ver os diferentes tamanhos de partícula presentes nesta amostra. A figura 46a) e 46b) com a ampliação de 2000x e 100x, respectivamente, mostra um plano mais aproximado das partículas permitindo ter uma melhor noção sobre as suas dimensões e formas. O tamanho de partícula e a distribuição de tamanhos de partícula para este ensaio foram obtidos por tratamento de imagem utilizando o *ImageJ*, tendo a amostra um tamanho médio de partícula de 14,779  $\mu\text{m}$  e um desvio padrão de 55,178  $\mu\text{m}$ . A distribuição do tamanho de partícula está representada na figura 47.



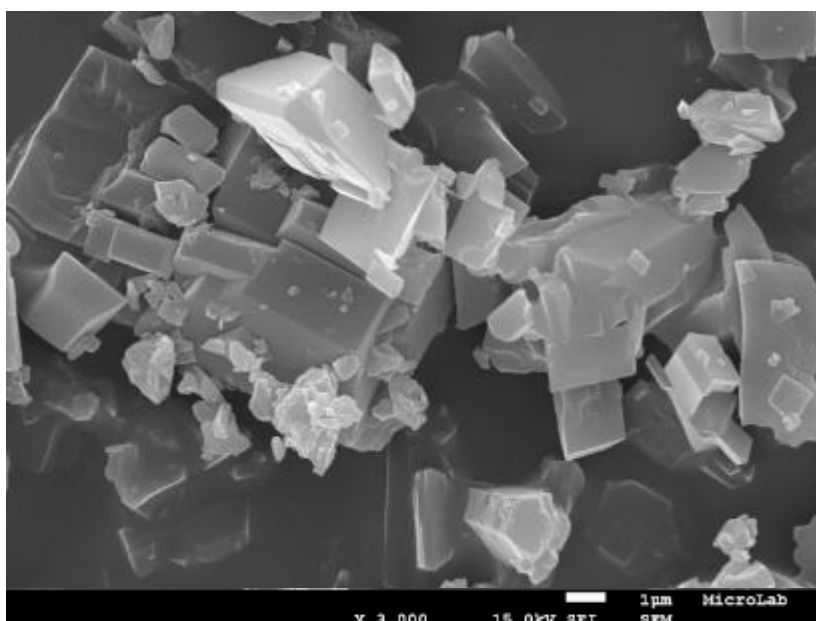
**Figura 47** – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

### Ensaio CCD2 – 50 °C 100 bar 40 mg/mL 3 mL/min

No segundo ensaio da matriz CCD conjugou-se o valor médio de temperatura com o valor máximo de caudal de solução a injetar. A análise macroscópica ao produto micronizado foi efetuada logo após a extração do copo de precipitação do vaso, neste o ácido fusídico micronizado encontrava-se em grande quantidade disperso por todo o copo. Após a análise das imagens de SEM, figuras 48 e 49, verifica-se que as partículas apresentam formas bem definidas.

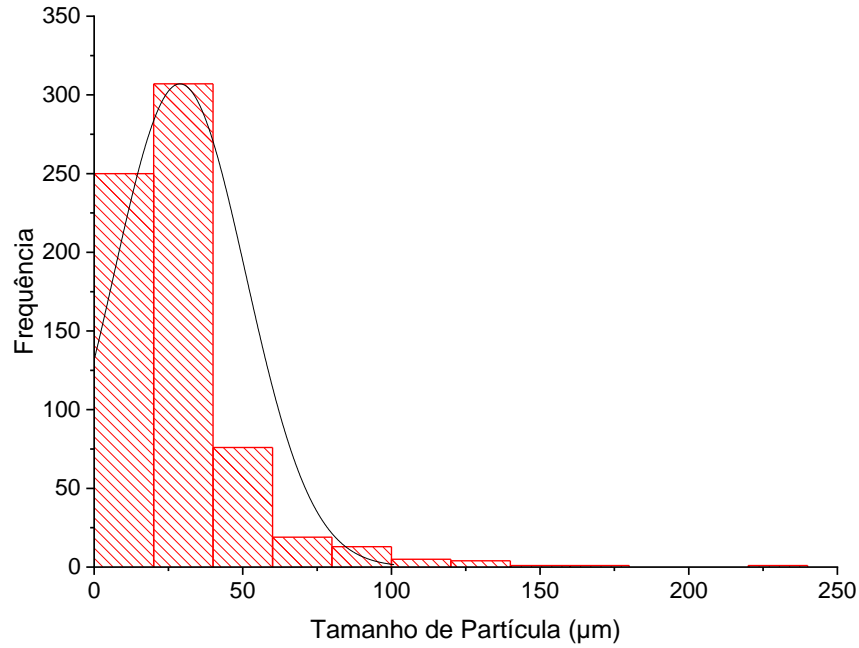


**Figura 48** - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio CCD2 com uma ampliação de 100x.



**Figura 49** - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio CCD2 com uma ampliação de 3000x.

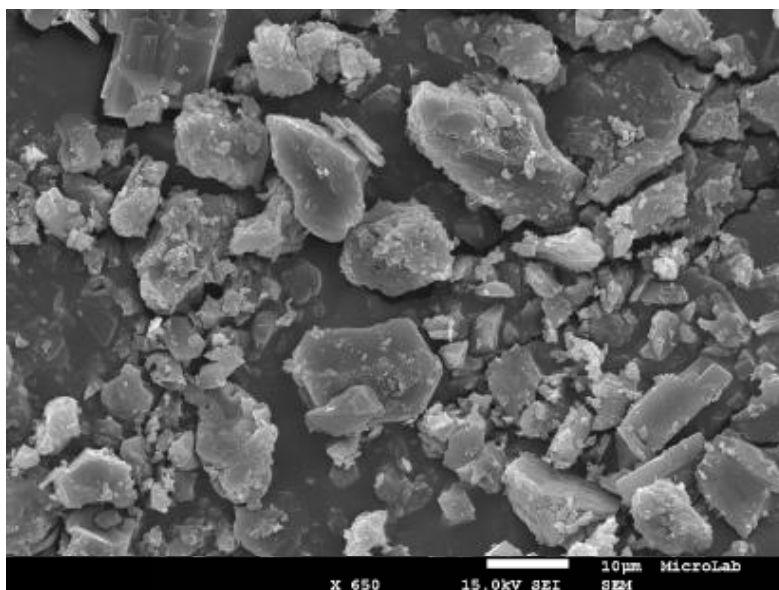
Na figura 48 a ampliação de 100x mostra os diferentes tamanhos de partículas presente na amostra. A figura 49 com a ampliação de 3000x mostra um plano mais aproximado das partículas permitindo ter uma melhor noção sobre as suas dimensões e a sua morfologia. O tamanho médio de partícula e a distribuição de tamanhos de partícula para este ensaio foram obtidos por tratamento de imagem utilizando o *ImageJ*, tendo a amostra um tamanho de partícula de 28,840  $\mu\text{m}$  e desvio padrão de 22,142  $\mu\text{m}$ . A distribuição do tamanho de partícula está representada na figura 50.



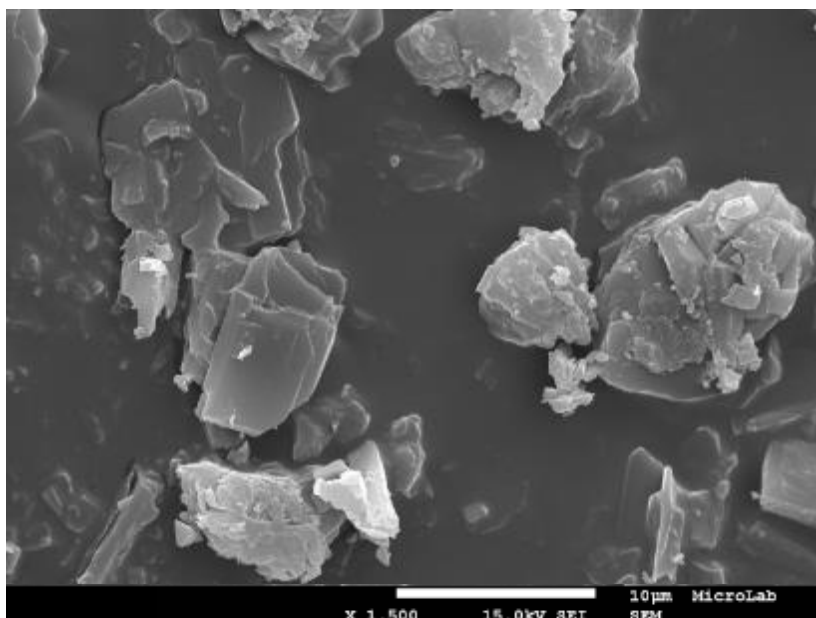
**Figura 50** – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

### Ensaio CCD3 – 60 °C 100 bar 40 mg/mL 1,75 mL/min

No terceiro ensaio da matriz CCD3 conjugou-se o valor máximo de temperatura com o valor médio de caudal de solução a injetar. A análise macroscópica ao produto micronizado foi efetuada logo após a extração do copo de precipitação do vaso, neste o ácido fusídico micronizado encontrava-se em grande quantidade disperso por todo o copo. Após a análise das imagens de SEM, figuras 51 e 52, verifica-se que as partículas apresentam formas bem definidas.

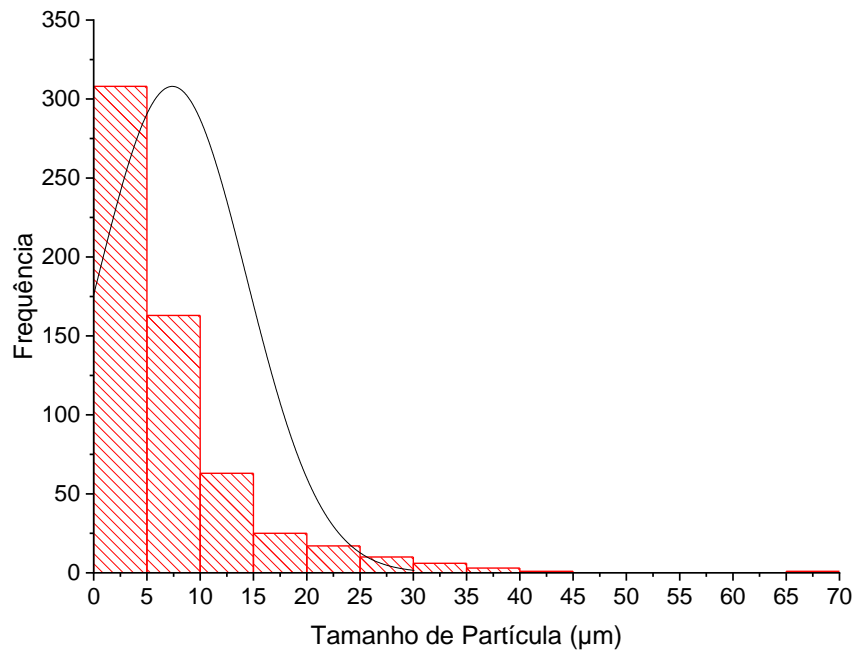


**Figura 51** - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio CCD3 com uma ampliação de 650x.



**Figura 52** - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio CCD3 com uma ampliação de 1500x.

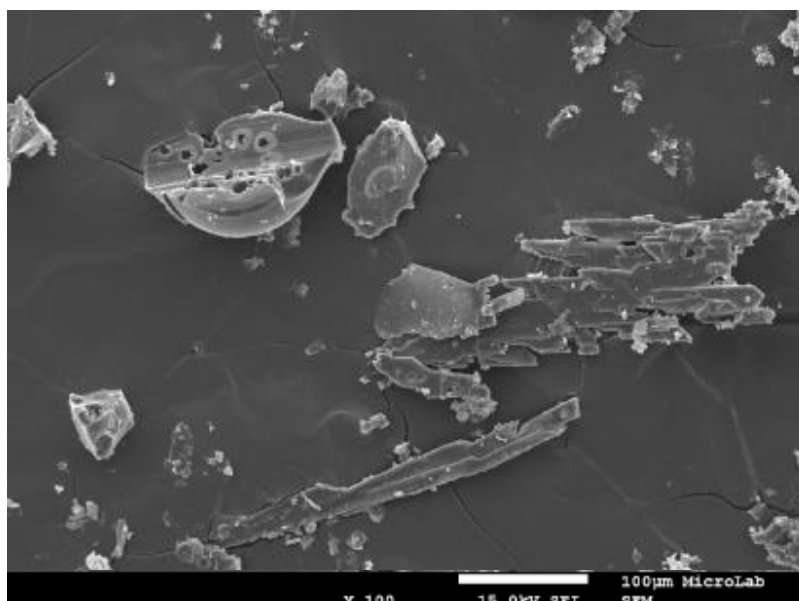
Na figura 51 a ampliação de 650x mostra a uniformidade desta amostra. A figura 52 com a ampliação de 1500x mostra um plano mais aproximado das partículas permitindo ter uma melhor noção sobre as suas dimensões e morfologias. O tamanho médio de partícula e a distribuição de tamanhos de partícula para este ensaio foram obtidos por tratamento de imagem, tendo 7,382  $\mu\text{m}$  e 6,973  $\mu\text{m}$ , respetivamente. A distribuição do tamanho de partícula está representada na figura 53.



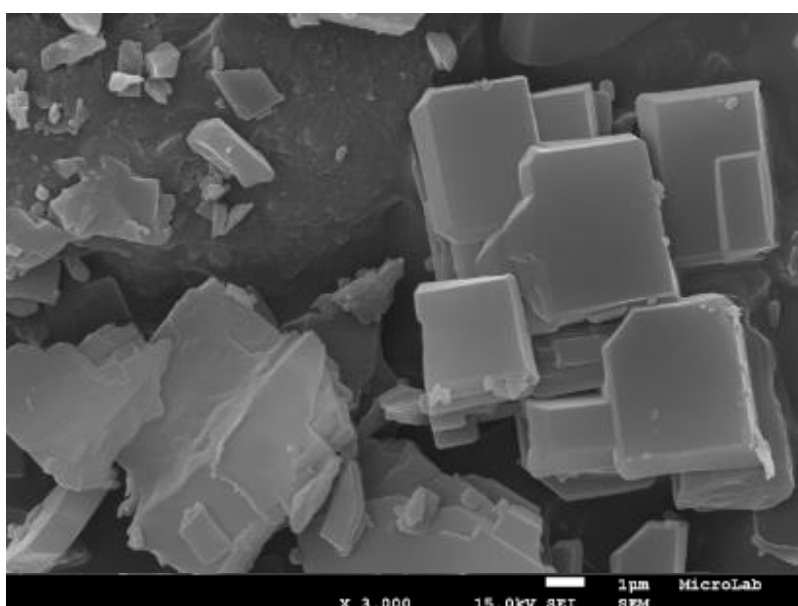
**Figura 53** – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

### Ensaio CCD7 – 50 °C 100 bar 40 mg/mL 1,75 mL/min

No sétimo ensaio da matriz CCD7 conjugou-se os valores médios dos dois fatores em estudo. A análise macroscópica ao produto micronizado foi efetuada logo após a extração deste do copo de precipitação, verificou-se a presença de bastantes cristais na amostra. Após a análise das imagens de SEM, figuras 54 e 55, verifica-se a existência de diversos tamanhos de partícula, correspondente à formação dos cristais, e verifica-se, também, que as partículas apresentam formas bem definidas, tendo as partículas de maior tamanho um aspeto laminado enquanto que as partículas de menor tamanho apresentam uma forma com arestas mais bem definidas.

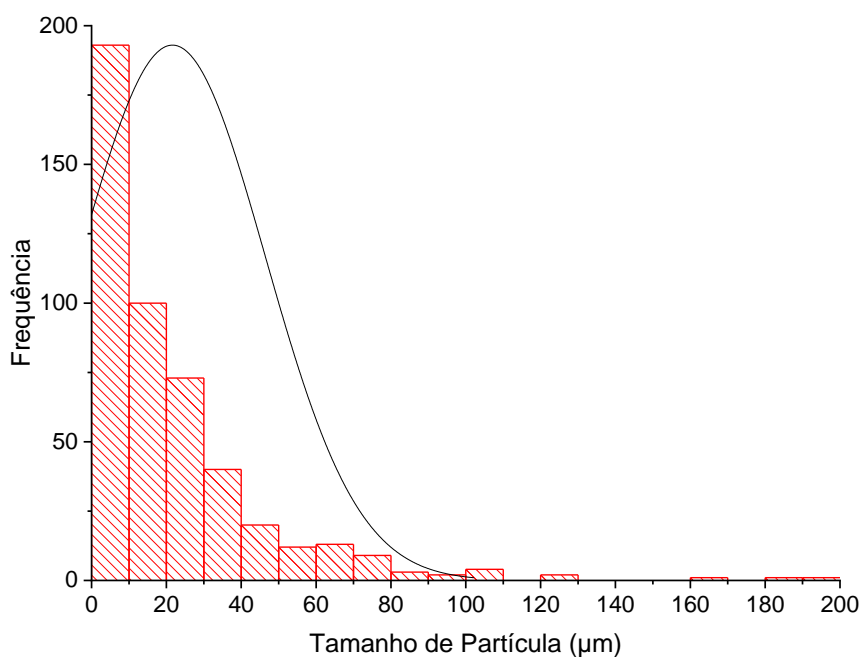


**Figura 54** - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio CCD7 com uma ampliação de 100x.



**Figura 55** - Imagem de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio CCD7 com uma ampliação de 3000x.

Na figura 54 a ampliação de 100x mostra o tipo de partículas existentes na amostra bem como uma percepção dos diferentes tamanhos presentes nesta. A figura 55 com a ampliação de 3000x mostra um plano mais aproximado das partículas permitindo ter uma melhor noção sobre as suas dimensões e morfologias. O tamanho médio de partícula e a distribuição de tamanhos de partícula para este ensaio foram obtidos por tratamento de imagem, sendo  $21,620 \mu\text{m} \pm 24,734 \mu\text{m}$ . A distribuição do tamanho de partícula está representada na figura 56.

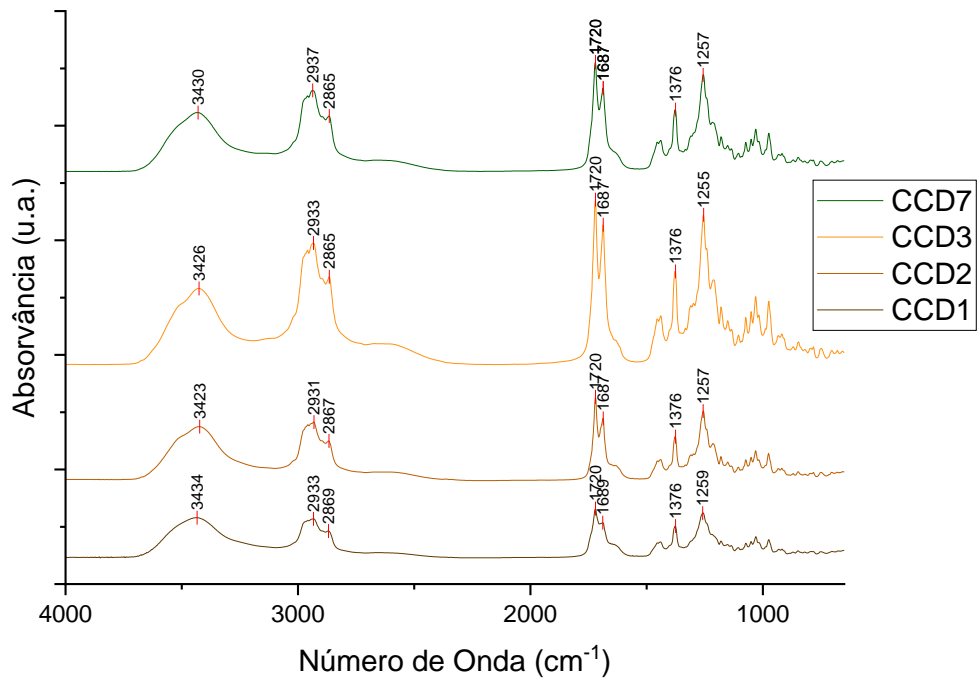


**Figura 56** – Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

#### 4.1.2.2 Análise da pureza – Espectroscopia de Infravermelhos (FTIR)

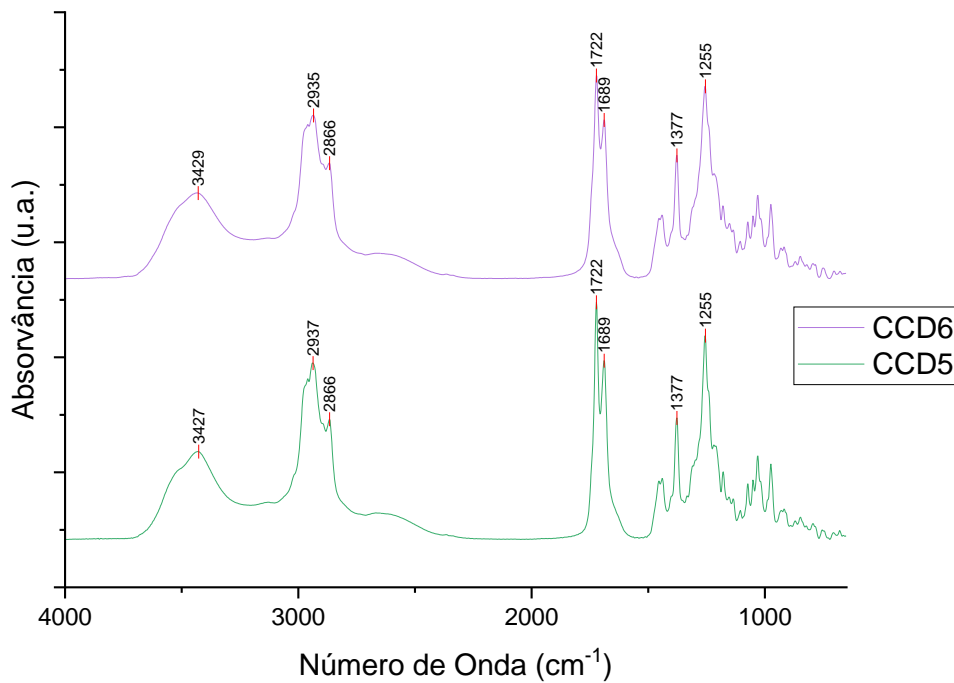
A análise do ácido fusídico micronizado obtido a partir das condições da matriz CCD foi efetuada por espectroscopia de infravermelhos, onde, à semelhança da anterior, foi testada a pureza do composto, podendo ser possível confirmar que o processo SAS não degrada o ácido fusídico.

Na figura 57 encontram-se representados os espectros de infravermelhos obtidos para todos os ensaios efetuados na matriz CCD.



**Figura 57** - Representação dos espectros de infravermelho do ácido fusídico micronizado obtido para cada ensaio CCD efetuado.

Na figura 58 encontra-se representado os espectros de CCD5 e CCD6, ensaios comuns nas duas matrizes efetuadas.



**Figura 58** - Comparação entre os espectros de infravermelho do ácido fusídico micronizado obtido no ensaio CCD5 e CCD6.

Analisando os espectros de infravermelhos obtidos é possível concluir que o produto micronizado não sofreu degradação apresentando os picos característicos das diferentes ligações do ácido fusídico, a aproximadamente  $3430\text{ cm}^{-1}$  encontra-se a banda associada à ligação O-H, a cerca de  $2930\text{ cm}^{-1}$  encontra-se vibração *stretching* da ligação C-H, a  $1720\text{ cm}^{-1}$  encontra-se a vibração *stretching* da ligação C=O do grupo carbonilo e acetilo, e por fim a  $1377\text{ cm}^{-1}$  e  $1255\text{ cm}^{-1}$  estão representadas as bandas correspondentes às vibrações *bending* C-H e *stretching* da ligação C-O do grupo carbonilo, correspondentemente. Desta análise é possível concluir que o ácido fusídico micronizado às condições dos ensaios CCD1, 2, 3, 5, 6 e 7 correspondem à forma polimórfica III uma vez que estes são caracterizados por um pico duplo na zona entre  $1650$  e  $1750\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.1.2.3 Análise Estatística – CCD

A análise estatística do *Central Composite Design*, à semelhança da análise estatística efetuada anteriormente, foi realizada pelo software *Design Expert 10*. A matriz CCD é composta por 7 ensaios, cujo ponto central da matriz foi repetido cinco vezes, contudo uma dessas repetições não foi contabilizada pois através da análise de imagem verificou-se que esta não era semelhante às restantes repetições. A análise estatística teve início na avaliação do modelo, que foi realizada utilizando um modelo polinomial de ordem quadrática.

A avaliação do modelo foi validada pelo grau de liberdade associado à matriz CCD que é suficiente para determinar o *lack of fit*. Para garantir um teste válido de *lack of fit* é necessário um mínimo de 3 graus de liberdade para o *lack of fit* e de 4 graus de liberdade para o erro. Na avaliação do modelo obteve-se 3 e 4 graus de liberdade, respetivamente, o que são valores suficientes para afirmar que o modelo é válido. Outro termo que determina a validação do modelo é a Eficiência G, que está relacionada inversamente com a máxima variância, 0,790, e tende a reduzir com as repetições. Para a avaliação do modelo a Eficiência G obtida foi de 58,4%, que foi o valor mais alto que se conseguiu obter, comparando com as diferentes ordens e modelos que se podem aplicar na avaliação.

Com a avaliação do modelo concluída é necessário realizar a análise de variância (ANOVA) ao fator de resposta da matriz, o tamanho médio de partícula, que necessita que uma transformação logarítmica para ajustar de melhor forma o modelo.

A tabela 9 apresenta a análise ANOVA para o fator de resposta, que foi efetuada ao com uma ordem quadrática para o modelo, que foi sugerida pelo software *Design Expert*.

**Tabela 9** - Resultados obtidos na análise ANOVA para o fator de resposta tamanho de partícula.

	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Média dos quadrados</b>	<b>F-value</b>	<b>P-value</b>
<b>Modelo</b>	18,65	4	4,66	19,52	0,003
<b>A-Temperatura</b>	7,9	1	7,9	33,05	0,0022
<b>B-Caudal</b>	3,68	1	3,68	15,39	0,0112
<b>AB</b>	2,67	1	2,67	11,2	0,0204
<b>A<sup>2</sup></b>	6,22	1	6,22	26,03	0,0038
<b>Lack of fit</b>	0,39	2	0,19	0,72	0,5556
<b>Erro</b>	0,81	3	0,27		
<b>Cor Total</b>	19,84	9			

Para a realização deste modelo, foi removido o termo correspondente ao quadrado do caudal por sugestão do software. O *f-value* do modelo é 19,52 o que significa que o modelo é significativo, uma vez que existe apenas uma probabilidade de 0,30% deste valor depender do ruído do modelo. Os fatores cujo *p-value* é inferior a 0,05 são considerados termos significativos do modelo. Assim, verifica-se que a temperatura, o caudal, a multiplicação entre os fatores e o quadrado da temperatura são termos significativos deste modelo. Na tabela 10 encontra-se os valores do modelo.

**Tabela 10** - Valores do modelo após a análise ANOVA.

<b>Desvio padrão</b>	0,49
<b>Média</b>	2,22
<b>C.V. %</b>	22,01
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9398
<b>Precisão</b>	15,114

O R<sup>2</sup> obtido para este modelo é de 0,9398 e o valor da precisão, que mede o sinal do ruído, é 26,015. Uma vez que este valor é superior a 4 indica que o sinal é adequado e o modelo é válido e pode ser utilizado na análise ANOVA.

A equação do modelo é obtida pelo *Design Expert 10* e na tabela 11 estão representados os coeficientes relacionados a cada fator em estudo e o erro associado.

Tabela 11 - Coeficientes de cada fator em estudo e o erro associado.

Fator	Coeficiente	Erro
Interceção	-50,38	8,11
A-Temperatura	1,85	0,32
B-Caudal	3,90	0,99
AB	-0,07	0,02
A <sup>2</sup>	-0,02	3,16 × 10 <sup>-4</sup> 3

Assim a equação final, equação 2, dos fatores para a análise ANOVA do tamanho de partícula. A equação pode ser utilizada para prever a variação do tamanho médio de partícula.

$$\ln(\text{Tamanho de partícula}) = -50,38 + 1,85 \times \text{Temperatura} - 3,90 \times \text{Caudal} - 0,07 \times \text{Temperatura} \times \text{Caudal} - 0,02 \times \text{Temperatura}^2 \quad (\text{Eq.2})$$

A otimização dos fatores pode ser efetuada numericamente ou graficamente com o auxílio do *Design Expert 10*. A otimização numérica analisa as combinações de fatores que satisfazem simultaneamente os requisitos pretendidos para o fator de resposta, neste caso o pretendido é minimizar o tamanho médio de partícula.

Para iniciar a otimização numérica é necessário definir os limites para os dois fatores de estudo. A temperatura irá variar entre 40 °C e 60 °C, enquanto que o caudal varia entre 0,5 mL/min e 3 mL/min. A otimização dá origem a 9 soluções, representadas na tabela 12, sendo a primeira solução obtida a que apresenta um valor mais perto do mínimo enquanto que a solução 9 apresenta um valor mais elevado.

**Tabela 12** - Soluções obtidas através da otimização do modelo.

<b>Solução</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Caudal (mL/min)</b>	<b>Tamanho de partícula (µm)</b>
1	40,00	0,500	0,223
2	40,00	0,513	0,226
3	40,16	0,500	0,242
4	40,00	0,682	0,281
5	40,64	0,500	0,310
6	40,00	0,938	0,390
7	40,00	1,938	1,404
8	40,00	2,188	1,934
9	60,00	3,000	12,457

O pós-análise do *Design Expert 10* permite inserir as condições de trabalho desejadas, para minimizar o tamanho médio de partícula, e determinar o valor de resposta previsto com intervalos de confiança. Permite, também, comparar o resultado previsto pelo modelo com o resultado obtido na realização da matriz CCD. Pela análise do modelo, verifica-se que a solução 1 apresenta o mínimo tamanho médio de partícula, aproximadamente 0,223 µm. As condições para obter este valor de resposta correspondem aos fatores mínimos dos fatores de estudo, ou seja, 40 °C e 0,5 mL/min, estas condições estão presentes na matriz inicial do *Central Composite Design*, correspondendo ao ensaio CCD4, onde se assumiu um tamanho de partícula de 0,187 µm. Este valor encontra-se inserido no intervalo de previsão obtido pelo pós-análise, entre 0,034 µm e 1,154 µm, o que significa que a previsão do modelo efetuada pelo software foi eficaz.

Como referido anteriormente, as micropartículas entre 1 e 3 µm são mais adequadas para que ocorra a libertação controlada do fármaco nas formulações oftálmicas. Sabe-se, também, que a forma polimórfica III é a mais estável do ácido fusídico em produtos farmacêuticos e pela observação dos espectros de IV obtidos anteriormente verificou-se que os compostos que apresentavam um tamanho de partícula na ordem dos micrómetros correspondiam à forma polimórfica III, assim, realizou-se uma segunda

otimização do modelo de forma a conseguir obter os valores dos fatores que permitem obter uma resposta favorável ao uso do ácido fusídico em formulações oftálmicas.

A otimização numérica foi efetuada de forma a obter os valores de resposta compreendidos entre 1 e 3  $\mu\text{m}$ , deixando os fatores de estudo com os valores que foram previamente estabelecidos. Esta otimização dá origem a 75 soluções, onde a temperatura varia entre 40 °C e 45,08 °C e o caudal de solução a injetar varia entre 0,560 mL/min e 2,552 mL/min.

## 5. Conclusão

Com o trabalho terminado é possível chegar a diversas conclusões sobre o processo de micronização do ácido fusídico.

A micronização com anti-solvente do ácido fusídico foi realizada com sucesso utilizando a acetona como solvente e o dióxido de carbono supercrítico como anti-solvente, sendo possível formar partículas micrométricas e nanométricas.

No *Fractional Factorial Design* (FFD) foram conseguidas partículas com diferentes tamanhos médios, entre 0,158 $\mu$ m e 15,462 $\mu$ m, e diferentes morfologias, podendo ser cristais bem definidos, que podem formar aglomerados de partículas, ou partículas com um formato menos definido. O menor tamanho médio de partícula foi obtido nas condições 40 °C, 100 bar, 10 mg/mL e 0,5 mL/min e o maior tamanho médio de partícula foi obtido nas condições de 60 °C, 100 bar, 40 mg/mL e 0,5 mL/min.

Após o estudo estatístico do *Fractional Factorial Design* foi possível concluir que a temperatura e o caudal são fatores significativos da micronização do ácido fusídico, o que permitiu realizar o *Central Composite Design* (CCD) a partir dos fatores significativos obtidos.

A otimização realizada após o CCD mostrou que as condições de 40 °C e 0,5 mL/min dão origem ao menor tamanho médio de partícula, por outro lado para obter valores de resposta na ordem dos 1 e 3  $\mu$ m, tamanhos mais adequados para a utilização do ácido fusídico em formulações oftálmicas, é necessário variar a temperatura entre 40 °C e 45,08 °C e o caudal de solução a injetar entre 0,560 mL/min e 2,552 mL/min.

A análise das partículas foi efetuada por espectroscopia de infravermelho e difração por raios-X. Uma análise inicial demonstrou que o produto obtido, tanto na matriz FFD como na matriz CCD, não sofreu degradação apresentando os picos característicos das diferentes ligações do ácido fusídico. Verificou-se, também, que existem dois tipos de polimorfos associados ao ácido fusídico a forma polimórfica I e a III. Nos ensaios efetuados verificou-se que a forma polimórfica III é a mais verificada, correspondendo às partículas com uma morfologia mais bem definida e com formato retangular. Apenas os ensaios com as partículas que apresentavam um formato menos definido, com formas arredondadas, eram da forma polimórfica I.

A difração de raios-X demonstrou que os ensaios identificados como serem da forma polimórfica III apresentavam picos de cristalinidade mais intensos, ao contrário dos ensaios identificados como formas polimórficas I onde os picos eram menos intensos e

em menor quantidade. Contudo, ao analisar os picos de difração e ao associar a formas polimórficas do ácido fusídico já conhecidas encontraram-se algumas contradições com a informação obtida pela espectroscopia de infravermelhos, o que pode ser explicado pelo facto dos padrões de difração poderem ser afetados por diferentes variáveis como o tamanho de partícula e a orientação da amostra, que poderá alterar com a variação do tamanho de partícula.

As perspetivas para trabalhos futuros na micronização com anti-solvente do ácido fusídico recaem na realização do *Central Composite Design*. Neste processo foi possível estudar a influência das condições experimentais no tamanho médios das partículas, através da utilização do desenho experimental. O objetivo do *Central Composite Design* é estudar detalhadamente os efeitos das condições mais significativas no tamanho médio de partícula de forma a ser possível realizar a sua otimização determinando as condições ótimas do processo para obter partículas mais pequenas. Contudo, as condições utilizadas para a realização do CCD neste trabalho dão origem a tamanhos de partícula muito elevados, o que dificulta a otimização posterior do processo. Para futuros trabalhos seria importante realizar uma nova matriz CCD onde o caudal de solução a injetar não atingisse valores tão elevados, uma vez que se verificou que era possível atingir tamanhos de partícula mais pequenos com caudais de injeção mais baixos. É importante avaliar, também, o ensaio 3 da matriz FFD, de forma a compreender se as condições associadas a esta medida não permitem que ocorra a micronização do ácido fusídico.

É de notar, também, que a matriz CCD realizada neste trabalho apresentou alguns problemas associados ao equipamento experimental, nomeadamente a algumas avarias nas bombas que prolongou os ensaios laboratoriais e que impossibilitaram a realização correta desta matriz, sendo que por questões temporais do trabalho não foi possível finalizar o mesmo. Desta forma, será bastante importante em ensaios futuros realizar a nova matriz CCD com caudais de injeção mais baixos de forma a ser possível verificar melhor a viabilidade do processo e a sua aplicação.

## Bibliografia

- [1] A. H. L. Chow, H. H. Y. Tong, P. Chattopadhyay, and B. Y. Shekunov, "Particle engineering for pulmonary drug delivery," *Pharm. Res.*, vol. 24, pp. 411–437, 2007.
- [2] E. Badens, Y. Masmoudi, A. Mouahid, and C. Crampon, "Current situation and perspectives in drug formulation by using supercritical fluid technology," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 134, pp. 274–283, 2018.
- [3] B. Y. Shekunov, P. Chattopadhyay, H. H. Y. Tong, and A. H. L. Chow, "Particle size analysis in pharmaceuticals: Principles, methods and applications," *Pharm. Res.*, vol. 24, pp. 203–227, 2007.
- [4] Á. Tenorio, M. D. Gordillo, C. M. Pereyra, and E. J. M. De La Ossa, "Relative importance of the operating conditions involved in the formation of nanoparticles of ampicillin by supercritical antisolvent precipitation," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 46, pp. 114–123, 2007.
- [5] D. Liu, P. Figueiredo, J. T. Hirvonen, H. A. Santos, F. Fontana, and P. Zhang, "Production of pure drug nanocrystals and nano co-crystals by confinement methods," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 131, pp. 3–21, 2018.
- [6] L. Padrela, M. A. Rodrigues, A. Duarte, A. M. A. Dias, M. E. M. Braga, and H. C. de Sousa, "Supercritical carbon dioxide-based technologies for the production of drug nanoparticles/nanocrystals – A comprehensive review," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 131, pp. 22–78, 2018.
- [7] O. Nuchuchua, M. R. Nejadnik, S. C. Goulooze, N. J. Lješević, H. A. Every, and W. Jiskoot, "Characterization of drug delivery particles produced by supercritical carbon dioxide technologies," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 128, pp. 244–262, 2017.
- [8] E. Reverchon and G. Della Porta, "Micronization of antibiotics by supercritical assisted atomization," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 26, pp. 243–252, 2003.
- [9] Ž. Knez, M. Knez Hrnčič, and M. Škerget, "Particle Formation and Product Formulation Using Supercritical Fluids," *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, vol. 6, pp. 379–407, 2015.
- [10] R. L. Mendes, B. P. Nobre, M. T. Cardoso, A. P. Pereira, and A. F. Palavra, "Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae," *Inorganica Chim. Acta*, vol. 356, pp. 328–334, 2003.

- [11] J. N. Hay and A. Khan, "Environmentally friendly coatings using carbon dioxide as the carrier medium," *J. Mater. Sci.*, vol. 37, pp. 4743–4752, 2002.
- [12] M. Mukhopadhyay, *Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide*, 1st ed. Florida: CRC Press, 2000.
- [13] M. I. Cabaço, S. Longelin, Y. Danten, and M. Besnard, "Local density enhancement in supercritical carbon dioxide studied by Raman spectroscopy," *J. Phys. Chem. A*, vol. 111, pp. 12966–12971, 2007.
- [14] A. Taberner, E. M. Martín del Valle, and M. A. Galán, "Supercritical fluids for pharmaceutical particle engineering: Methods, basic fundamentals and modelling," *Chem. Eng. Process. Process Intensif.*, vol. 60, pp. 9–25, 2012.
- [15] R. Campardelli, L. Baldino, and E. Reverchon, "Supercritical fluids applications in nanomedicine," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 101, pp. 193–214, 2015.
- [16] N. Esfandiari, "Production of micro and nano particles of pharmaceutical by supercritical carbon dioxide," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 100, pp. 129–141, 2015.
- [17] Á. Tenorio, M.D. Gordillo, C.M. Pereyra, and E. J. M. De La Ossa, "Screening design of experiment applied to supercritical antisolvent precipitation of amoxicillin," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 44, pp. 230–237, 2008.
- [18] R. Campardelli, E. Reverchon, and I. De Marco, "Dependence of SAS particle morphologies on the ternary phase equilibria," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 130, pp. 273–281, 2017.
- [19] A. Montes, C. Pereyra, and E. J. M. De La Ossa, "Screening design of experiment applied to the supercritical antisolvent precipitation of quercetin," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 104, pp. 10–18, 2015.
- [20] E. Reverchon and G. Della Porta, "Particle Design Using Supercritical Fluids," *Chem. Eng. Technol.*, vol. 26, pp. 840–845, 2003.
- [21] I. De Marco and E. Reverchon, "Influence of pressure, temperature and concentration on the mechanisms of particle precipitation in supercritical antisolvent micronization," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 58, pp. 295–302, 2011.
- [22] J. O. Werling and P. G. Debenedetti, "Numerical modeling of mass transfer in the supercritical antisolvent process: miscible conditions," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 18, pp. 11–24, 2000.
- [23] J. O. Werling and P. G. Debenedetti, "Numerical modeling of mass transfer in the supercritical antisolvent process," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 16, pp. 167–181, 1999.

- [24] A. Montes, Á. Tenorio, M. D. Gordillo, C. Pereyra, and E. J. M. De La Ossa, "Screening design of experiment applied to supercritical antisolvent precipitation of amoxicillin: Exploring new miscible conditions," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 51, pp. 399–403, 2010.
- [25] E. Reverchon and I. De Marco, "Mechanisms controlling supercritical antisolvent precipitate morphology," *Chem. Eng. J.*, vol. 169, pp. 358–370, 2011.
- [26] E. Reverchon, I. De Marco, and E. Torino, "Nanoparticles production by supercritical antisolvent precipitation: A general interpretation," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 43, pp. 126–138, 2007.
- [27] S. H. Soh and L. Y. Lee, "Microencapsulation and nanoencapsulation using supercritical fluid (SCF) techniques," *Pharmaceutics*, vol. 11, pp. 1–17, 2019.
- [28] F. Marra, I. De Marco, and E. Reverchon, "Numerical analysis of the characteristic times controlling supercritical antisolvent micronization," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 71, pp. 39–45, 2012.
- [29] V. Prosapio, I. De Marco, and E. Reverchon, "Supercritical antisolvent coprecipitation mechanisms," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 138, pp. 247–258, 2018.
- [30] E. Reverchon, G. Della Porta, D. Sannino, and P. Ciambelli, "Supercritical antisolvent precipitation of nanoparticles of a zinc oxide precursor," *Powder Technol.*, vol. 102, pp. 127–134, 1999.
- [31] E. Reverchon, G. Della Porta, A. Di Trolio, and S. Pace, "Supercritical Antisolvent Precipitation of Nanoparticles of Superconductor Precursors," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 37, pp. 952–958, 1998.
- [32] E. Reverchon, I. De Marco, and G. Della Porta, "Tailoring of nano- and micro-particles of some superconductor precursors by supercritical antisolvent precipitation," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 23, pp. 81–87, 2002.
- [33] E. Reverchon, G. Della Porta, I. De Rosa, P. Subra, and D. Letourneur, "Supercritical antisolvent micronization of some biopolymers," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 18, pp. 239–245, 2000.
- [34] E. Reverchon and G. Della Porta, "Production of antibiotic micro- and nanoparticles by supercritical antisolvent precipitation," *Powder Technol.*, vol. 106, pp. 23–29, 1999.
- [35] E. Reverchon and I. De Marco, "Supercritical antisolvent micronization of

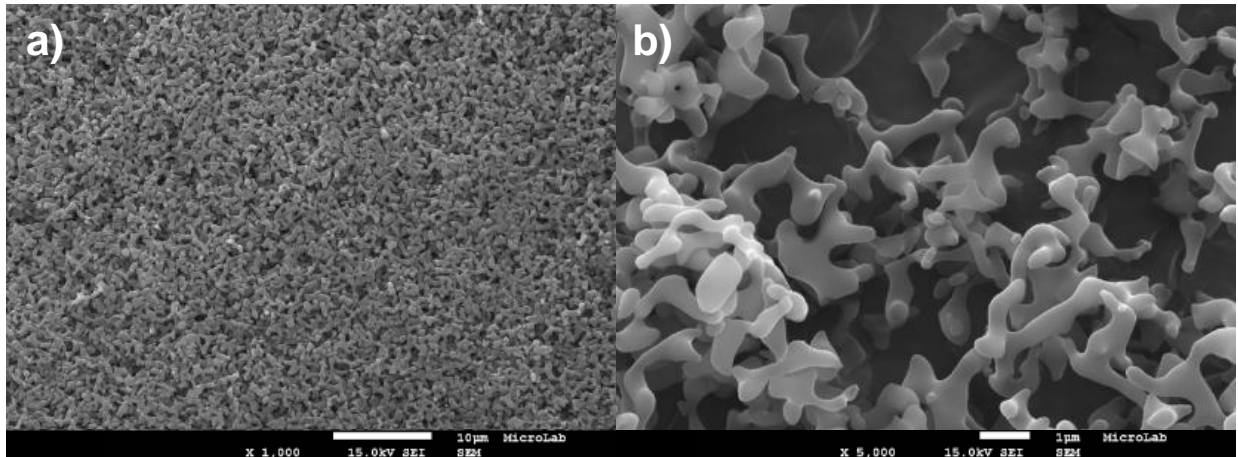
- Cefonicid: Thermodynamic interpretation of results," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 31, pp. 207–215, 2004.
- [36] E. Reverchon and I. De Marco, "Supercritical antisolvent precipitation of Cephalosporins," *Powder Technol.*, vol. 164, pp. 139–146, 2006.
- [37] M. S. Kim, S. Lee, J. S. Park, J. S. Woo, and S. J. Hwang, "Micronization of cilostazol using supercritical antisolvent (SAS) process: Effect of process parameters," *Powder Technol.*, vol. 177, pp. 64–70, 2007.
- [38] A. Montes, Á. Tenorio, M. D. Gordillo, C. M. Pereyra, and E. J. M. De La Ossa, "Supercritical antisolvent precipitation of ampicillin in complete miscibility conditions," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 50, pp. 2343–2347, 2011.
- [39] M. T. Fernández-Ponce, Y. Masmoudi, R. Djerafi, L. Casas, C. Mantell, E. M. de la Ossa, and E. Badens, "Particle design applied to quercetin using supercritical anti-solvent techniques," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 105, pp. 119–127, 2015.
- [40] A. Montes, L. Wehner, C. Pereyra, and E. J. Martínez de la Ossa, "Precipitation of submicron particles of rutin using supercritical antisolvent process," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 118, pp. 1–10, 2016.
- [41] A. M. Vorobei, O. I. Pokrovskiy, K. B. Ustinovich, L. I. Krotova, O. O. Parenago, and V. V. Lunin, "Effect of solvent type and concentration on size and morphology of arbidol microparticles obtained by supercritical antisolvent precipitation," *Russ. J. Phys. Chem. B*, vol. 10, pp. 1072–1077, 2016.
- [42] J. Byrne, R. Reinhardt, and T. Velasco-Torrijos, "Polymorphism in Commercial Sources of Fusidic Acid: A Comparative Study of the In Vitro Release Characteristics of Forms I and III from a Marketed Pharmaceutical Cream," *J. Anal. Methods Chem.*, vol. 2017, pp. 1–7, 2017.
- [43] P. P. Wu, H. He, W. D. Hong, T. R. Wu, G. Y. Huang, Y. Y. Zhong, B. R. Tu, M. Gao, J. Zhou, S. Q. Zhao, D. L. Li, X. T. Xu, Z. J. Sheng, S. A. Ward, P. M. O'neill, and K. Zhang, "The biological evaluation of fusidic acid and its hydrogenation derivative as antimicrobial and anti-inflammatory agents," *Infect. Drug Resist.*, vol. 11, pp. 1945–1957, 2018.
- [44] M. J. Perry, L. M. Stacey, M. W. Adlard, and W. C. Noble, "Fusidane Antibiotics Produced By Dermatophytes," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. XXXVI, pp. 1659–1663, 1983.
- [45] E. Marian, N. Duteanu, L. Vicas, B. Tita, P. Sfirloaga, and T. Jurca, "Purity

- determination of fusidic acid using physico-chemical methods," *Rev. Chim.*, vol. 68, pp. 1435–1437, 2017.
- [46] S. E. Gilchrist, K. Letchford, and H. M. Burt, "The solid-state characterization of fusidic acid," *Int. J. Pharm.*, vol. 422, pp. 245–253, 2012.
- [47] M. A. T. Cardoso, S. Antunes, F. van Keulen, B. S. Ferreira, A. Geraldés, J. M. S. Cabral, and A. M. F. Palavra, "Supercritical antisolvent micronisation of synthetic all-trans- $\beta$ -carotene with tetrahydrofuran as solvent and carbon dioxide as antisolvent," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 84, pp. 215–222, 2009.
- [48] J. M. F. Figueiredo, T. J. V. Prazeres, J. M. S. Cabral, J. M. G. Martinho, J. P. Cardoso, M. A. T. Cardoso, G. A. Monteiro, and A. M. F. Palavra, "Supercritical antisolvent micronization of minocycline hydrochloride," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 44, pp. 238–244, 2007.
- [49] P. Subra and P. Jestin, "Screening Design of Experiment ( DOE ) Applied to Supercritical Antisolvent Process," *Ind.Eng.Chem.Res*, vol. 39, pp. 4178–4184, 2000.
- [50] C. Guo, X. Luo, X. Zhou, B. Shi, and J. Wang, "Quantitative analysis of binary polymorphs mixtures of fusidic acid by diffuse reflectance FTIR spectroscopy , diffuse reflectance FT-NIR spectroscopy , Raman spectroscopy and multivariate calibration," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 140, pp. 130–136, 2017.

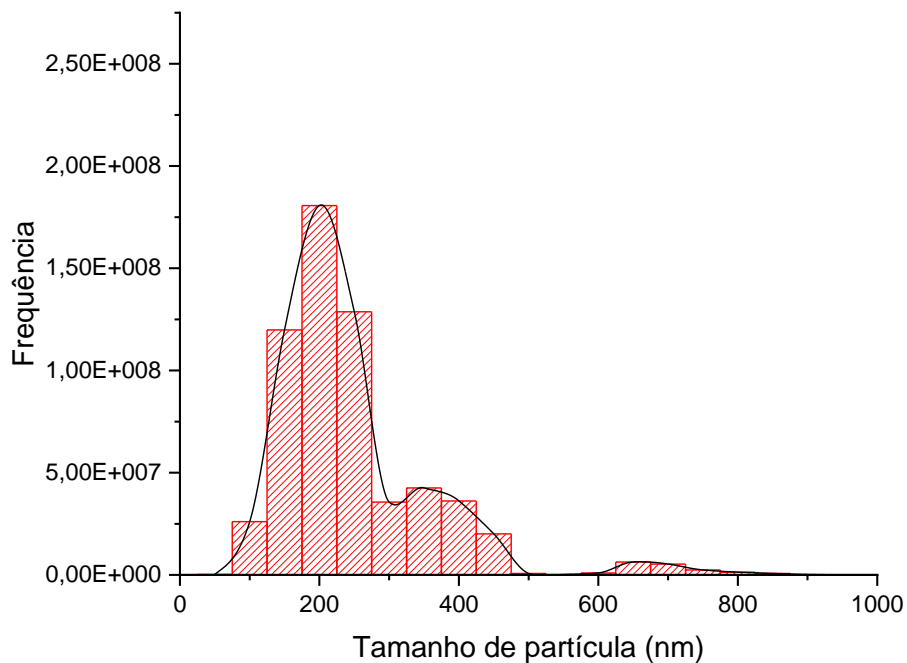
## Anexo A

### Repetição do ensaio 1 – 40 °C 100 bar 10 mg/mL 0,5 mL/min

O tamanho médio de partícula e o desvio padrão associado, 0,222  $\mu\text{m}$  e 0,114  $\mu\text{m}$  respectivamente. Na figura 59 encontra-se representado as imagens SEM da amostra e a figura 60 corresponde à representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula.



**Figura 59** - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 1: a) Ampliação de 1000x e b) ampliação 5000x.

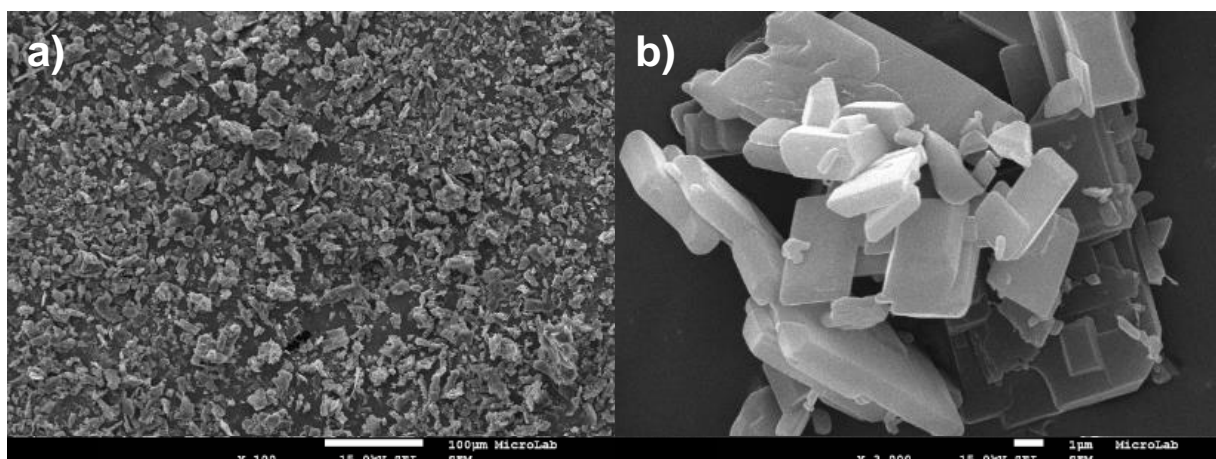


**Figura 60** - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

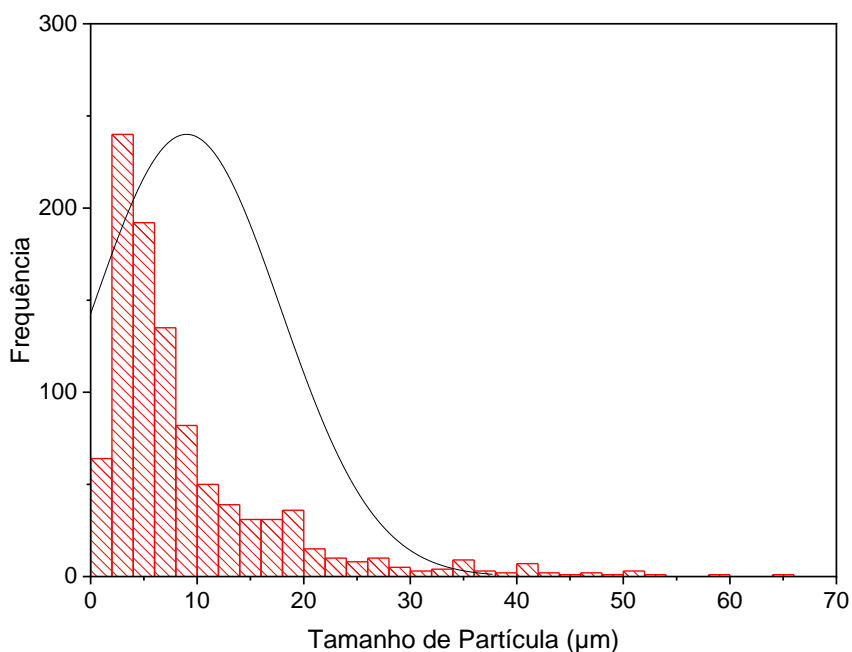
## Anexo B

### Repetição do ensaio 2 – 60 °C 100 bar 10 mg/mL 3 mL/min

O tamanho médio de partícula e o desvio padrão associado, 9,008  $\mu\text{m}$  e 7,928  $\mu\text{m}$  respectivamente. Na figura 61 encontra-se representado as imagens SEM da amostra e a figura 62 corresponde à representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula.



**Figura 61** - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 2: a) Ampliação de 100x e b) ampliação 3000x.

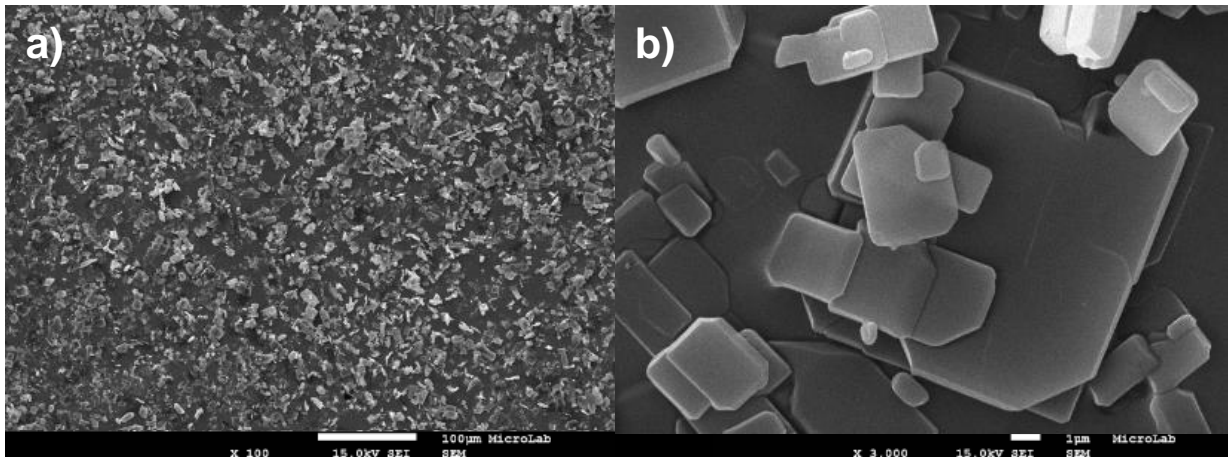


**Figura 62** - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

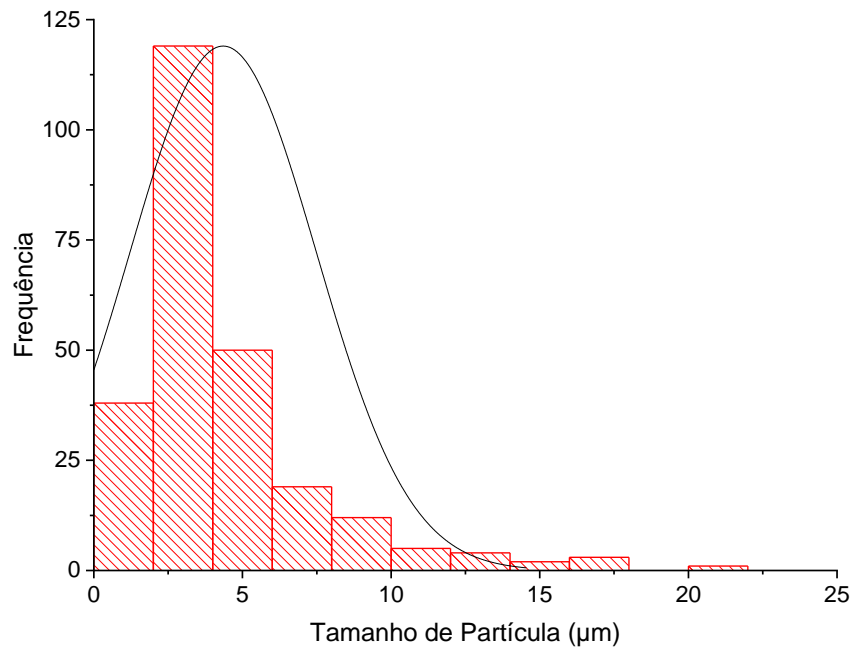
## Anexo C

### Repetição do Ensaio 4 – 60 °C 200 bar 10 mg/mL 0,5 mL/min

O tamanho médio de partícula e o desvio padrão associado, 4,350  $\mu\text{m}$  e 2,483  $\mu\text{m}$  respectivamente. Na figura 63 encontra-se representado as imagens SEM da amostra e a figura 64 corresponde à representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula.



**Figura 63** - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 4: a) Ampliação de 100x e b) ampliação 3000x.

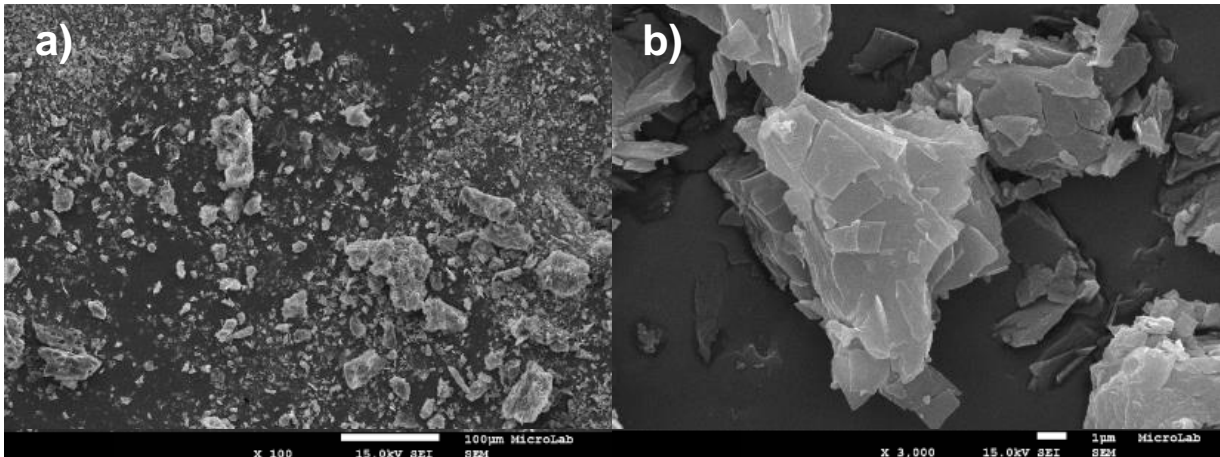


**Figura 64** - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

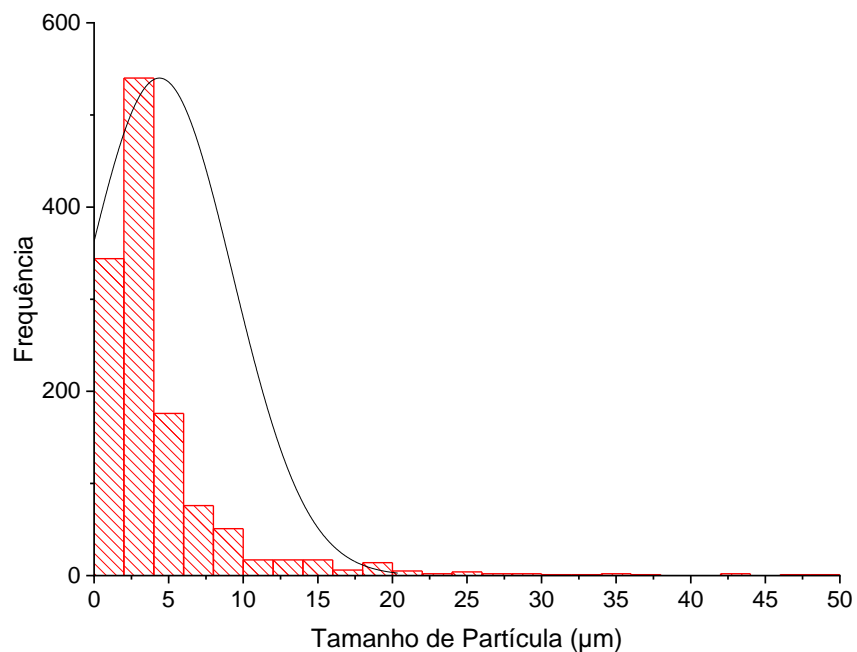
## Anexo D

### Repetição do Ensaio 5 – 40 °C 100 bar 40 mg/mL 3 mL/min

O tamanho médio de partícula e o desvio padrão associado, 4,377  $\mu\text{m}$  e 6,342  $\mu\text{m}$  respectivamente. Na figura 65 encontra-se representado as imagens SEM da amostra e a figura 66 corresponde à representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula



**Figura 65** - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 5: a) Ampliação de 100x e b) ampliação 3000x.

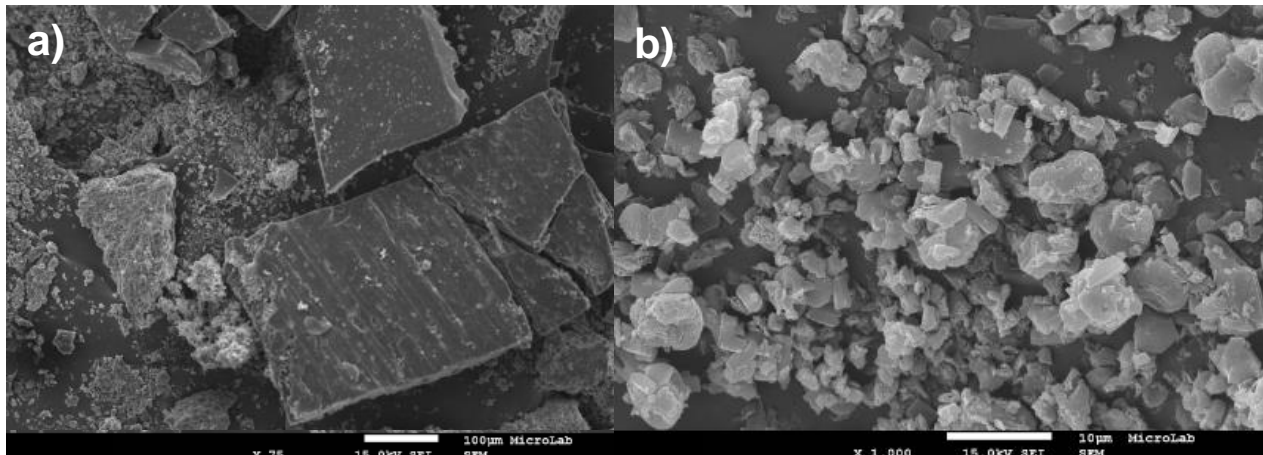


**Figura 66** - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

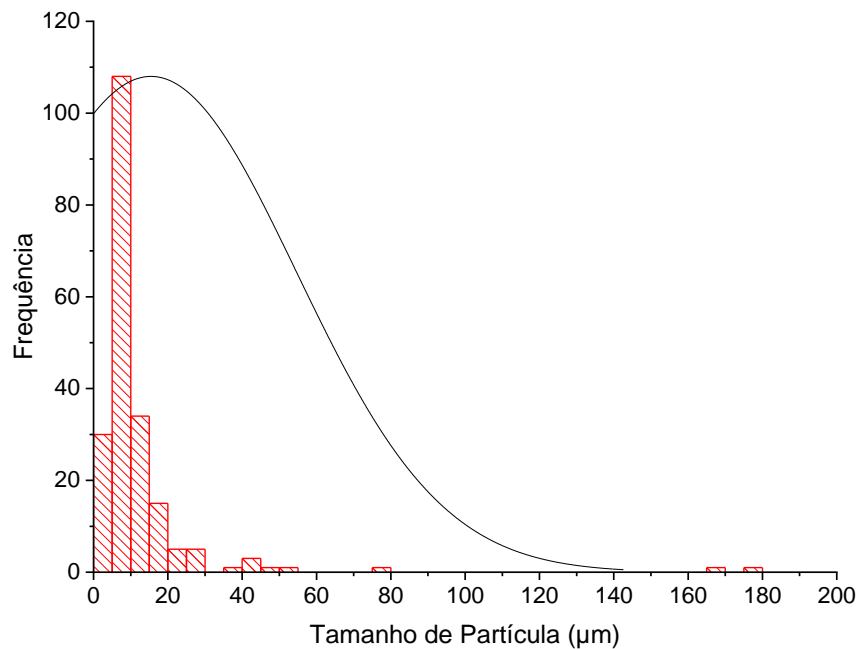
## Anexo E

### Repetição do Ensaio 6 – 60 °C 100 bar 40 mg/mL 0,5 mL/min

O tamanho médio de partícula e o desvio padrão associado, 15,462  $\mu\text{m}$  e 25,453  $\mu\text{m}$  respectivamente. Na figura 67 encontra-se representado as imagens SEM da amostra e a figura 68 corresponde à representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula.



**Figura 67** - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 6: a) Ampliação de 75x e b) ampliação 1000x.

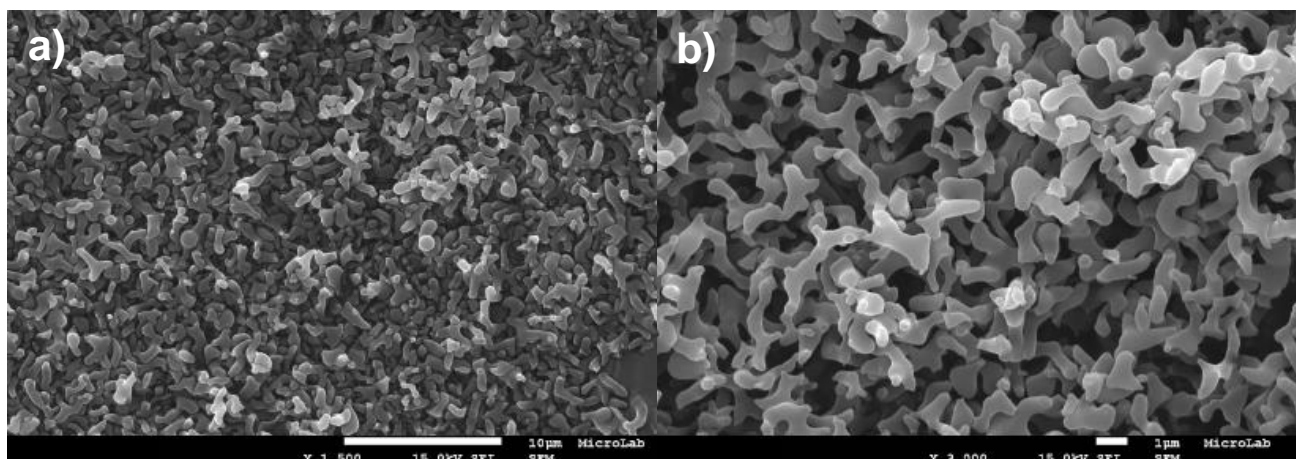


**Figura 68** - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

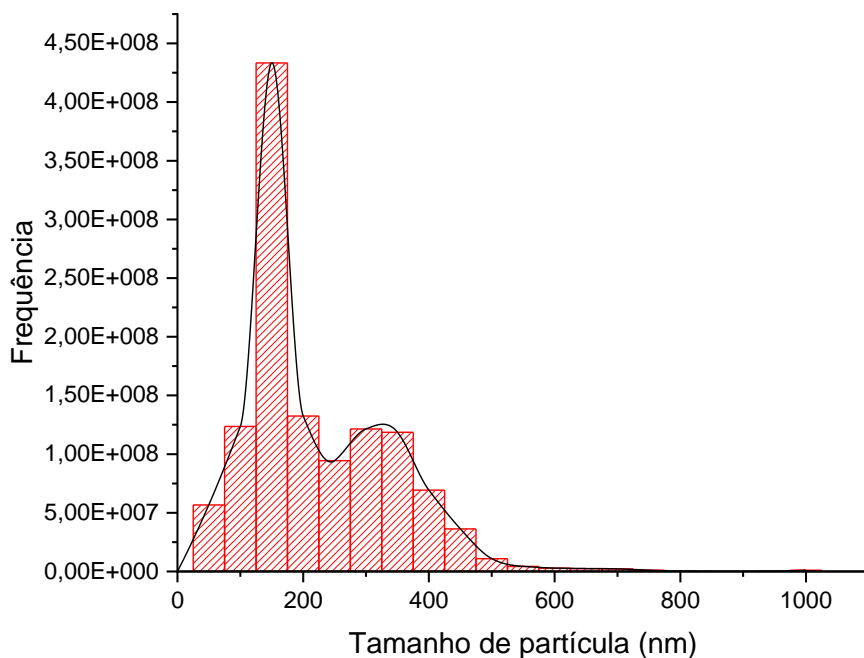
## Anexo F

### Repetição do Ensaio 7 – 40 °C 200 bar 40 mg/mL 0,5 mL/min

O tamanho médio de partícula e o desvio padrão associado, 0,193  $\mu\text{m}$  e 0,116  $\mu\text{m}$  respectivamente. Na figura 69 encontra-se representado as imagens SEM da amostra e a figura 70 corresponde à representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula.



**Figura 69** - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 7: a) Ampliação de 1500x e b) ampliação 3000x.

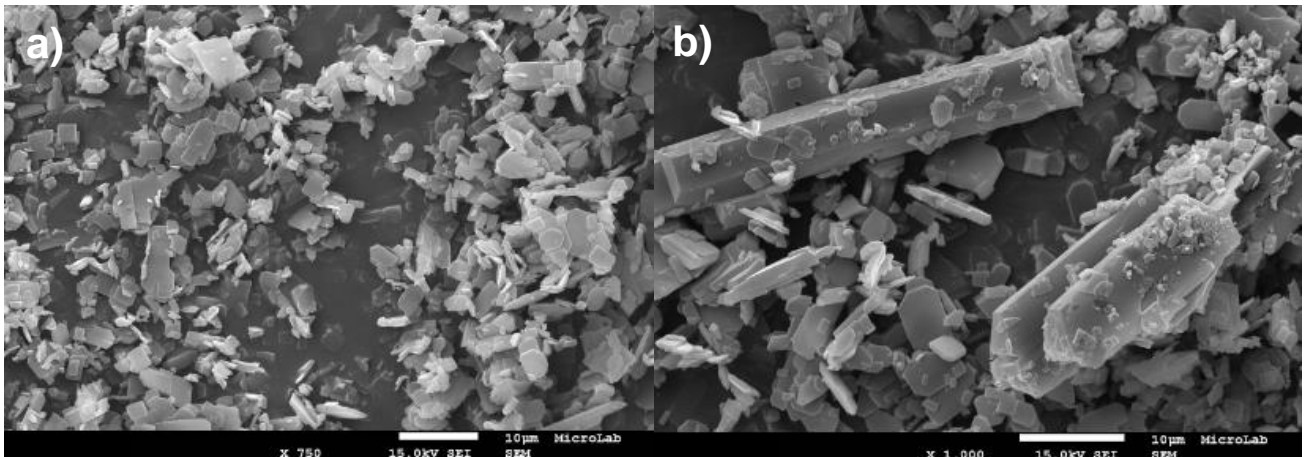


**Figura 70** - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

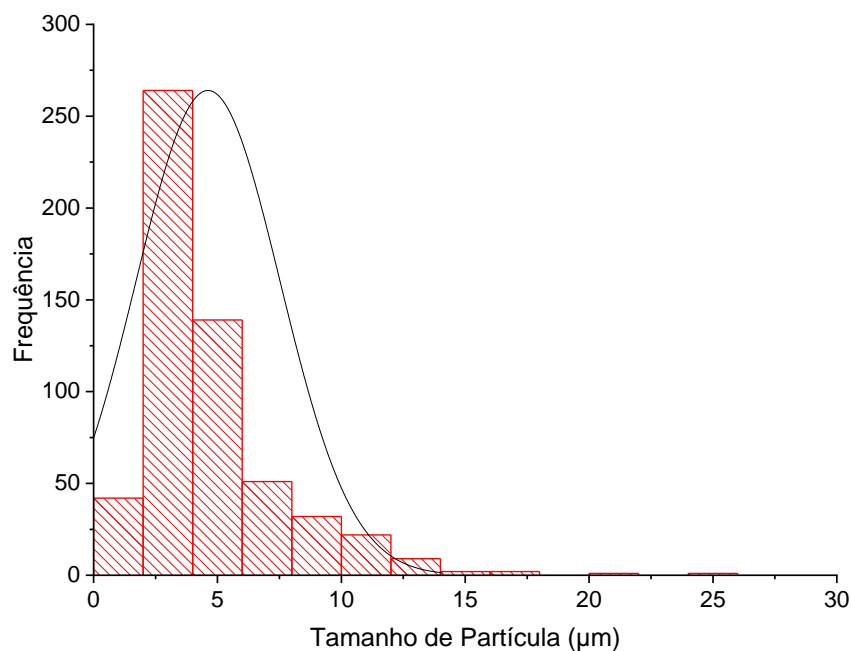
## Anexo G

### Repetição do Ensaio 8 – 60 °C 200 bar 40 mg/mL 3 mL/min

O tamanho médio de partícula e o desvio padrão associado, 4,618  $\mu\text{m}$  e 26,585  $\mu\text{m}$  respectivamente. Na figura 71 encontra-se representado as imagens SEM da amostra e a figura 72 corresponde à representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula.



**Figura 71** - Imagens de SEM da amostra obtida nas condições do Ensaio 8: a) Ampliação de 750x e b) ampliação 1000x.



**Figura 72** - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

## Anexo H

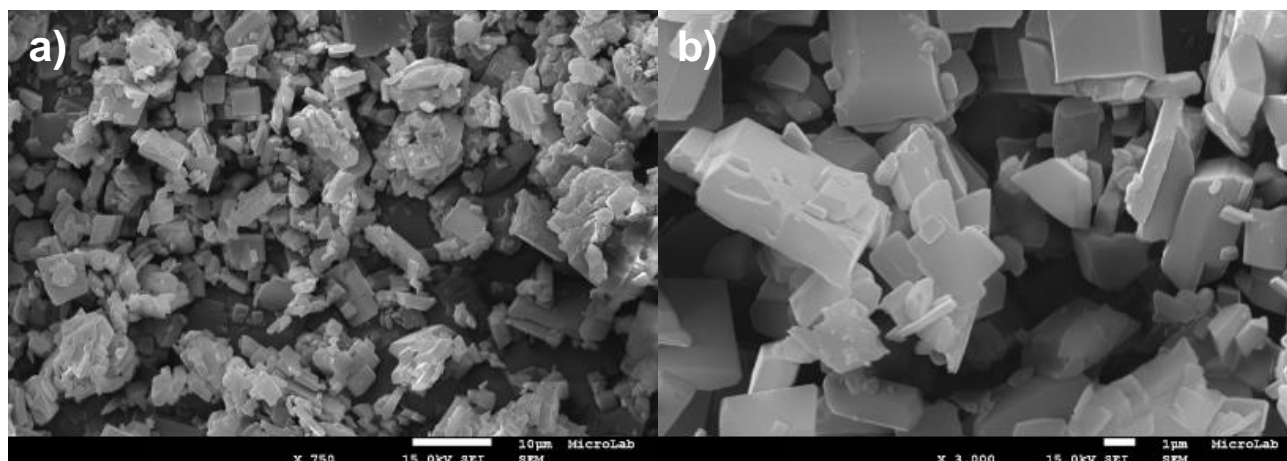
### Repetição do Ensaio 9 – 50 °C 150 bar 25 mg/mL 1,75 mL/min

O tamanho médio de partícula e o desvio padrão associado a cada uma das quatro repetições estão representadas na tabela 13.

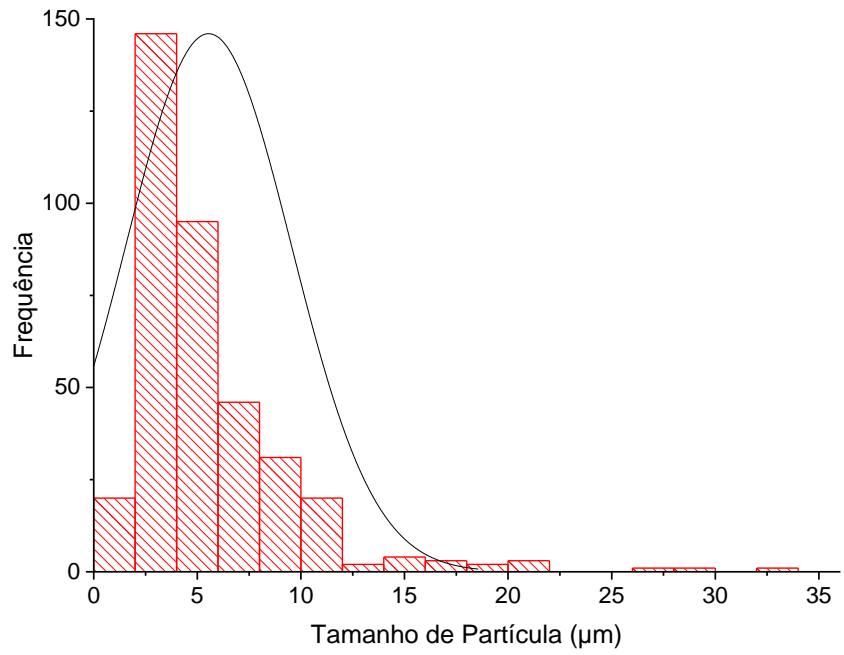
**Tabela 13** - Tamanhos de partícula e desvio padrão associado a cada uma das repetições do ensaio 9.

Repetição	Tamanho de partícula ( $\mu\text{m}$ )	Desvio padrão ( $\mu\text{m}$ )
1	5,545	22,203
2	4,655	4,627
3	4,620	5,435
4	5,571	6,790

Na figura 73 encontra-se representado as imagens SEM da repetição 1 e a figura 74 corresponde à representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula.

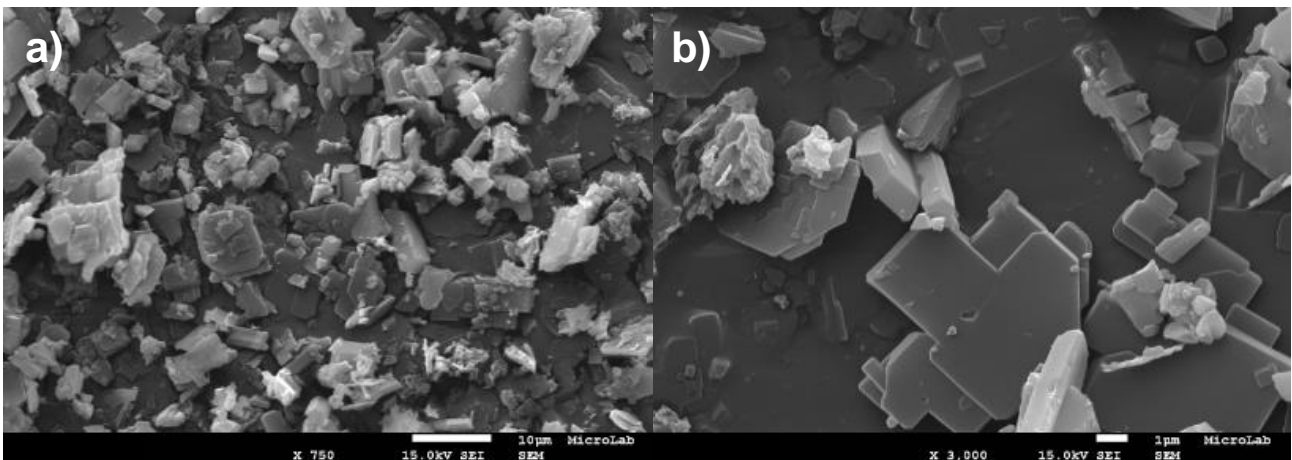


**Figura 73** - Imagens de SEM da amostra obtida na repetição 1: a) Ampliação de 750x e b) ampliação 3000x.

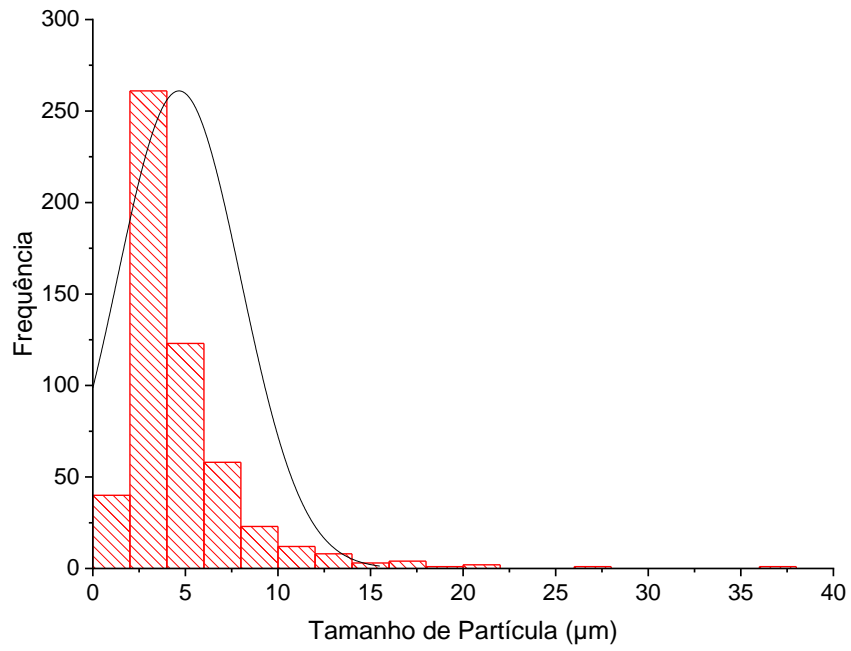


**Figura 74** - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

Na figura 75 encontra-se representado as imagens SEM da repetição 2 e a figura 76 corresponde à representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula.

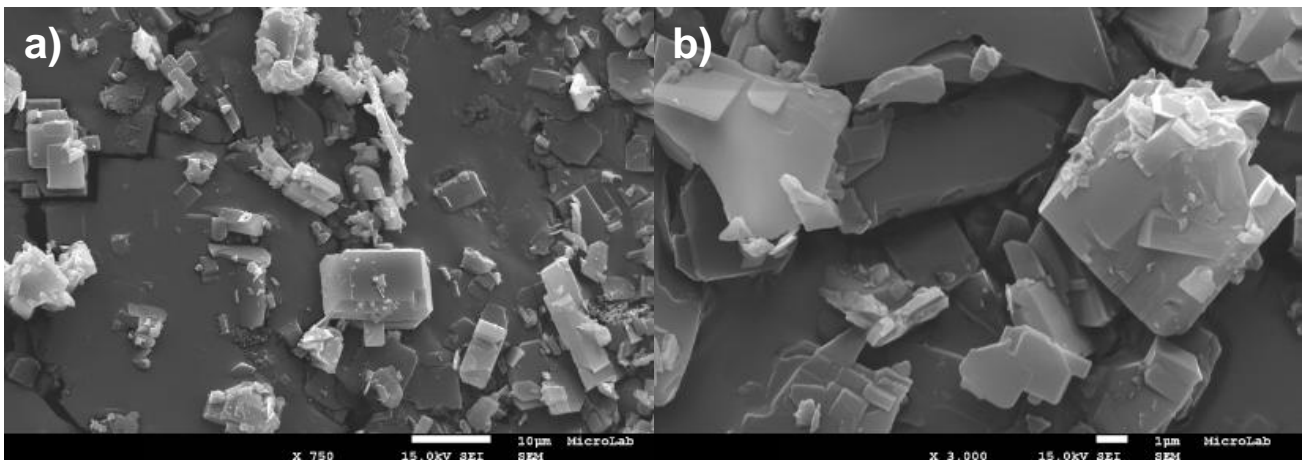


**Figura 75** - Imagens de SEM da amostra obtida na repetição 2: a) Ampliação de 750x e b) ampliação 3000x.

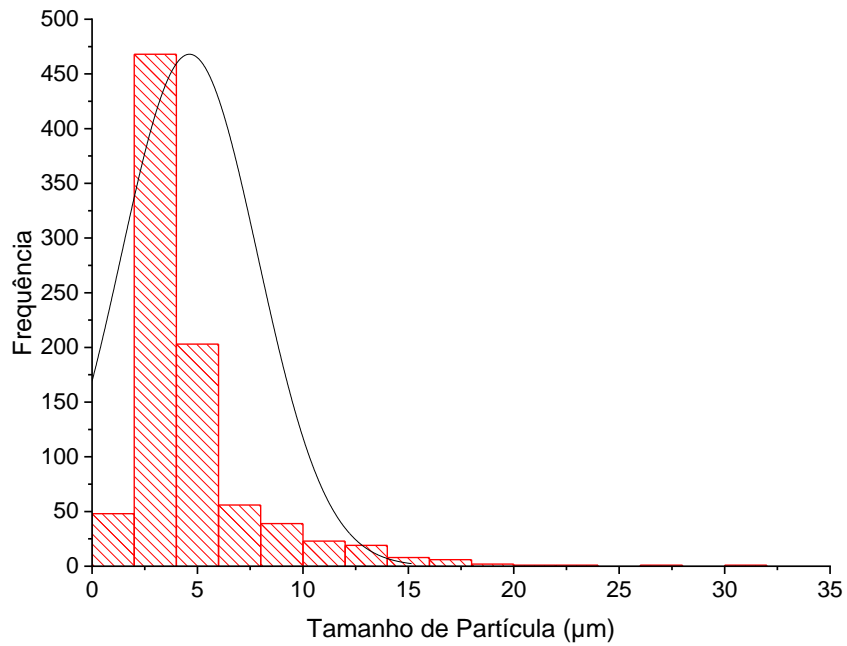


**Figura 76** - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

Na figura 77 encontra-se representado as imagens SEM da repetição 3 e a figura 78 corresponde à representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula.

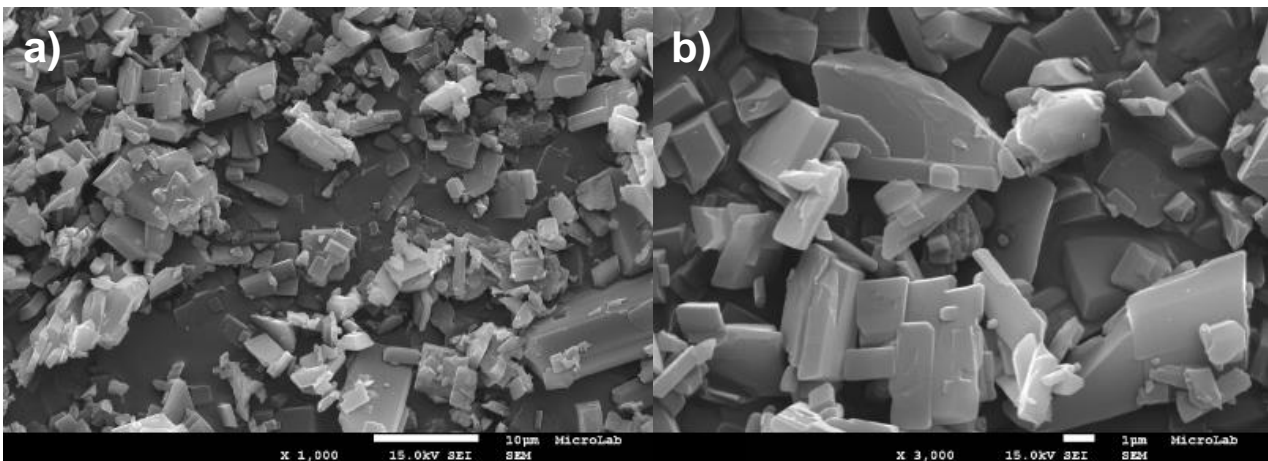


**Figura 77** - Imagens de SEM da amostra obtida na repetição 3: a) Ampliação de 750x e b) ampliação 3000x.

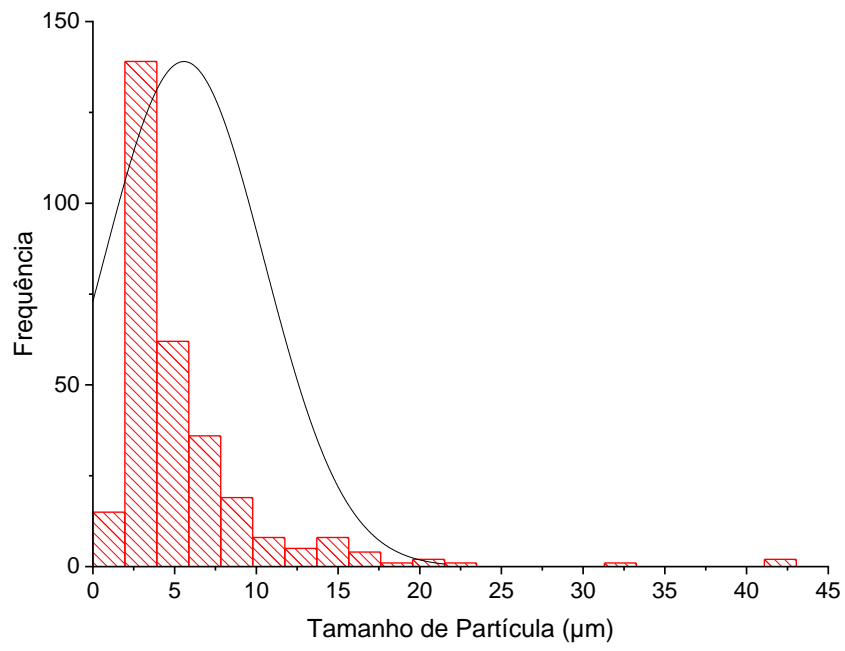


**Figura 78** - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

Na figura 79 encontra-se representado as imagens SEM da repetição 4 e a figura 80 corresponde à representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula.



**Figura 79** - Imagens de SEM da amostra obtida na repetição 4: a) Ampliação de 1000x e b) ampliação 3000x.



**Figura 80** - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem.

## Anexo I

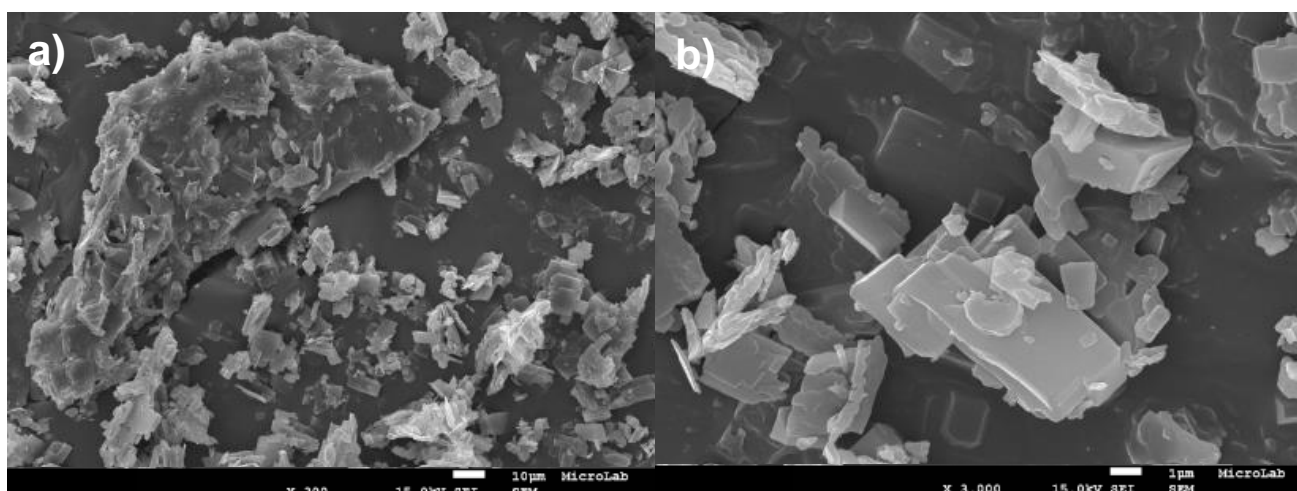
### Repetições do ensaio CCD7 – 50 °C 100 bar 40 mg/mL 1,75 mL/min

O tamanho médio de partícula e o desvio padrão associado a cada uma das três repetições estão representadas na tabela 14.

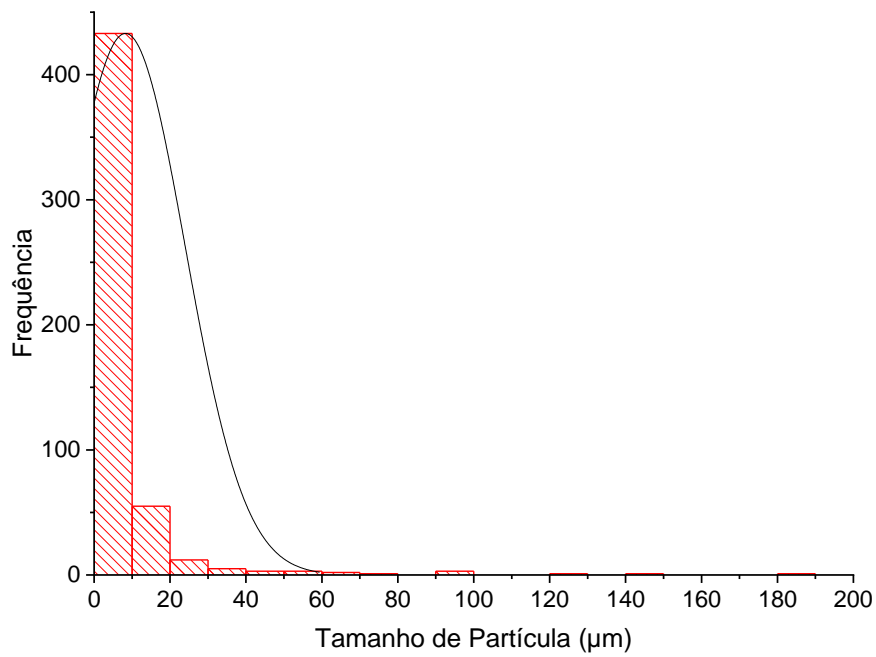
**Tabela 14** - Tamanhos de partícula e desvio padrão associado a cada uma das repetições do ensaio CCD7.

Repetição	Tamanho de partícula ( $\mu\text{m}$ )	Desvio padrão ( $\mu\text{m}$ )
1	8,260	15,725
2	23,805	23,336
3	24,246	25,570

Na figura 81 encontra-se representado as imagens SEM da repetição 1 e a figura 82 corresponde à representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula.

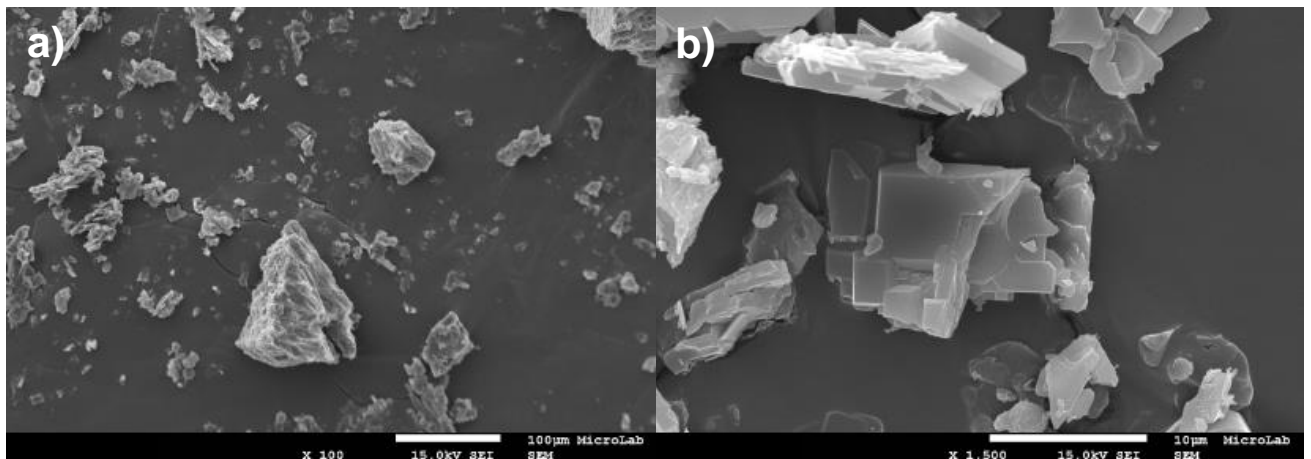


**Figura 81** - Imagens de SEM da amostra obtida na repetição 1: a) Ampliação de 300x e b) ampliação 3000x.

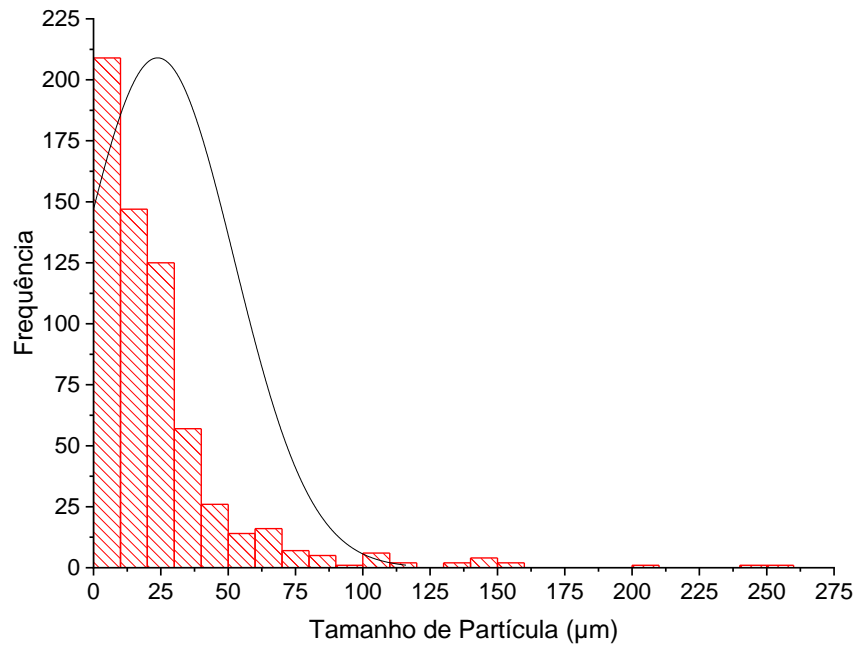


**Figura 82** - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem para a repetição 1.

Na figura 83 encontra-se representado imagens SEM da repetição 2 e a figura 84 corresponde à representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula para esta repetição.

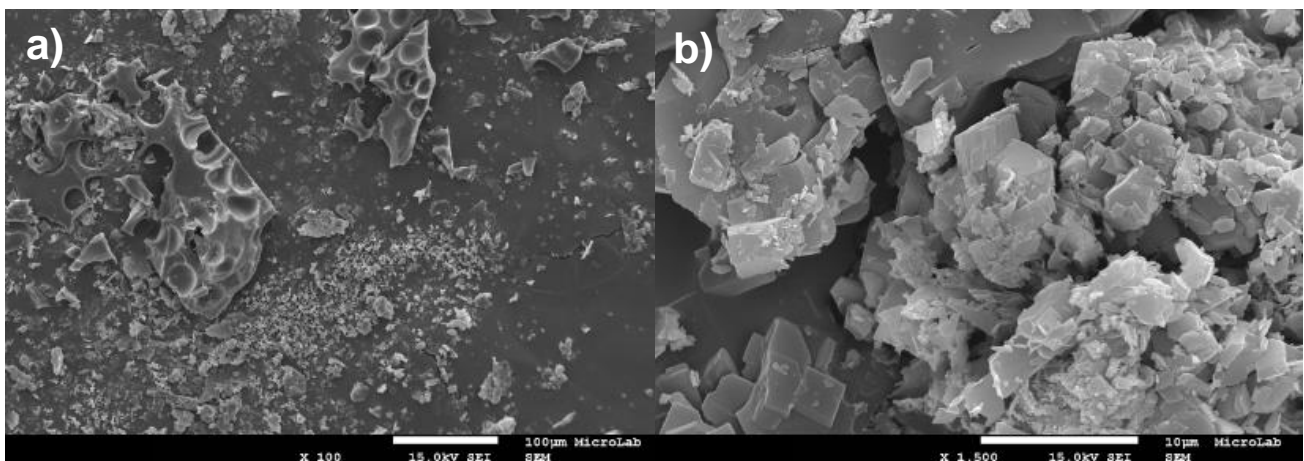


**Figura 83** - Imagens de SEM da amostra obtida na repetição 2: a) Ampliação de 100x e b) ampliação 1500x.

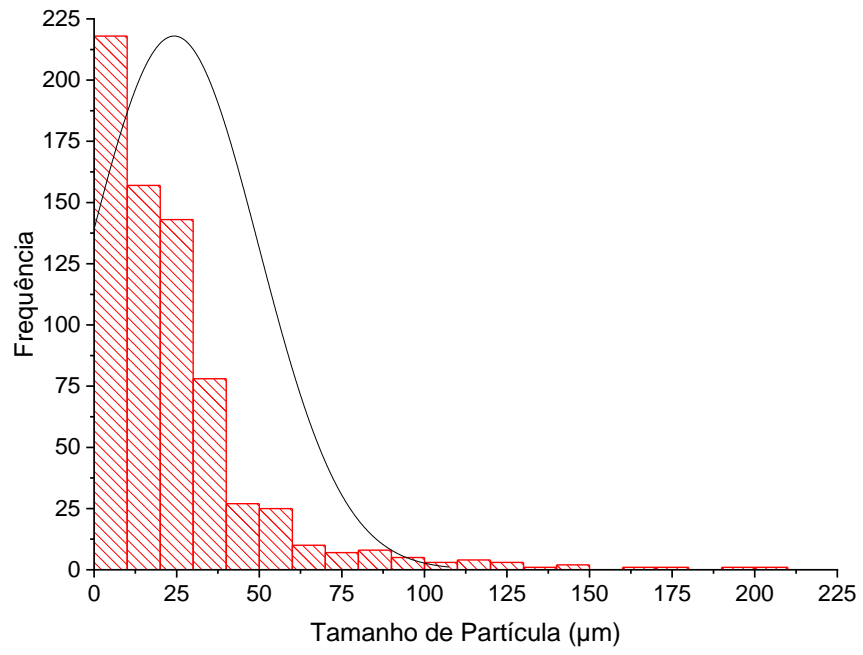


**Figura 84** - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem para a repetição 2.

Na figura 85 encontra-se representado as imagens SEM correspondentes à repetição 3 e a figura 86 corresponde à representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula.



**Figura 85** - Imagens de SEM da amostra obtida na repetição 3: a) Ampliação de 100x e b) ampliação 1500x.



**Figura 86** - Representação gráfica da distribuição dos tamanhos de partícula contabilizada por contagem para a repetição 3.