

Luiza Rodrigues Melo de Lima

MONITORIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA ENCAPSULAMENTO DE PRINCÍPIOS ATIVOS

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Química, orientada pelo Professor Doutor Fernando Bernardo e pela Professora Doutora Maria da Graça Rasteiro e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

Setembro/2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Luiza Rodrigues Melo de Lima

MONITORIZAÇÃO DA FORMAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA ENCAPSULAMENTO DE PRINCÍPIOS ATIVOS

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Química, especialização em Processo, Ambiente e Energia, orientada pelo Professor Doutor Fernando Bernardo e pela Professora Doutora Maria da Graça Rasteiro e apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Setembro/2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

*“Não te rendas, por favor, não cedas:
mesmo que o frio queime,
mesmo que o medo morda,
mesmo que o sol se ponha e se cale o vento,
ainda há fogo na tua alma,
ainda existe vida nos teus sonhos.
Porque cada dia é um novo início,
porque esta é a hora e o melhor momento.”*

Mario Benedetti

À minha mãe, às minhas irmãs e
ao meu pai (*in memoriam*)...

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus orientadores, Professor Fernando Bernardo e Professora Maria da Graça Rasteiro, por todo o conhecimento que me transmitiram, apoio e orientação ao longo destes meses. A disponibilidade e o positivismo que sempre demonstraram foi fundamental ao longo de todo o projeto.

Aos colegas de laboratório que me ajudaram de alguma forma a ultrapassar qualquer obstáculo e ao investigador Carlos Patacas pela disponibilidade que sempre demonstrou em relação às análises no SEM.

Aos colegas e professores da Universidade Federal do Pampa no Brasil, que me apoiaram e me deram o melhor início de curso que eu poderia ter, vocês exerceram um papel fundamental na minha formação pessoal e profissional. Em especial agradeço aos meus amigos Dyego Costa e Rafael Alves, pela amizade incondicional e pelos momentos mais inesquecíveis da minha vida, seja na universidade ou pelo mundo.

Aos meus colegas e professores da Universidade de Coimbra, que foram cruciais ao longo do meu percurso académico, em especial a Adriana Mendes e Vanessa Almeida, que foram incríveis em todos os momentos, me apoiaram, me ouviram e me ajudaram sempre que precisei.

Aos colegas brasileiros que fizeram parte do meu intercâmbio, sem vocês aquele ano não teria sido um dos melhores anos da minha vida. Que a nossa amizade continue a atravessar este oceano.

Ao Leandro, pelo amor, companheirismo, por me acalmar quando foi preciso e pela paciência. Obrigada por ter me incentivado a chegar até aqui.

Por fim, agradeço a minha mãe, por ter me mostrado o que é ser uma mulher forte e corajosa, ter me inspirado a superar todo e qualquer medo. Sem o seu amor e apoio incondicional, eu não chegaria até aqui. Agradeço às minhas queridas irmãs, por sempre fazerem questão de demonstrarem o orgulho que sentem por mim, vocês me deram força nos momentos que pensei em desistir e ser uma inspiração para vocês foi o que me moveu até aqui. Espero ter cumprido com este objetivo. Muito obrigada!

Resumo

A tecnologia de microencapsulação tem sido muito desenvolvida nos últimos anos em diferentes áreas e, na indústria farmacêutica, já é amplamente utilizada com diferentes objetivos, tais como: proteção, mascaramento do sabor, libertação controlada de fármacos, entre outros. Deste modo, o estudo da cinética da formação das partículas torna-se uma importante ferramenta na otimização de formulações e condições de operação do microencapsulamento.

O objetivo deste trabalho foi monitorizar *online* a cinética da formação das micropartículas de etilcelulose, com e sem ingrediente ativo (ibuprofeno). Para tal, utilizou-se o método de emulsificação/evaporação do solvente e definiu-se inicialmente uma formulação base através de testes *offline*, que depois foi adaptada para a monitorização *online* por espectroscopia de difração laser (LDS – *Laser Diffraction Spectroscopy*). Planearam-se um conjunto de testes que avaliaram a influência de parâmetros na cinética da formação das micropartículas, nomeadamente, fração volumétrica da fase dispersa, viscosidade da fase dispersa, concentração de surfactante, velocidade de agitação e concentração de fármaco na fase dispersa. Avaliou-se as distribuições de tamanhos das gotas/partículas ao longo da emulsificação, e as partículas produzidas foram caracterizadas, determinando-se o rendimento global, a distribuição de tamanhos, e recolhendo-se imagens de microscópio ótico e eletrónico de varrimento.

Concluiu-se que, através do método de emulsificação/evaporação do solvente é possível obter partículas formuladas e processadas de maneira simples e eficaz. Concluiu-se também que a monitorização *online* da cinética da formação das partículas em LDS é viável, e com exceção do estudo da influência da concentração de fármaco na fase dispersa, todos os outros estudos apresentaram distribuições de tamanhos das gotas/partículas ao longo da emulsificação sensíveis às variações dos parâmetros ou condições de operação. Verificou-se também que em todos os estudos o rendimento global dos testes é muito sensível as variações dos parâmetros e condições de operação, aumentando significativamente com a redução da fração volumétrica ou com o aumento da concentração de surfactante. A morfologia das partículas foi fortemente influenciada pelo aumento da viscosidade da fase dispersa e pelo aumento da concentração de fármaco, deixando as partículas produzidas má formadas e pouco esféricas. Verificou-se que a velocidade de agitação é a condição de operação que mais exerce influência sobre o tamanho das partículas produzidas, reduzindo-as significativamente.

Abstract

Microencapsulation technology has been greatly developed in recent years in different areas and in the pharmaceutical industry, it is already widely used for different purposes, such as: protection, taste masking, controlled drug delivery, among others. Thus, the study of the kinetics of formation of particles becomes an important tool in optimizing formulations and microencapsulation operating conditions.

The objective of this study was online monitor the kinetics of formation of microparticles of ethyl cellulose, with and without active ingredient (ibuprofen). For this, we used the method of emulsification/solvent evaporation and initially defined by a base formulation offline test, which was later adapted for the online monitoring by laser diffraction spectroscopy (LDS - Laser Diffraction Spectroscopy). They planned a set of tests that assessed the influence of the kinetic parameters of the formation of microparticles, in particular, the volume fraction of the disperse phase, viscosity of the dispersed phase, surfactant concentration, stirring rate and drug concentration in the dispersed phase. We evaluated the size distributions of the droplets/particles during the emulsification and the particles produced were characterized by determining the overall yield, the size distribution and collecting up images of the optical microscope and scanning electron microscope.

It was concluded that, through the method of emulsification/solvent evaporation is possible to obtain particles formulated and processed in a simple and effective way. It was also found that online monitoring of the kinetics of formation of particulate LDS is feasible, and except for the study of the influence of drug concentration in the dispersed phase, all other studies showed size distributions of the droplets/particles during the emulsification sensitive to variations in parameters or operating conditions. It was also found that in all studies the overall yield of the tests is very sensitive to variations in parameters and operating conditions, increasing significantly with the reduction of the volume fraction or increased surfactant concentration. The morphology of the particles was strongly influenced by increasing the viscosity of the dispersed phase and the increase of drug concentration, leaving the formed particles produced bad and little spherical. It was found that the stirring speed is the operating condition which most influences the size of particles produced by reducing them significantly.

Índice

Resumo	ix
Abstract.....	xi
Lista de figuras	xv
Lista de tabelas.....	xix
1. Apresentação do problema e objetivos.....	1
2. Revisão bibliográfica.....	3
2.1. Microencapsulação: conceitos e funções.....	3
2.2. Métodos utilizados para a microencapsulação	4
2.3. Emulsificação/evaporação do solvente	7
2.3.1. Materiais	9
2.3.2. Parâmetros e condições de operação.....	13
2.4. Cinética da formação das partículas.....	18
2.5. Definição do plano de estudos	23
3. Materiais e métodos experimentais	25
3.1. Materiais.....	25
3.2. Métodos experimentais.....	25
3.2.1. Emulsificação/evaporação do solvente.....	25
3.2.2. Medição da viscosidade da fase dispersa.....	27
3.2.3. Monitorização <i>online</i> da formação das partículas.....	27
3.2.4. Caracterização das partículas.....	31
3.2.5. Plano de experiências.....	33
4. Resultados e discussão	35
4.1. Formulação base — testes <i>offline</i>	35

4.2. Monitorização <i>online</i> da formação das partículas	38
4.2.1. Resultados globais e análise comparativa.....	38
4.2.2. Formulação base.....	41
4.2.3. Influência da fração volumétrica da fase dispersa.....	46
4.2.4. Influência da viscosidade da fase dispersa.....	50
4.2.5. Influência da concentração de surfactante	54
4.2.6. Influência da velocidade de agitação.....	59
4.2.7. Influência da concentração de fármaco	67
4.2.8. Sumário final.....	72
5. Conclusões e sugestões para trabalhos futuros.....	73
6. Bibliografia.....	79
Anexo I.....	85
Anexo II.....	93
Anexo III.....	98
Anexo IV.....	101
Anexo V.....	107

Lista de figuras

Figura 1 - Ilustração dos tipos de microcápsulas e microesferas (adap. Silva et al. 2003).	4
Figura 2 - Processo de microencapsulação por emulsificação (o/a)/ evaporação do solvente (adap. Freitas et al. 2005).	8
Figura 3 - Estrutura química da etilcelulose (Dow Cellulosics 2005).	11
Figura 4 – (a) Reator sem chicanas e com presença de vórtice e (b) reator com chicanas (adap. Benita 2006).	16
Figura 5 - Reator de emulsificação. (adap. Benita 2006).	17
Figura 6 – Transferência do solvente orgânico (adap. Li et al. 2008).	19
Figura 7 - Evolução ao longo do tempo das velocidades de extração (F_1) e evaporação (F_2) do solvente, da concentração do solvente na fase contínua e da massa total de solvente (adap. Li et al. 2008).	19
Figura 8 – Extração do solvente do interior da gota para a fase contínua (adap. Li et al. 2008).	20
Figura 9 - Difração laser em (a) partículas menores e (b) partículas maiores.	27
Figura 10 - Representação esquemática da técnica LDS (adap. Rodrigues 2012).	28
Figura 11 - Mastersizer 2000E com Hydro 2000MU.	29
Figura 12 - Sistema de agitação com sucção para circulação da amostra através da zona de medição (adap. Malvern Instruments Ltd 2007a).	30
Figura 13 - Distribuição de tamanhos das PE e PEI.	35
Figura 14 - Imagens obtidas em microscópio ótico das PE (a) e PEI (b). Ampliação 40x.	36
Figura 15 - Imagens obtidas em SEM das PE com ampliação de 150x e escala de 100 μm (imagem a esquerda) e ampliação de 1000x e escala de 10 μm (imagem a direita).	37
Figura 16 - Imagens obtidas em SEM das PEI com ampliação de 150x e escala de 200 μm (imagem a esquerda) e ampliação de 1000x e escala de 20 μm (imagem a direita).	37
Figura 17 - Imagens obtidas em SEM das PEI cortadas com ampliação de 1000x e escala de 10 μm (imagem a esquerda) e ampliação de 350x e escala de 20 μm (imagem a direita).	38
Figura 18 - Distribuição de tamanhos das gotas/partículas do teste base após 47 min, 1 h, 1h30min, 1h50min e 3h30min de emulsificação.	42
Figura 19 – Evolução do diâmetro $d(90)$ ao longo da emulsificação do teste base.	42
Figura 20 - Evolução dos diâmetros $d(10)$, $d(50)$ e $d(90)$ ao longo do tempo de emulsificação do teste base.	43
Figura 21 - Imagens obtidas em microscópio ótico para 1h30min, 2 h, 3 h e 3h30min de emulsificação do teste base. Ampliação 40x.	44

Figura 22 - Imagens obtidas em microscópio ótico das partículas produzidas no teste base com aumentos de 40 e 100x.....	45
Figura 23 - Distribuição de tamanhos das partículas do teste base sem e após ultrassons.	45
Figura 24 - Distribuição de tamanhos das gotas/partículas dos testes $\phi +$ ($\phi = 4\%$), base ($\phi = 3\%$) e $\phi -$ ($\phi = 2\%$), após 50 min, 1h50min e 3 h de emulsificação.	47
Figura 25 - Imagens obtidas em microscópio ótico dos testes $\phi +$ ($\phi = 4\%$), base ($\phi = 3\%$) e $\phi -$ ($\phi = 2\%$), após 2 h de emulsificação. Ampliação de 100x.....	48
Figura 26 - Imagens obtidas em microscópio ótico das partículas produzidas nos testes $\phi +$ ($\phi = 4\%$), base ($\phi = 3\%$) e $\phi -$ ($\phi = 2\%$). Ampliação de 40x.....	49
Figura 27 - Distribuição de tamanhos das gotas/partículas dos testes com 4% (teste base), 6% (teste EC +) e 8% (teste EC ++) de EC na fase dispersa, após 1 h e 3h30min de emulsificação.	51
Figura 28 - Imagens obtidas em microscópio ótico dos testes com 4% (teste base), 6% (teste EC +) e 8% (teste EC ++) de EC na fase dispersa, após 1h45min de emulsificação. Ampliação de 100x.....	52
Figura 29 - Imagens obtidas em microscópio ótico das partículas produzidas nos testes com 4% (teste base), 6% (teste EC +) e 8% (teste EC ++) de EC na fase dispersa. Ampliação de 40x.	53
Figura 30 - Distribuição de tamanhos das gotas/partículas dos testes tween - (0,1% Tween 80), base (0,3% Tween 80) e tween + (0,5% Tween 80), após 1 h, 1h50min e 3h30min de emulsificação.	55
Figura 31 - Imagens obtidas em microscópio ótico dos testes tween - (0,1% Tween 80), base (0,3% Tween 80) e tween + (0,5% Tween 80), após 2h de emulsificação. Ampliação de 40x.	56
Figura 32 - Imagens obtidas em microscópio ótico dos testes tween - (0,1% Tween 80), base (0,3% Tween 80) e tween + (0,5% Tween 80), após 3 h de emulsificação. Ampliação de 40x.	57
Figura 33 - Imagens obtidas em microscópio ótico das partículas produzidas nos testes tween - (0,1% Tween 80), base (0,3% Tween 80) e tween + (0,5% Tween 80). Ampliação de 40x. 58	
Figura 34 - Distribuição de tamanhos das partículas produzidas nos testes base (0,3% Tween 80) e tween + (0,5% Tween 80).....	59
Figura 35 - Distribuição de tamanhos das gotas/partículas dos testes rpm - (1300 rpm), base (1500 rpm) e rpm + (1900 rpm), após 58 min, 1h50min e 3h30min de emulsificação.	60
Figura 36 - Evolução dos diâmetros d(10), d(50) e d(90) ao longo da emulsificação dos testes rpm - (1300 rpm), base (1500 rpm) e rpm + (1900 rpm).	62

Figura 37 - Distribuição de tamanhos das gotas/partículas nos testes com velocidade de agitação em LDS de 1300 rpm (teste EC + / rpm -), 1500 rpm (teste EC +) e 1900 rpm (teste EC + / rpm +) , após 1 h, 1h50min e 3h30min de emulsificação.	64
Figura 38 - Evolução dos diâmetros d(10), d(50) e d(90) ao longo da emulsificação dos testes com velocidade de agitação em LDS de 1300 rpm (teste EC + / rpm -), 1500 rpm (teste EC +) e 1900 rpm (teste EC + / rpm +).	65
Figura 39 - Distribuição de tamanhos das gotas/partículas dos testes IB – (1,5% IB), IB (3% IB) e IB + (4,5% IB), após 1 h e 3h30min de emulsificação.	68
Figura 40 - Evolução dos diâmetros d(10), d(50) e d(90) ao longo da emulsificação dos testes IB – (1,5% IB), IB (3% IB) e IB + (4,5% IB).	68
Figura 41 - Imagens obtidas em microscópio ótico dos testes IB – (1,5% IB), IB (3% IB) e IB + (4,5% IB). Ampliação 100x.	69
Figura 42 - Imagens obtidas em microscópio ótico das partículas produzidas nos testes IB – (1,5% IB), IB (3% IB) e IB + (4,5% IB). Ampliação de 40x.	70
Figura 43 - Imagens obtidas em SEM das partículas do teste IB (3% IB). Ampliação de 150x e escala de 100 µm (imagem a esquerda) e ampliação de 600x e escala de 20 µm (imagem a direita).	71
Figura 44 - Imagens obtidas em SEM das partículas do teste IB (3% IB). Ampliação de 450x e escala de 20 µm (imagem a esquerda) e ampliação de 1500x e escala de 10 µm (imagem a direita).	71

Lista de tabelas

Tabela 1 – Métodos para microencapsulação (Silva et al. 2014; Jyothi et al. 2010; Favaro-Trindade et al. 2008).....	5
Tabela 2 - Formulações base para produção das partículas.*.....	26
Tabela 3 - Plano de experiências para a monitorização online da formação das partículas (total de 14 testes).	34
Tabela 4 - Resultados da caracterização das partículas obtidas pela formulação base – testes offline.	35
Tabela 5 - Resultados dos testes do plano de experiências para a monitorização online da formação das partículas.	39
Tabela 6 - Tamanhos das partículas produzidas nos testes $\phi +$ ($\phi = 4\%$), base ($\phi = 3\%$) e $\phi -$ ($\phi = 2\%$).	50
Tabela 7 - Tamanhos das partículas produzidas nos testes com 4% (teste base), 6% (teste EC +) e 8% (teste EC ++) de EC na fase dispersa.....	54
Tabela 8 - Tamanhos das partículas produzidas nos testes base (0,3% Tween 80) e tween + (0,5% Tween 80).	59
Tabela 9 - Tamanhos das partículas produzidas nos testes rpm – (1300 rpm), base (1500 rpm) e rpm + (1900 rpm).....	63

I. Apresentação do problema e objetivos

A tecnologia de microencapsulação tem sido utilizada na indústria farmacêutica com diferentes objetivos, tais como: mascaramento do sabor ou odor, proteção do fármaco, libertação controlada do fármaco e seu direcionamento específico aos órgãos ou tecidos alvo. Diante destas aplicações, o método de microencapsulamento escolhido deve ser simples, reprodutível e capaz de produzir micropartículas que vão de acordo com os seus objetivos finais. Neste contexto, o estudo da cinética da formação das partículas torna-se uma importante ferramenta na otimização das tecnologias de microencapsulação.

Na literatura, já existem estudos que avaliam a cinética da formação de partículas através de testes *offline*, recolhendo e analisando amostras para diferentes instantes do processo de microencapsulação, ou analisando as micropartículas obtidas no final do processo, para diferentes tempos e condições de processamento. Porém, ainda são poucos os estudos onde é feita a monitorização *online* da formação das partículas.

O processo de produção das micropartículas pode passar por diferentes etapas e o estudo da monitorização *online* pode ser útil na definição de parâmetros e condições de operação específicos para cada etapa, com vista a otimizar não só o processo em si, como também as características físicas e químicas das partículas produzidas.

No presente trabalho, produzem-se micropartículas de etilcelulose, com e sem ingrediente ativo (ibuprofeno), pelo método de emulsificação/evaporação do solvente. A cinética de formação das micropartículas é monitorizada *online* utilizando espectroscopia de difração *laser* (LDS – *Laser Diffraction Spectroscopy*). É estudada a influência de diferentes parâmetros e condições de operação na cinética do processo e também nas características das partículas produzidas.

Para isto, estabeleceu-se em primeiro lugar uma formulação base para os testes *offline*, que foi depois adaptada para a monitorização *online* por difração *laser*.

Planearam-se e executaram-se então um conjunto de testes com o objetivo de avaliar a influência dos seguintes parâmetros na cinética da formação das micropartículas: fração volumétrica da fase dispersa, viscosidade da fase dispersa, concentração de surfactante, velocidade de agitação e da concentração de fármaco na fase dispersa.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Microencapsulação: conceitos e funções

A microencapsulação é um processo em que um ingrediente ativo (IA) – o encapsulado – é revestido ou disperso por uma outra substância – o encapsulante (habitualmente um material polimérico) – obtendo-se o produto final na forma de partículas. Trata-se de uma tecnologia que tem sido muito desenvolvida nos últimos anos e já é amplamente utilizada na indústria cosmética, alimentícia, agroquímica, farmacêutica e biotecnologia, sendo muitos os exemplos de ingredientes encapsulados (e.g. aromas, conservantes, fertilizantes, pesticidas, fármacos, enzimas) (Silva et al. 2014).

Trata-se de uma técnica que pode ser aplicada com diferentes objetivos, tais como: imobilização do IA, garantida enquanto a micropartícula mantém a sua estrutura; proteção do IA contra um ambiente externo agreste; libertação controlada do IA a velocidade baixa e constante ou despoletada por um estímulo externo; estruturação do IA de modo, por exemplo, a facilitar a mistura de duas fases (Matté & Rosa 2013; Singh et al. 2010; Poncelet 2006). O sucesso desta tecnologia depende de um modo geral dos materiais que constituem as partículas, da microestrutura destas (tamanho, forma, distribuição espacial dos componentes) e das condições do meio onde vão atuar. A microestrutura das partículas, por sua vez, depende em grande medida do método de microencapsulação adotado e seus parâmetros e condições de operação.

As partículas formadas são pequenas partículas sólidas com tamanhos que variam entre 1 e 1000 μm . Em termos da sua estrutura básica, podem distinguir-se dois tipos diferentes de partículas (Figura 1): as microcápsulas e as microesferas (Hwisa et al. 2013; Silva et al. 2003).

Nas microcápsulas, o IA está concentrado num núcleo revestido por uma parede do agente encapsulante, que é habitualmente um polímero. As microcápsulas podem ser mono ou polinucleares. As microesferas, por sua vez, são sistemas matriciais nos quais o IA se encontra disperso numa matriz do agente encapsulante (uma rede polimérica, no caso do encapsulante ser um polímero). A dispersão pode ser completamente homogénea (IA dissolvido) ou heterogénea (dispersão de partículas de IA). Para além do IA e do encapsulante, as partículas podem conter outros ingredientes adjuvantes como seja estabilizantes, diluentes e compostos

que aceleram ou retardam a libertação do IA, ou ainda, vestígios de compostos usados durante o processo de microencapsulação, como solventes, catalisadores e agentes de formação de poros (Khan et al. 2015).

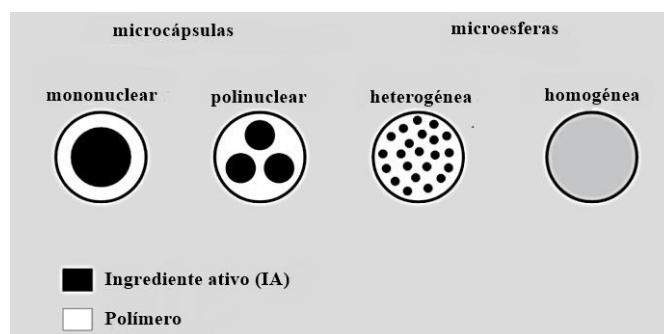


Figura 1 - Ilustração dos tipos de microcápsulas e microesferas (adap. Silva et al. 2003).

Nos estudos sobre microencapsulação, os parâmetros comumente utilizados na avaliação do processo e das partículas produzidas são: (i) a eficiência de encapsulamento, que é a razão entre a massa de IA encapsulado e a massa inicial de IA; (ii) a eficiência de carregamento, que é a razão entre a massa de IA encapsulado e a massa final de partículas (ou seja, a concentração de IA nas partículas); (iii) o rendimento global, que é a razão entre a massa final de partículas e as massas iniciais de IA e polímero (no caso de partículas constituídas apenas por IA + polímero); (iv) distribuição de tamanhos das partículas produzidas e sua morfologia (superficial e interna).

2.2. Métodos utilizados para a microencapsulação

O método ideal para microencapsulação deve ser simples, reprodutível, rápido, fácil de transpor para a escala industrial e pouco dependente das características químicas e físicas da substância a ser encapsulada e do polímero (Silva et al. 2003).

Os vários métodos existentes podem ser agrupados em dois grupos principais: métodos químicos e métodos físicos. Este último grupo pode ainda ser subdividido em métodos físico-químicos e físico-mecânicos (Ghosh 2006). A Tabela 1 lista os principais métodos existentes e algumas das suas características.

A seleção do método mais adequado a cada aplicação depende de múltiplos fatores, desde logo das propriedades do IA a encapsular e do polímero encapsulante (Favaro-Trindade et al. 2008).

Tabela 1 – Métodos para microencapsulação (Silva et al. 2014; Jyothi et al. 2010; Favaro-Trindade et al. 2008).

Métodos	Material encapsulável	Tipo de partículas	Tamanho das partículas (µm)
Químicos			
Polimerização interfacial	Líquido/sólido	Cápsulas	1 - 500
Polimerização <i>in situ</i>	Líquido/sólido	Cápsulas	1 - 500
Físico-mecânicos			
<i>Spray drying</i>	Líquido/sólido	Esferas	5 – 150
<i>Spray cooling</i>	Líquido/sólido	Esferas	20 – 200
Leito fluidizado	Sólido	Cápsulas	> 100
Extrusão centrífuga	Líquido/sólido/gás	Esferas	125 - 3000
Físico-químicos			
Coacervação simples e complexa	Líquido/sólido	Cápsulas	1 – 500
Emulsificação/evaporação do solvente	Líquido/sólido	Esferas	1 – 5000

Métodos químicos

Polimerização interfacial. Nesta técnica, a microcápsula é formada por polimerização à superfície de uma gota. O monómero reativo é dissolvido no núcleo, que é posteriormente dispersado numa fase aquosa contendo o surfactante. Uma amina multifuncional é então adicionada à mistura (co-reagente), o que resulta numa rápida polimerização na interface, gerando o invólucro da microcápsula (Jyothi et al. 2010);

Polimerização *in situ*. Tal como na polimerização interfacial, a formação do invólucro ocorre devido a polimerização de monómeros adicionados ao reator, mas neste caso a polimerização ocorre exclusivamente na fase contínua. No início, um pré-polímero de baixo peso molecular é formado e com o tempo o polímero aumenta de tamanho, depositando-se sobre a superfície do núcleo disperso, formando assim a parede da microcápsula (Jyothi et al. 2010).

Métodos físico-mecânicos

Spray drying. Também conhecido como atomização, é um processo em que uma emulsão, solução ou suspensão, contendo o material encapsulável e o agente encapsulante, é pulverizada em pequenas gotículas numa câmara de secagem com circulação de ar quente. Desta forma, a água (ou outro solvente utilizado) evapora rapidamente formando-se microesferas sólidas (Silva et al. 2014; Servat et al. 2010).

Spray cooling. Também conhecido como *spray chilling* ou *spray congealing*, assemelha-se ao *spray drying*, porém, a mistura líquida inicial, contendo o material encapsulável e o agente encapsulante, é pulverizada numa câmara com circulação de ar a baixa temperatura. A redução de temperatura solidifica as gotículas em alguns segundos. (Silva et al. 2014; Okuro et al. 2013).

Leito fluidizado. Neste método, o agente encapsulante líquido é pulverizado sobre o material encapsulável que se encontra na forma de um leito de partículas fluidizado com ar quente numa câmara cilíndrica. O agente encapsulante evapora rapidamente, formando-se então microcápsulas sólidas. A pulverização ocorre até se alcançar a espessura desejada para a microcápsula, podendo ser feita pelo topo, pela base ou tangencialmente à câmara cilíndrica (Jyothi et al. 2012; Jyothi et al. 2010).

Extrusão centrífuga. O material encapsulável e o agente encapsulante, são empurrados através de tubos concêntricos e formam gotas sob a influência de vibrações. As gotas são então solidificadas por refrigeração ou evaporação do solvente, consoante as propriedades dos materiais (Jyothi et al. 2012).

Métodos físico-químicos

Coacervação simples ou complexa. Envolve a deposição de um polímero à volta do material encapsulável, por alteração das características físico-químicas do meio (temperatura, força iónica, pH, polaridade, etc). Chama-se coacervação simples quando apenas uma única macromolécula está presente e, coacervação complexa, quando há duas ou mais macromoléculas a interagirem (Silva et al. 2014).

Emulsificação/evaporação do solvente. Será o método utilizado neste estudo e por isso será apresentado de seguida em maior detalhe.

2.3. Emulsificação/evaporação do solvente

A emulsificação/evaporação do solvente é uma técnica simples na qual as características das partículas produzidas podem ser facilmente modificadas consoante a escolha dos componentes da formulação de partida e as condições de operação. O método consiste em duas principais etapas (Khan et al. 2015; Silva et al. 2014):

- **Emulsificação:** a fase dispersa (solução ou dispersão de polímero e IA em um solvente) é emulsificada em uma fase contínua contendo um surfactante. A emulsão é habitualmente obtida por agitação mecânica, que provoca tensões de corte sobre a fase dispersa, dividindo-a em gotículas. A emulsão é mantida sob agitação até sua estabilização;
- **Evaporação do solvente:** após a estabilização, a agitação é mantida e o solvente evapora após a sua difusão através da fase contínua, formando-se assim partículas sólidas contendo o IA. A evaporação do solvente pode ser facilitada com o aumento da temperatura da emulsão.

Existem diferentes tipos de emulsificações, que podem dividir-se entre emulsificações simples e múltiplas. As emulsificações simples podem ser do tipo óleo-em-água (o/a) ou água-em-óleo (a/o), consoante a afinidade do surfactante (geralmente a fase contínua é aquela na qual o surfactante é mais solúvel). As emulsificações múltiplas, como água-óleo-água (a/o/a) ou água-óleo-óleo (a/o/o), resultam de uma primeira emulsão que é depois dispersa numa segunda fase contínua. O caso a/o/a, por exemplo, uma fase aquosa é emulsificada numa fase oleosa, contendo um surfactante hidrofóbico, e esta emulsão torna a ser emulsificada numa segunda fase aquosa, contendo um surfactante hidrofílico (Hwisa et al. 2013; Devrim & Alemdar 2016; Zhu et al. 2005).

Para ingredientes ativos pouco solúveis em água, o método de emulsificação simples óleo-em-água é uma boa alternativa, pois a hidrofobicidade do IA impede que o mesmo se transfira da fase dispersa para a fase contínua (Tiwari & Verma 2011). No caso de IAs hidrofílicos, o método de emulsificação simples água-em-óleo ou emulsificação múltipla com fases externas oleosas são boas opções e permitem obter elevadas eficiências de encapsulamento (Silva et al. 2003).

No presente trabalho utiliza-se o método de emulsificação (o/a)/evaporação do solvente, que pode ser descrito em 4 etapas, conforme representado na Figura 2:

- 1) Preparo da fase dispersa (FD), que é a fase oleosa, em que o polímero e o IA são dissolvidos em um solvente;
- 2) Emulsificação da fase dispersa na fase contínua (FC), que é a fase aquosa, contendo o surfactante;
- 3) Extração do solvente da fase dispersa para a fase contínua, seguida da evaporação do solvente, de modo que as gotículas da fase dispersa se transformam em partículas sólidas;
- 4) Recuperação das partículas por filtração, seguida de lavagem para remover o surfactante e secagem para eliminar o solvente residual.

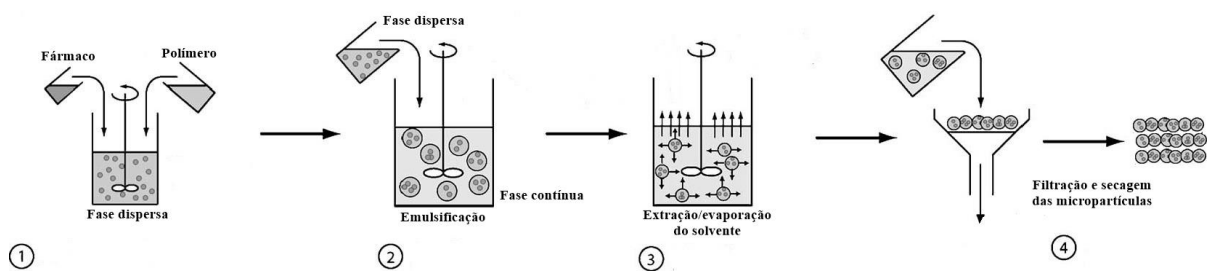


Figura 2 - Processo de microencapsulação por emulsificação (o/a)/ evaporação do solvente (adap. Freitas et al. 2005).

Este procedimento base pode sofrer adaptações consoante a solubilidade do IA e do solvente em água.

No caso do IA apresentar uma solubilidade significativa em água, uma forma de inibir a sua transferência para a fase contínua é pré-saturar a fase aquosa com o IA (Rodrigues 2012; Trino 2012; Li et al. 2008).

Para solventes com miscibilidade parcial em água, pode ocorrer a extração súbita do solvente para a fase contínua e conseqüentemente precipitação prematura do polímero. Existem várias técnicas que permitem inibir este comportamento indesejado, tais como (Rodrigues 2012; Trino 2012):

- 1) Pré-saturação da fase contínua com o solvente;
- 2) Emulsificação prévia da fase dispersa numa pequena quantidade de fase contínua, diluindo-se depois esta emulsão concentrada com a restante quantidade de fase contínua;
- 3) Emulsificação da fase dispersa numa pequena quantidade de fase contínua, seguida de evaporação do solvente a partir desta emulsão concentrada.

Apesar das limitações do método de emulsificação (o/a)/evaporação do solvente, nomeadamente no que diz respeito à transferência indesejada do IA e/ou solvente para a fase

contínua, este pode ser um bom ponto de partida para desenhar um processo ideal tendo em conta as propriedades específicas dos ingredientes utilizados e as características desejadas para as micropartículas. Na literatura, a microencapsulação partindo de emulsões o/a apresenta de um modo geral resultados satisfatórios, mesmo para IAs e/ou solventes miscíveis em água (Devrim & Alemdar 2016; Momoh et al. 2014).

2.3.1. Materiais

Ingrediente ativo (IA)

Seja na indústria cosmética, alimentícia, agroquímica, biotecnológica ou farmacêutica, uma vasta gama de ingredientes ativos tem sido objeto de estudo no âmbito do microencapsulamento (Saini & Saini 2016; Mendes 2012; Leimann 2008). O presente trabalho aborda uma aplicação farmacêutica, sendo preparadas micropartículas de etilcelulose carregadas com ibuprofeno, usando método de emulsificação (o/a)/evaporação do solvente.

O ibuprofeno é um fármaco praticamente insolúvel em água, da classe dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), com ações anti-térmica, analgésica e anti-inflamatória. Os AINEs encontram-se entre os medicamentos mais prescritos em todo o mundo e os principais efeitos colaterais causados por este tipo de medicamento estão associados ao aparelho gastrointestinal. O tratamento a longo prazo pode causar erosões e úlceras gástricas e duodenais (Batlouni 2010). Neste âmbito, a microencapsulação surge com o objetivo de proporcionar uma libertação mais lenta e controlada do ibuprofeno, reduzindo os seus efeitos secundários e proporcionando uma ação mais duradoura (Momoh et al. 2014).

Tal como atrás descrito na secção 2.3., para fármacos pouco solúveis em água, o processo de microencapsulação pode iniciar-se com uma emulsão do tipo o/a. Diversos estudos, utilizando este método, reportam elevadas eficiências de encapsulamento de fármacos com baixa solubilidade em água, tais como o ibuprofeno (Sreelola & Sailaja 2014; Momoh et al. 2014), a progesterona (Kang et al. 2014) e a glimepirida (Mokale et al. 2014).

Polímero

O polímero na microencapsulação tem o papel de agente encapsulante e a escolha do polímero ideal passa pelas propriedades do IA, finalidade das micropartículas e método de fabrico utilizado. De um modo geral, o polímero deve possuir as seguintes características (Mendes 2012):

- ser solúvel no solvente;
- ser de fácil manipulação durante o processo;
- possuir baixa higroscopicidade, para facilitar a manipulação e evitar aglomeração;
- não ser reativo com o material a ser encapsulado;
- ter capacidade de imobilizar o IA dentro da estrutura da micropartícula;
- libertar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de microencapsulação;
- proporcionar máxima proteção ao IA contra condições adversas, tais como luz, pH, oxigénio e ingredientes reativos;
- possuir as propriedades desejadas para libertação do IA;
- não apresentar sabor desagradável no caso de consumo oral;
- ser económico.

Outro aspeto relevante para o caso de aplicações *in vivo* é quanto a biodegradabilidade do polímero, isto é, se este sofre (ou não) degradação química *in vivo*. A degradação pode ser por hidrólise química ou enzimática e os seus produtos não devem apresentar toxicidade, para além de apresentarem uma boa biocompatibilidade (Saltzman 2001).

Os poliésteres alifáticos são os polímeros sintéticos e biodegradáveis mais explorados em sistemas de libertação de fármacos, como o poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(caprolactona) (PCL) e copolímeros dos ácidos láctico e glicólico (PLGA), sendo este último o que possui um menor tempo de biodegradação *in vivo* (Villanova et al. 2010).

Uma outra classe de polímeros biodegradáveis são os de origem natural, isto é, que se formam durante o crescimento de organismos. Estes podem ser divididos em polissacarídeos (celulose e amido), polipeptídeos naturais (gelatinas de origem animal ou vegetal) e poliésteres bacterianos (Franchetti & Marconato 2006). Deste último grupo, os polímeros mais conhecidos são poli(β -hidroxi-butilato) (PHB), poli(β -hidroxivalerato) (PHV) e poli(hidroxi-butilato-co-valerato) (PHB-V).

Polímeros não biodegradáveis também são objeto de estudo em aplicações farmacêuticas. A etilcelulose (degradável e biocompatível) e o polimetilmetacrilato (não degradável e biocompatível) são exemplos de polímeros que, além de serem aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*), também são dos mais económicos.

A etilcelulose, que é o polímero usado neste trabalho, é um éter de celulose feito por reação de um cloreto de etilo com celulose alcalina. Trata-se de um polímero resistente, praticamente insolúvel em água, solúvel em diversos solventes orgânicos, não tóxico e estável em uma larga gama de pH (Nova et al. 2014). Devido à sua insolubilidade em água, a etilcelulose tem se apresentado como uma excelente alternativa no revestimento de fármacos administrados oralmente, sendo capaz de proteger o fármaco do trato gastrointestinal (Oledzka & Sobczak 2012). Alguns estudos apresentam a etilcelulose como uma opção barata de polímero encapsulante de fármacos relativamente solúveis e praticamente insolúveis em água, como por exemplo, a aspirina e o ibuprofeno, respetivamente (C. Y. Yang et al. 2000; Dash et al. 2010; Sreelola & Sailaja 2014; Rodrigues 2012; Trino 2012).

A Figura 3 apresenta a estrutura química da etilcelulose.

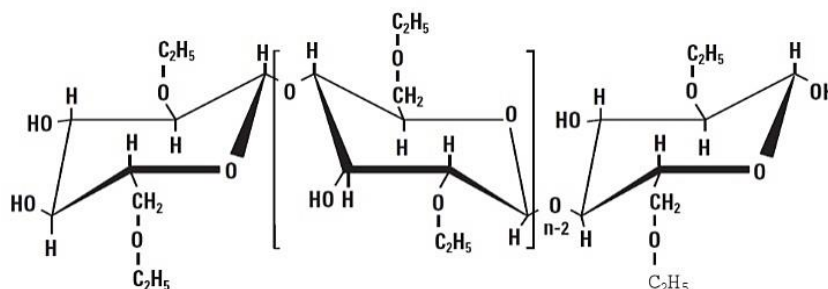


Figura 3 - Estrutura química da etilcelulose (Dow Cellulosics 2005).

Solvente

Os solventes orgânicos são geralmente utilizados na indústria farmacêutica como meios de reação, na separação e purificação de produtos de síntese e para a limpeza de equipamentos. Atualmente, a indústria farmacêutica está entre os maiores utilizadores de solventes por unidade de produto final (Grodowska & Parczewski 2010).

Em processos de emulsificação/evaporação do solvente, o solvente deve possuir as seguintes características específicas (Hwisa et al. 2013):

- ser capaz de dissolver o polímero;

- não causar degradação do IA;
- possuir baixa solubilidade na fase contínua;
- apresentar elevada volatilidade;
- ter baixa toxicidade.

Os solventes mais utilizados na emulsificação (o/a)/evaporação do solvente são: clorofórmio (CHCl_3), diclorometano (CH_2Cl_2), acetato de etilo ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) e o formato de etilo (HCOOC_2H_5) (Li et al. 2008).

O clorofórmio possui elevada volatilidade e baixa solubilidade em água, porém, sua elevada toxicidade aponta para a sua substituição.

O diclorometano (DCM) é o substituto mais imediato, pois é menos tóxico, é também pouco solúvel em água e bastante volátil. Ainda assim, a sua toxicidade é significativa, devendo garantir-se que a sua concentração nas micropartículas finais é reduzida para níveis aceitáveis.

Outros solventes com menor toxicidade também têm sido objeto de estudo, como o acetato de etilo e o formato de etilo. Apresentam, contudo, a desvantagem de miscibilidade parcial em água e, no caso do acetato de etilo, uma volatilidade inferior à do clorofórmio e diclorometano.

Alguns solventes menos comuns têm também sido estudados, como a acetona, que em Matsumoto et al. (2008) é utilizada para encapsular a vitamina B12 em PLGA e o propionato de metilo, que em Kang et al. (2014) é utilizado na preparação de microesferas de PLGA carregadas com progesterona.

Surfactante

Os surfactantes (também conhecidos como agentes tensioativos ou, no caso de emulsões, emulsionantes), fazem parte de uma classe importante de compostos químicos utilizados em diversos setores. De origem natural ou sintética, em emulsificações os surfactantes possuem a função de: (i) diminuir a tensão interfacial entre as fases dispersa e contínua, reduzindo assim a energia necessária à quebra das gotas, e (ii) estabilizar as gotas adsorvendo à sua superfície, prevenindo assim a coalescência e/ou aglomeração das gotas.

São moléculas anfifílicas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. A porção hidrofóbica (apolar) é frequentemente constituída por uma cadeia hidrocarbonada, enquanto que a porção hidrofílica (polar) pode ser de diferentes tipos (Malmsten 2002; Myers 2006):

- aniônica, como no caso do dodecil sulfato sódico (SDS);

- catiónica, como no caso do brometo de cetiltrimetil amónio (CTAB);
- anfotéricas, o que significa que pode ter um comportamento aniónico ou catiónico, consoante ao pH da solução, como acontece com o 3-(dodecildimetil amónio) propano 1-sulfato (SB-12);
- não-iónica, como acontece no caso de ésteres de sorbitano (com nome comercial de Span) e ésteres de sorbitano polietoxilado (também conhecidos por polissorbatos ou pelo nome comercial Tween).

Os surfactantes aplicados em emulsões do tipo o/a devem ser globalmente hidrofílicos e com um valor de HLB (balanço hidrofílico-lipofílico) elevado, entre 8 e 18. Os surfactantes da família Tween estão disponíveis em diferentes gamas, com valores de HLB entre 11 (Tween 20) e 16,7 (Tween 85), à medida que o tamanho das cadeias etoxiladas aumentam (Malmsten 2002).

2.3.2. Parâmetros e condições de operação

Fração volumétrica da fase dispersa

A fração volumétrica da fase dispersa é um importante parâmetro na produção de micropartículas por emulsificação/evaporação do solvente, e é definida pela Equação 1;

$$\phi = \frac{V_d}{V_d + V_c} \quad (1)$$

sendo, V_d o volume da fase dispersa e V_c o volume da fase contínua.

Uma emulsão é considerada diluída para valores de $\phi < 0,01$, e neste tipo de sistema a coalescência das gotas pode ser ignorada devido às poucas colisões entre elas. Já no caso de valores de $\phi \geq 0,05$, a coalescência das gotas pode ser considerada significativa dependendo das condições de operação. No caso de emulsões com valores de ϕ da ordem de 0,2 ou superior, o sistema já é considerado moderadamente concentrado, sendo necessário a adição de um surfactante para reduzir a coalescência das gotículas, ou seja, um aumento de ϕ aumenta o número de colisões das gotas, aumentando deste modo a coalescência das gotículas e o seu tamanho médio (Heiskanen et al. 2012).

Porém, o efeito de ϕ sobre o tamanho das micropartículas obtidas no final do processo não é claro. Alguns estudos indicam que o aumento de ϕ reduz o tamanho das partículas,

enquanto que outros estudos reportam que não há mudanças significativas (Heiskanen et al. 2012; Li et al. 2008).

No caso do estudo realizado por Valot et al. (2009), onde se prepara microesferas de etilcelulose carregadas com ibuprofeno pelo método de emulsificação (o/a)/evaporação do solvente, verificou-se que o aumento de ϕ reduziu significativamente os tamanhos das microesferas. Os autores referem que este comportamento resulta de uma precipitação do polímero mais lenta para valores mais altos de ϕ , retardando a solidificação das microesferas e induzindo a formação de partículas menores devido a uma maior exposição das gotículas a tensão de corte (agitação).

Viscosidade da fase dispersa

A viscosidade da fase dispersa é um parâmetro importante na formação e estabilidade de emulsões. Uma relação empírica que descreve a influência da viscosidade no tamanho das gotas é (Heiskanen et al. 2012);

$$d_{32} = A (\mu_d)^{0,25} \quad (2)$$

sendo d_{32} o diâmetro médio (de Sauter) das partículas, μ_d a viscosidade da fase dispersa e A um coeficiente dependente da viscosidade da fase contínua, do diâmetro do agitador, da velocidade de agitação, da fração volumétrica da fase dispersa e da tensão interfacial.

De modo a aumentar a viscosidade da fase dispersa, a maioria dos estudos aumentam a concentração de polímero ou o seu peso molecular. Os estudos indicam que o aumento da viscosidade da fase dispersa pode ser responsável pelo aumento do tamanho das partículas (Heiskanen et al. 2012; Valot et al. 2009; Yang et al. 2000), por deixá-las com uma superfície mais lisa (Li et al. 2008), e pelo aumento da eficiência de encapsulamento e de carregamento (C. Y. Yang et al. 2000).

Concentração de IA na fase dispersa

O aumento da concentração de IA na fase dispersa é limitado por três fatores (Li et al. 2008):

- a quantidade de solvente na fase dispersa diminui ao longo do processo, diminuindo assim a quantidade de IA que esta fase pode suportar;

- devido ao espaço limitado dentro da micropartícula e ao seu encolhimento durante a sua formação, o excesso de carga de IA favorece a sua fuga para a fase contínua;
- partículas com elevada carga de IA são mais porosas e possuem uma forma mais irregular, favorecendo mais uma vez a fuga do IA para a fase contínua;

A avaliação do efeito de diferentes concentrações de IA na fase dispersa é pouco conclusiva no que se refere ao tamanho das partículas e à eficiência de encapsulamento. Em Momoh et al. (2014), o aumento da concentração de ibuprofeno na fase dispersa (na preparação de partículas de PLGA carregadas com ibuprofeno) não influenciou o tamanho final das partículas e provocou um aumento da eficiência de encapsulamento. No estudo de Devrim & Alemdar (2016), o aumento da concentração de levofloxacina na fase dispersa causou uma pequena redução nos tamanhos das partículas e uma redução da eficiência de encapsulamento.

Pode concluir-se destes e de outros estudos que o efeito da concentração de IA na fase dispersa não é linear e pode influenciar nas características das partículas de maneiras diferentes, consoante propriedades físico-químicas das matérias-primas e condições do processo de fabrico.

Concentração de surfactante

O aumento da concentração de surfactante reduz a tensão interfacial e, por conseguinte, o tamanho das gotas da emulsão, podendo assim levar a uma diminuição no tamanho das partículas finais. Porém, esta diminuição tem um limite que está relacionado com a concentração micelar crítica (CMC) do surfactante. Quando esta concentração (na fase contínua) é atingida, a superfície das gotas encontra-se saturada de surfactante. Acima da CMC, a tensão interfacial não diminui mais e todo o acréscimo de surfactante organiza-se em micelas (Fu et al. 2015).

Verma et al. (2015) avaliaram o efeito da concentração de Tween 80 na produção de microesferas de etilcelulose carregadas com ibuprofeno e concluíram que o aumento da concentração de Tween 80 (entre 0,001 e 0,004%) provocou um aumento no rendimento global, na eficiência de encapsulamento e na eficiência de carregamento, enquanto que, a distribuição de tamanhos das microesferas manteve-se praticamente constante. Já no estudo de Lai & Tsiang (2004), o aumento da concentração de PVA (entre 0,1 e 1%) provocou uma redução no tamanho médio e na eficiência de carregamento de microesferas carregadas com paracetamol, e aumentou o rendimento global e a eficiência de encapsulamento.

É possível assim afirmar que a influência da concentração de surfactante atua de maneiras diferentes e por vezes mal compreendidas, indicando que o processo de emulsificação/evaporação do solvente pode apresentar comportamentos complexos e dependentes de especificidades do sistema em causa.

Geometria do reator e velocidade de agitação

Na técnica de emulsificação/evaporação do solvente, o reator a ser utilizado deve possuir características específicas de modo a proporcionar uma boa emulsificação. A escolha passa pelo tipo de agitador, pela utilização de chicanas e pelas dimensões do reator.

O agitador deve misturar as fases e ser capaz de romper as gotas até ao tamanho final desejado. Os agitadores com pás planas paralelas ao eixo de rotação (pás na vertical) são os mais adequados para emulsificação, pois proporcionam um padrão de escoamento onde o fluxo radial, responsável por elevadas tensões de corte sobre as gotas, predomina sobre o fluxo axial ao longo do eixo do agitador (também importante para proporcionar uma rápida mistura das fases). A turbina de *Rushton* é um *standard* em agitadores de fluxo radial, possuindo um disco horizontal com 6 pás planas na vertical (ver Figura 4) (Benita 2006; Paul et al. 2004).

A utilização de chicanas é praticamente uma exigência no âmbito de processos de emulsificação. Elas evitam a formação de vórtice causado pelo fluxo tangencial (Figura 4a), transformando-o em fluxos radiais/axiais (Figura 4b).

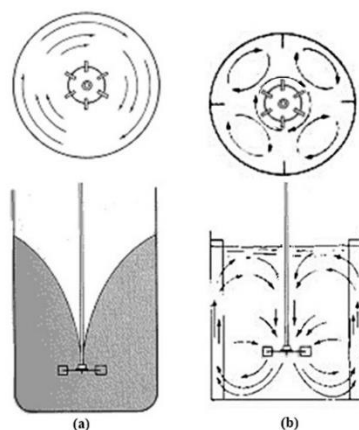


Figura 4 – (a) Reator sem chicanas e com presença de vórtice e (b) reator com chicanas (adap. Benita 2006).

A Figura 5 representa um reator com as dimensões adequadas para uma boa emulsificação, sendo que (Benita 2006):

- o diâmetro do agitador (D_A) deve ser ente $1/3$ a $1/2$ do diâmetro do reator (D);

- a altura de líquido no reator deve ser igual ou próxima ao diâmetro do reator ($H \cong D$);
- o agitador deve estar a uma altura da base do reator (H_A) que deve ser 1/3 da altura de líquido (H).

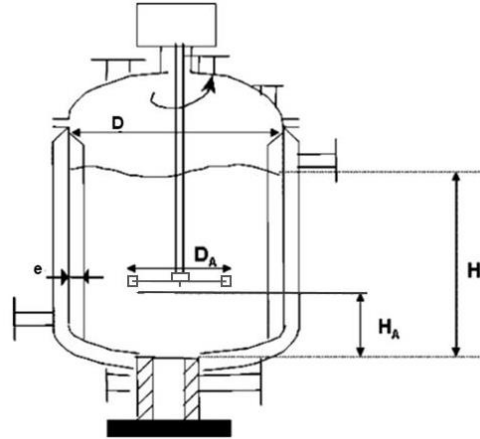


Figura 5 - Reator de emulsificação. (adap. Benita 2006).

A velocidade de agitação é um dos parâmetros que influencia diretamente na emulsificação e na evaporação do solvente e pode ser manipulada consoante as características desejadas para o produto final.

O aumento da velocidade de agitação provoca uma diminuição no tamanho das gotas da emulsão e logo, em princípio, também uma diminuição no tamanho das micropartículas finais.

A literatura apresenta estudos que confirmam esta redução do tamanho das micropartículas. Valot et al. (2009) verificaram que o aumento de agitação faz diminuir o tamanho de microesferas de etilcelulose carregadas com ibuprofeno. Bandana et al. (2010) observaram o mesmo comportamento no caso de microesferas de etilcelulose e hidroxipropil metilcelulose (HPMC) (1:1), carregadas com famotidina. O estudo também avalia o efeito da velocidade de agitação sob a eficiência de encapsulamento e concluiu que a eficiência diminui com o aumento da velocidade.

Pressão e temperatura

A pressão e a temperatura são condições processuais que influenciam na evaporação do solvente e, conseqüentemente, a formação das micropartículas.

Nepal et al. (2007) verificaram que microesferas do polímero *Eudragit*[®] E100, carregadas com o antibiótico josamicina, apresentavam um maior diâmetro médio para temperaturas mais

elevadas, sendo isto acompanhado de uma redução no rendimento global. Explicaram este comportamento com o fato da solidificação ser mais rápida para temperaturas elevadas e, conseqüentemente, as gotas serem afetadas pela agitação por um período mais curto, solidificando com maiores tamanhos. Yang et al. (2000) verificaram a mesma tendência no caso de microesferas de PLGA, observando também uma diminuição no rendimento global com o aumento da temperatura.

A redução da pressão abaixo da pressão atmosférica é por vezes empregue para acelerar a etapa de evaporação do solvente. Chung et al. (2001) reduziram a pressão durante o processo de evaporação do diclorometano para a produção de microesferas de polímeros derivados do PLGA carregados de lidocaína, e verificaram que a redução da pressão deixou a superfície das microesferas mais lisas e com menos poros, mas reduziu os seus tamanhos e reduziu também a eficiência de encapsulamento. O tempo de evaporação do processo sob pressão atmosférica foi de 6 h, enquanto que a vácuo, o tempo diminuiu para 2 h.

2.4. Cinética da formação das partículas

A extração do solvente para a fase contínua e a solidificação das gotas são os mecanismos associados à formação das partículas e podem ter as suas cinéticas fortemente influenciadas pelos parâmetros e condições de operação.

A Figura 6 representa os dois principais fenómenos de transferência do solvente, sendo F_1 a velocidade de extração do solvente das gotas para a fase contínua e F_2 a velocidade de evaporação da fase contínua para o ar. A Figura 7 mostra perfis típicos da evolução temporal destas duas velocidades de transferência e as respetivas evoluções da concentração de solvente na fase contínua e da massa total de solvente.

Em linha com a Figura 7, o processo de transferência do solvente pode descrever-se em três etapas (Li et al. 2008):

Etapa 1: no início da emulsificação, quando a fase dispersa é rica em solvente, F_1 é maior que F_2 e rapidamente a fase contínua torna-se saturada com o solvente, atingindo a concentração máxima de solubilidade (C_s);

Etapa 2: durante esta etapa F_1 é igual a F_2 e mantém-se na fase contínua a concentração máxima de solubilidade;

Etapa 3: à medida que a concentração do polímero aumenta na fase dispersa, a difusividade do solvente nesta fase diminui, diminuindo assim a velocidade de extração F_1 , que se torna menor do que F_2 . Consequentemente, a concentração de solvente na fase contínua diminui. O momento em que ocorre a transição da etapa 2 para a etapa 3 é chamado de tempo crítico (t_c).

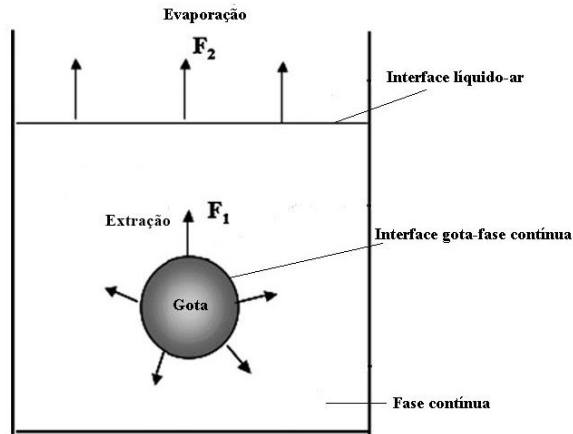


Figura 6 – Transferência do solvente orgânico (adap. Li et al. 2008).

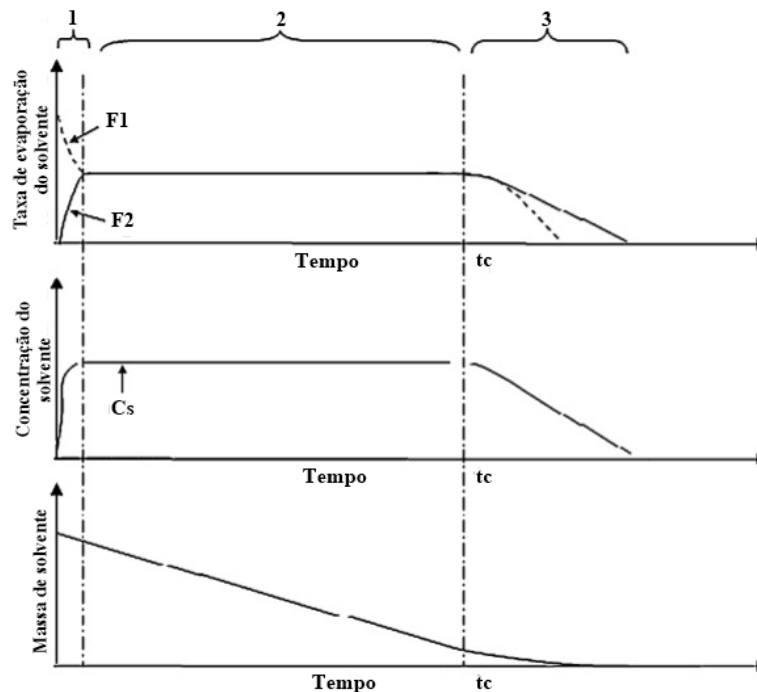


Figura 7 - Evolução ao longo do tempo das velocidades de extração (F_1) e evaporação (F_2) do solvente, da concentração do solvente na fase contínua e da massa total de solvente (adap. Li et al. 2008).

A extração do solvente das gotas e consequente solidificação pode descrever-se, em termos de transferência de massa, como a difusão do solvente do interior da gota para a superfície, seguida da transferência do solvente para a fase contínua por convecção (Figura 8). Modelos matemáticos para a formação das micropartículas partem desta descrição e são habitualmente compostos por três partes (Li et al. 2008): (i) equação de *Fick* que descreve a difusão do solvente dentro da gota; (ii) condições fronteira (não há fluxo de massa no centro da gota e a transferência à superfície corresponde ao encolhimento da gota); (iii) equação que prevê o encolhimento da gota devido à evaporação do solvente. Este é um primeiro modelo base, válido para a etapa 2 acima (ver Figura 7), podendo se expandido para incluir outros fenómenos, nomeadamente a formação de uma crosta sólida de polímero à superfície da gota e o crescimento dessa crosta até completa solidificação e formação da micropartícula.

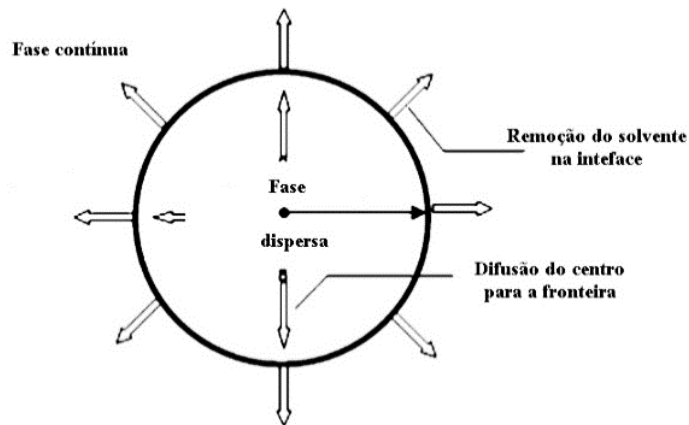


Figura 8 – Extração do solvente do interior da gota para a fase contínua (adap. Li et al. 2008).

Para elucidar a cinética da extração de diclorometano em processos de emulsificação/evaporação do solvente, Katou et al. (2008) desenvolveram um modelo matemático que considera a difusão do solvente do interior para a superfície das gotas como o passo limitante. O coeficiente de difusão do solvente na fase dispersa é calculado a partir de medições da velocidade de evaporação do solvente a partir de uma solução de solvente mais polímero. O estudo concluiu que a extração do solvente da fase dispersa para a fase contínua ocorre muito mais rapidamente do que a evaporação do solvente a partir da fase contínua. Concluiu também que a quantidade residual de solvente na fase contínua tem um forte efeito sobre a morfologia das partículas, sendo necessárias concentrações abaixo de 0,2% para, após filtração e secagem, se obterem partículas que não agreguem.

Heiskanen et al. (2012) estudaram o efeito do tempo de solidificação sobre o tamanho e a morfologia de microesferas de metilaluminoxano. Para tal, ao fim de aproximadamente 20 min de emulsificação, um caudal de fase contínua entre 15 e 300 mL/min foi adicionado por 10 min à emulsão de modo a acelerar a extração do solvente da fase dispersa para a fase contínua. Verificou-se que quanto maior era o caudal de fase contínua adicionado, menor era o tempo de solidificação. O tempo de solidificação praticamente não influenciou o diâmetro médio e a distribuição de diâmetros das microesferas, sendo mais influente sobre a morfologia das microesferas, formando-se mais microesferas não esféricas para um tempo de solidificação superior. Uma explicação para a má formação destas microesferas é o fato das gotículas serem esticadas pela tensão de corte por mais tempo e não serem capazes de voltar à forma esférica termodinamicamente mais favorável, devido à alta viscosidade da gotícula.

Técnicas de monitorização da formação das partículas

A monitorização da formação das partículas é um importante passo para o desenvolvimento e otimização de processos de microencapsulamento. Atualmente existe uma vasta gama de técnicas e equipamentos analíticos para caracterização das partículas produzidas, mas poucos são os estudos que avaliam a formação das partículas através de monitorizações *online* dos processos de microencapsulamento.

Duas das técnicas aplicadas à monitorização *online* da formação de partículas são FBRM (*Focused Beam Reflectance Measurements*) e PVM (*Particle Video Microscope*). No estudo de Zidan et al. (2010), estas duas técnicas foram associadas para a monitorização *online* da formação de partículas de PLGA carregadas com ciclosporina A, produzidas por emulsificação/evaporação do solvente.

A técnica FBRM mede a distribuição de comprimento de corda e relaciona-a com a distribuição de tamanhos das partículas. Para tal, uma sonda que utiliza um feixe focalizado de luz *laser* é introduzida na emulsão fazendo o varrimento numa trajetória circular. A luz *laser* que bissecta cada micropartícula é difratada de volta para a sonda e usada para medir o comprimento de corda. Uma vantagem desta técnica é que não depende de uma concentração mínima de partículas, bastando apenas que o tamanho destas esteja na gama de tamanhos detetável (entre 0,25 e 1000 μm).

A técnica PVM consiste numa sonda com vídeo-microscópio de alta resolução, permitindo monitorizar visualmente as etapas de formação das partículas até a total evaporação do solvente e solidificação das partículas.

O estudo de Zidan et al. (2010) concluiu que ambas as técnicas podem ser úteis na avaliação dos efeitos de parâmetros e condições de operação sobre a formação das partículas, facilitando a otimização e o *scale-up* de processos de microencapsulação.

Com o objetivo de estudar a formação de microcápsulas de poliestireno carregadas com parafina, produzidas via polimerização *in situ*, Wan et al. (2011) utilizaram duas técnicas: a CLSM (*Confocal Laser Scanning Fluorescence Microscope*) e microscopia eletrónica de varrimento (SEM). Ambas as técnicas foram utilizadas em modo *offline*, recolhendo-se amostras em diferentes instantes da polimerização que são depois sujeitas a análise. Combinando as imagens obtidas por CLSM e SEM, o estudo conseguiu fazer um registo completo da morfologia das microcápsulas, concluindo que estas apresentam uma morfologia variável ao longo da polimerização.

A espectroscopia de difração *laser* (LDS, *Laser Diffraction Spectroscopy*) é uma técnica amplamente utilizada para medir a distribuição de tamanhos das partículas em múltiplas aplicações, incluindo o caso da microencapsulação (Qiao et al. 2015; Silva et al. 2013; Rodrigues 2012; Trino 2012; Valot et al. 2009). Porém, a sua utilização na monitorização *online* de processos de microencapsulação é ainda muito limitada.

Medendorp et al. (2015) compararam os resultados obtidos por LDS na monitorização *online* e *offline* da formação de partículas produzidas por *spray drying*. As duas monitorizações foram realizadas em equipamentos diferentes que, mesmo operando com os mesmos princípios, apresentaram resultados diferentes. A monitorização *online* mostrou-se mais sensível a partículas e aglomerados maiores, registando maiores tamanhos de partículas e uma distribuição de tamanhos mais ampla que as medições *offline*. A monitorização *online* mostrou-se também mais sensível a mudanças nos parâmetros e condições de operação.

Rodrigues (2012) utilizou pela primeira vez a técnica LDS para monitorização *online* da cinética de formação de partículas de etilcelulose carregadas com aspirina, produzidas por emulsificação/evaporação do solvente. Este estudo antecede diretamente o presente trabalho, em termos de objetivos e metodologia, usando o próprio copo de análise do equipamento de LDS (Mastersizer 2000E) como reator de emulsificação/evaporação do solvente. O estudo avaliou o efeito da velocidade de agitação e do aumento da concentração de surfactante na fase contínua. Apesar de alguns testes se terem revelado inconclusivos (devido à hidrodinâmica do equipamento favorecer a agregação das partículas), Rodrigues (2012) concluiu que a monitorização através desta técnica é viável, mesmo perante alguns aspetos mais complexos do sistema escolhido como caso de estudo.

A técnica LDS também é usada na medição da distribuição de tamanhos de gotas em emulsões. Oliveira (2010) comparou as diferentes técnicas para caracterização *offline* do tamanho de gotas em emulsões a/o, incluindo LDS. Relativamente a esta técnica, avaliou-se o efeito da variação dos índices de refração de ambas as fases, utilizando um modelo de cálculo para partículas irregulares e outro para partículas esféricas. Concluiu-se que os resultados obtidos com o modelo para partículas irregulares eram altamente dependentes dos índices de refração, enquanto que usando o modelo para partículas esféricas (mais adequado para emulsões), as variações dos índices de refração não alteravam significativamente a resposta do equipamento, dependendo esta apenas do ângulo da luz *laser* difratada e da obscuração.

2.5. Definição do plano de estudos

A revisão bibliográfica atrás apresentada nas secções 2.1 a 2.4 foi relevante na exposição global de conceitos, funções e métodos associados a processos de microencapsulação. O método de emulsificação/evaporação do solvente foi elucidado em detalhe e concluiu-se que se tratava de uma técnica simples, dependente de poucas matérias-primas e facilmente manipulável de modo a alterar as características das partículas desejadas. Os estudos referidos, onde é avaliada a influência de alguns parâmetros e condições de operação, também foram importantes na definição do plano de experiências para o presente trabalho, que será apresentado mais adiante (secção 3.2.5.).

Quanto à monitorização da cinética de formação das partículas, ficou claro que a maioria dos estudos fazem uso de técnicas *offline* e que os estudos com medições *online* indicam que são necessários mais desenvolvimentos para que a monitorização *online* se afirme como uma ferramenta efetiva e eficiente para a otimização e *scale-up* de processos de microencapsulação. O presente trabalho surge neste sentido e vem no seguimento do estudo de Rodrigues (2012), sendo em ambos os casos proposta a técnica LDS para a monitorização *online* de processos de microencapsulação por emulsificação/evaporação do solvente.

Face a revisão bibliográfica e aos resultados de Rodrigues (2012), decidiu-se efetuar estudos com formulações mais simples, de modo a minimizar efeitos específicos e difíceis de prever, e assim concentrar o estudo na proposta da técnica LDS como técnica de monitorização *online*. As simplificações face ao caso estudado por Rodrigues (2012) são as seguintes: (i) monitorizar em primeiro lugar a formação de micropartículas não carregadas com fármaco e só

depois incorporá-lo; (ii) escolher um fármaco praticamente insolúvel em água (ibuprofeno, em vez de aspirina); (iii) escolher um solvente menos miscível em água e mais volátil (diclorometano, em vez de acetato de etilo). O polímero e o surfactante utilizados são os mesmos, respetivamente etilcelulose e Tween 80.

Definiu-se inicialmente uma formulação base para testes *offline*, que foi depois adaptada de modo a viabilizar a monitorização *online* no equipamento de LDS. A formulação e condições de operação base foram então manipuladas de modo a avaliar a influência dos seguintes parâmetros na formação das micropartículas: fração volumétrica da fase dispersa, viscosidade da fase dispersa, concentração de surfactante, velocidade de agitação e concentração de fármaco na fase dispersa. As partículas produzidas foram caracterizadas, determinando-se o rendimento global, a distribuição de tamanhos, e recolhendo-se imagens de microscópio ótico e eletrónico de varrimento.

3. Materiais e métodos experimentais

3.1. Materiais

- Ibuprofeno, 2-(4-Isobutylphenyl) propionic, > 98%, Tokyo Chemical Industry (TCI);
- Etilcelulose, Acros Organics, 48%, 22 cP (solução 5% 80/20 tolueno/etanol);
- Diclorometano, Fisher Chemical;
- Tween 80, Merck KgaA;
- Água destilada.

3.2. Métodos experimentais

3.2.1. Emulsificação/evaporação do solvente

As partículas são produzidas pelo método de emulsificação/evaporação do solvente. A emulsão óleo-em-água contém uma fase dispersa constituída pela etilcelulose (EC), diclorometano (DCM) e ibuprofeno (IB), e uma fase contínua contendo Tween 80 e água destilada.

Os testes são efetuados em *hotte*, numa montagem que respeita as características necessárias para uma boa emulsificação (ver secção 2.3.2.): copo com diâmetro de 8 cm, altura do líquido de 7,5 cm, agitador do tipo *Rushton* (diâmetro de 3,5 cm, 6 pás, situado a 2,5 cm da base do copo) e velocidade de agitação mecânica de 600 rpm.

Após um conjunto de ensaios preliminares (Anexo I), estabeleceu-se uma formulação base para produção de partículas sem ibuprofeno (designadas por PE). Esta formulação foi depois adaptada para o caso de partículas carregadas com ibuprofeno (designadas por PEI). Estas formulações são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Formulações base para produção das partículas.*

ϕ	Fase dispersa	Fase contínua
Partículas de etilcelulose (PE)		
10%	4% de etilcelulose 43,1 mL de diclorometano	1% Tween 80 3 mL de diclorometano 400 mL de água destilada
Partículas de etilcelulose carregadas com ibuprofeno (PEI)		
10%	4% de etilcelulose 2% de ibuprofeno 41,9 mL de diclorometano	1% Tween 80 3 mL de diclorometano 400 mL de água destilada

* ϕ é a percentagem volumétrica de fase dispersa. As restantes percentagens são mássicas e relativas a cada uma das fases.

Apesar da baixa solubilidade do diclorometano em água, após alguns ensaios, optou-se por preparar a fase contínua com uma concentração de diclorometano correspondente a 80% de saturação, a 35°C. Deste modo, previne-se a transferência súbita do diclorometano para a fase contínua e a precipitação prematura da etilcelulose.

A fase dispersa é preparada num copo auxiliar, com agitação magnética e à temperatura ambiente. A fase contínua é preparada no copo de emulsificação, sob agitação mecânica vigorosa (600 rpm) e a temperatura controlada de 20°C. A fase dispersa é em seguida adicionada lentamente à fase contínua, com o auxílio de uma vareta (método de decantação), sendo mantidas as mesmas condições de operação do preparo da fase contínua.

Inicia-se então a fase de emulsificação, mantendo-se a agitação vigorosa (600 rpm). Durante os primeiros 15 min, mantém-se a temperatura a 20°C e em seguida, de modo a promover a evaporação do diclorometano, aquece-se o sistema até 35°C, mantendo-se esta temperatura até que todo o diclorometano evapore (cerca de 4 h). A verificação do término da evaporação do diclorometano é feita por diferença de volume e pela clarificação da mistura (que passa de uma emulsão esbranquiçada e opaca a uma suspensão de micropartículas mais transparente). Terminada a evaporação, recolhem-se as partículas num filtro, lavam-se as partículas com água, removendo-se resíduos de surfactante e finalmente secam-se as partículas numa estufa a 37°C durante 24 h. Após a secagem as partículas são peneiradas, com uma malha de 600 μm , de modo a retirar partículas que advieram da precipitação precoce da etilcelulose, eventuais aglomerados de partículas e ainda películas de etilcelulose que aderem às superfícies do copo e do agitador.

No Anexo II, apresenta-se uma descrição detalhada de todo o procedimento de fabrico das partículas por emulsificação/evaporação do solvente.

3.2.2. Medição da viscosidade da fase dispersa

A viscosidade da fase dispersa foi medida utilizando um reómetro de tensão controlada, modelo RheoStress 1 da Haake, com um sistema de sensor cilíndrico Z34 DIN, ligado a um banho de recirculação com termocontrolador (Haake Phoenix II). A temperatura foi fixa em 20°C.

O reómetro trabalhou no modo de tensão de corte controlada, com uma velocidade de corte entre 1 e 100 s⁻¹, durante 240 segundos. Em cada teste utilizou-se uma amostra de 50 mL de fase dispersa com diferentes concentrações de etilcelulose (4, 6 e 8%). Os testes foram feitos em triplicado.

3.2.3. Monitorização *online* da formação das partículas

A monitorização da formação das partículas foi realizada através de espectroscopia de difração *laser* (LDS, *Laser Diffraction Spectroscopy*). Trata-se de uma técnica amplamente utilizada na determinação da distribuição de tamanhos de partículas e é baseada na medição da variação angular na intensidade da luz dispersa quando um feixe de *laser* interage com as partículas. O feixe de *laser* é constituído por 2 fontes de luz: um *laser* azul que mede as pequenas partículas e um *laser* vermelho que deteta as partículas maiores. Para partículas esféricas, quanto menor o seu tamanho, maior será o ângulo de difração da luz (Figura 9a). Para partículas maiores, o seu tamanho proporciona ângulos de difração menores (Figura 9b).



Figura 9 - Difração *laser* em (a) partículas menores e (b) partículas maiores.

A difração *laser* é uma técnica que pode ser influenciada por diferentes fatores, como o comprimento de onda da luz incidente, as propriedades óticas do meio (índice de refração), as propriedades óticas das partículas e a sua concentração no meio de dispersão. Uma dispersão

com concentração elevada de partículas pode causar a dispersão múltipla da luz, proporcionando resultados inconclusivos e difíceis de analisar (EDQM 2013).

A intensidade de luz difratada pelas partículas em vários ângulos é medida por um detetor e os valores numéricos são registados e transformados com o auxílio de um modelo apropriado, obtendo-se uma distribuição de tamanhos das partículas, num número discreto de classes de tamanhos, e calculada em percentagem do volume total de partículas. A Figura 10 ilustra os elementos básicos da técnica LDS.

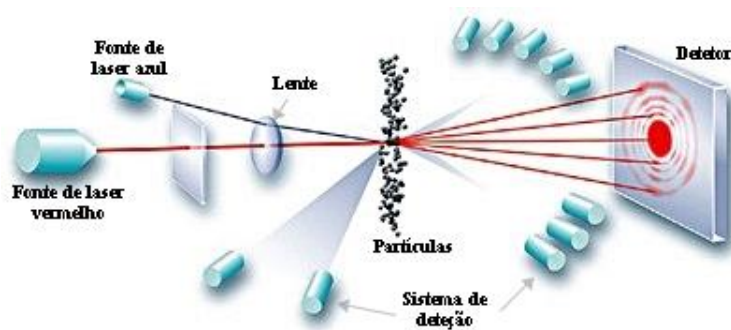


Figura 10 - Representação esquemática da técnica LDS (adap. Rodrigues 2012).

Entre os modelos utilizados no tratamento do sinal nestes sistemas destacam-se as teorias de Fraunhofer e Mie (Morrison & Ross 2002). A teoria de Fraunhofer é um caso especial da teoria de Mie pois não requer o conhecimento das propriedades óticas das partículas, isto é, assume que as partículas são esféricas e opacas e a luz dispersa é apenas devida a interação do feixe de *laser* com a superfície da partícula. Desta forma, a teoria é mais aplicável para partículas grandes e para valores elevados da razão índice de refração do sólido/índice de refração do líquido.

A teoria de Mie é mais completa e consegue prever o tamanho de todas as partículas, opacas ou transparentes. Assume que as partículas são esféricas, a suspensão é diluída de modo a não haver dispersão múltipla da luz e as propriedades óticas da partícula e do meio são conhecidas.

O equipamento utilizado neste trabalho é o Mastersizer 2000E com unidade de dispersão da amostra Hydro 2000MU (Figura 11), que assegura a entrega da amostra à área de medição em concentrações e quantidades adequadas. O equipamento utiliza como modelo para tratamento do sinal a teoria de Mie e é capaz de medir partículas numa gama de 0,1 a 1000 μm (Malvern Instruments Ltd 2007b). A concentração das partículas na amostra deve ser ajustada de modo a obter-se uma obscuração idealmente entre 10 e 20%, sendo toleráveis valores entre

5 e 50% (a obscuração é a fração de luz emitida que é detetada num ângulo diferente de zero; ver Figura 10).



Figura 11 - Mastersizer 2000E com Hydro 2000MU.

O software do equipamento calcula dois diâmetros médios: o diâmetro médio pesado em volume (d_{43}) e o diâmetro médio pesado em área superficial (d_{32} , também conhecido por diâmetro de Sauter). Fornece também os percentis 10, 50 e 90 da distribuição de diâmetros pesada em volume, respetivamente $d(10)$, $d(50)$ e $d(90)$. Por exemplo, $d(10) = 5 \mu\text{m}$ significa que 10% do volume de partículas tem diâmetro abaixo de $5 \mu\text{m}$. A largura (relativa) δ da distribuição é estimada pela Equação 3.

$$\delta = \frac{d(90) - d(10)}{d(50)} \quad (3)$$

No presente trabalho, a técnica LDS é incorporada no procedimento de fabrico das partículas, utilizando o próprio copo de análise do Mastersizer como reator de emulsificação/evaporação do solvente, permitindo assim a monitorização *online* da formação das partículas.

Na fase I, prepara-se uma emulsão tal como descrito na secção 3.2.1, num copo com agitação mecânica vigorosa e temperatura controlada (20°C). A duração desta primeira fase é de 45 min, estando em princípio a emulsão bem estabilizada ao final deste tempo. A evaporação de diclorometano é minimizada tapando-se o copo agitado com parafilme.

Uma vez preparada esta primeira emulsão, inicia-se a fase II do processo, transferindo-se a emulsão para o Mastersizer. Este tem incorporado um sistema de agitação, que funciona

também como sistema de sucção que faz circular a amostra através da zona de medição (Figura 12).

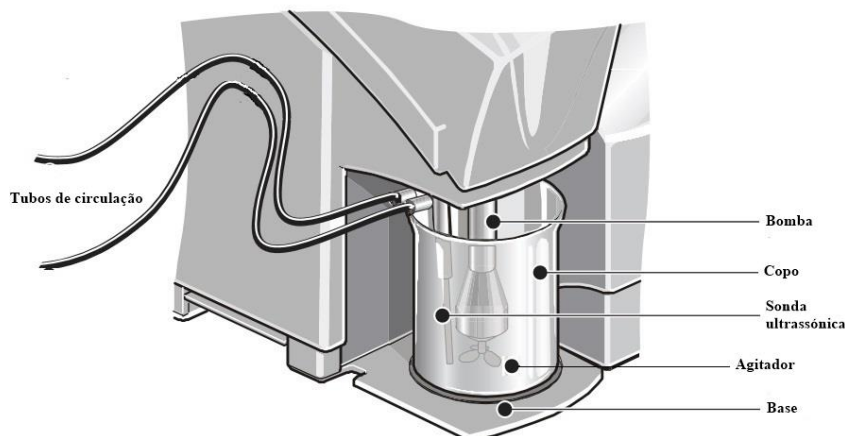


Figura 12 - Sistema de agitação com sucção para circulação da amostra através da zona de medição (adap. Malvern Instruments Ltd 2007a).

Após um período inicial de arranque, começa-se então a aquisição da distribuição de tamanhos das partículas (inicialmente gotículas), primeiro durante 45 min a 20°C e depois durante 2 h a 35°C.

O tempo total de emulsificação/evaporação do solvente é de 45 min (fase I) mais 2h45min (fase II). De modo a controlar a temperatura, incorporou-se no copo do Masterziser uma camisa por onde circula água de aquecimento a temperatura controlada.

O alinhamento do Mastersizer foi feito com água, cujo índice de refração é 1,33. Para a etilcelulose, considerou-se um índice de refração igual a 1,47 (Dow Cellulosics 2005; Hercules Inc. 2002).

De modo viabilizar a monitorização no Mastersizer, a formulação base estabelecida na secção 3.2.1. sofreu as seguintes alterações: (i) aumentou-se o volume da emulsão para o volume mínimo de operação do equipamento (500 mL); (ii) de modo a evitar a dispersão múltipla da luz, fez-se a diluição da emulsão reduzindo a fração volumétrica (ϕ) de 10 para valores entre 2 e 4%; (iii) a concentração de surfactante na fase contínua foi reduzida nas mesmas proporções da redução de ϕ . O conjunto das formulações testadas e monitorizadas *online* será apresentado na secção 3.2.5.

3.2.4. Caracterização das partículas

Rendimento global

O rendimento global foi determinado através da pesagem das partículas secas peneiradas. É definido pela Equação 4 para as PE e pela Equação 5 no caso das PEI.

$$\text{Rendimento global PE (\%)} = \frac{\text{massa PE}}{\text{massa inicial de etilcelulose}} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{Rendimento global PEI (\%)} = \frac{\text{massa PEI}}{\text{massa inicial de etilcelulose} + \text{massa inicial de ibuprofeno}} \times 100 \quad (5)$$

Microscopia ótica

A microscopia ótica está entre as técnicas mais antigas e utilizadas em diferentes áreas da ciência. Nesta técnica é possível avaliar o tamanho e morfologia das partículas através de imagens bidimensionais e, apesar de ao longo dos anos a microscopia ótica ter sido substituída ou complementada por técnicas mais avançadas, trata-se de uma técnica de referência devido às suas capacidades, nomeadamente: fornece informações sobre morfologia da partícula, necessita de uma quantidade reduzida de amostra, permite obter informações sobre presença de aglomerados, e ser de fácil execução e de baixo custo quando comparada com outros equipamentos de aquisição de imagens.

Neste estudo, a microscopia ótica foi utilizada na caracterização das partículas finais (tamanho, forma e existência de aglomerados), e também na avaliação da transição gota-partícula através de amostras recolhidas durante os ensaios de monitorização *online*.

O equipamento utilizado foi o microscópio ótico Olympus BH-2 acoplado a um sistema de análise de imagem AnalySIS, com capacidade de ampliação de 40 a 400x. Tanto para as partículas finais como para as amostras ao longo do tempo de processamento, recolheram-se imagens com ampliações de 40, 100 e 200x.

Para a análise das partículas finais, depositou-se uma pequena quantidade diretamente sobre a lâmina de vidro. Quanto às amostras ao longo do tempo, estas são depositadas sobre a lâmina de vidro e tapadas com uma lamela.

Microscopia eletrónica de varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM, *Scanning Electron Microscopy*) é uma técnica amplamente utilizada em estudos que desejam obter imagens tridimensionais de elevada qualidade.

Esta técnica utiliza um feixe de eletrões de pequeno diâmetro que varre sequencialmente a amostra, fazendo com esta emita eletrões secundários. Estes são os responsáveis pela formação da imagem que é construída à medida que o material é percorrido (Dedavid et al. 2007).

Para que a amostra emita os eletrões secundários, é necessário vaporizar sobre ela uma fina camada de ouro de modo a aumentar a capacidade de reflexão dos eletrões primários. Como estes são facilmente defletidos por moléculas em estado gasoso, o varrimento é feito sob vácuo.

O equipamento utilizado é da marca Zeiss, modelo Merlin Gemini 2, com uma gama de ampliações de 50 a 200000x. O equipamento de pulverização é da marca Edwards, modelo EXC120 acoplado a uma fonte Huttinger PFG1500DC. Os equipamentos encontram-se no Instituto Pedro Nunes (IPN) e, no presente estudo, recolheram-se imagens com ampliações entre 150 e 1500x.

Distribuição de tamanhos das partículas

A distribuição de tamanhos das partículas produzidas ao fim dos testes é obtida pela técnica de difração *laser* no equipamento Mastersizer 2000E (ver mais detalhes na secção 3.2.3.).

As amostras foram preparadas utilizando aproximadamente 0,5 g de partículas ou todas as partículas obtidas, quando a sua quantidade total era inferior a 0,5 g. A amostra foi adicionada a 10 mL de água destilada, com 3 gotas de Tween 80, para facilitar a desaglomeração das partículas, e esta suspensão foi agitada por 10 min e em seguida adicionada ao copo do Mastersizer. A distribuição de tamanhos das partículas suspensão foi então medida no equipamento e de seguida submetida a ultrassons (15 Kz durante 30 s) no próprio equipamento, medindo-se novamente a distribuições de tamanhos das partículas.

3.2.5. Plano de experiências

A partir da formulação base usada nos testes *offline* (Tabela 2, partículas sem ibuprofeno), estabeleceram-se as seguintes condições base para os testes *online*:

- Fase dispersa com 4% de etilcelulose (EC) e 96% de diclorometano (DCM);
- Fase contínua com 0,3% m/m de Tween 80 e saturada a 80% com DCM;
- 3% em volume de fase dispersa;
- Velocidade de agitação (agitador do Mastersizer) igual a 1500 rpm.

A partir destas condições base, definiu-se então o plano de experiências registados na Tabela 3, com o objetivo de avaliar a influência dos seguintes parâmetros na cinética de formação das micropartículas: fração volumétrica da fase dispersa, viscosidade da fase dispersa (fazendo variar a concentração de polímero nesta fase), concentração de surfactante, velocidade de agitação e concentração de fármaco. Para todos os casos, a preparação das micropartículas passa pelas fases I e II atrás descritas (secção 3.2.3.), sendo a fase I uma primeira emulsificação fora do Mastersizer (a 20°C) e a fase II a continuação desta emulsificação e subsequente evaporação do solvente (a 35°C), que tem lugar no Mastersizer com monitorização *online* da evolução da distribuição de tamanhos das gotas/partículas.

No caso da influência da concentração de fármaco (ibuprofeno, IB), o teste base adotado foi o EC +, isto é, partimos de uma concentração de 6% de etilcelulose. Optou-se por essa condição porque após o estudo da influência da viscosidade da fase dispersa, verificou-se uma maior estabilidade da emulsificação no LDS preparada com 6% de etilcelulose e entendeu-se que isto poderia favorecer o fabrico de partículas carregadas com IB. A influência da viscosidade da fase dispersa na formação das partículas carregadas com IB não foi objeto de estudo no presente trabalho.

Deve notar-se que este é um primeiro plano de experiências exploratório, não tendo sido realizadas réplicas, nem o plano desenhado no sentido de construir um modelo estatístico preditivo. O objetivo foi antes tentar cobrir o espaço dos parâmetros de entrada com poucas experiências. Foram considerados apenas 3 níveis para os cinco parâmetros de entrada, que foram variados um de cada vez. O par concentração de EC/velocidade de agitação é uma exceção, tendo sido avaliado o efeito da velocidade de agitação para 4% de EC (testes rpm – e rpm +) e 6% de EC (testes (EC + / rpm -) e (EC + / rpm +)).

Tabela 3 - Plano de experiências para a monitorização *online* da formação das partículas (total de 14 testes).

Teste	ϕ (%)	EC na fase dispersa (% m/m)	Fármaco na fase dispersa (% m/m)	Concentração surfactante (% m/m)	Velocidade de agitação (rpm)
Formulação base					
base	3	4	-	0,3	1500
Influência da fração volumétrica da fase dispersa					
ϕ +	4			0,4	
base	3	4	-	0,3	1500
ϕ -	2			0,2	
Influência da viscosidade da fase dispersa					
base		4			
EC +	3	6	-	0,3	1500
EC ++		8			
Influência da concentração de surfactante					
tween -				0,1	
base	3	4	-	0,3	1500
tween +				0,5	
Influência da velocidade de agitação					
rpm -					1300
base	3	4	-	0,3	1500
rpm +					1900
Influência da concentração de fármaco (ibuprofeno, IB)					
IB -			1,5		
IB	3	6	3	0,3	1500
IB +			4,5		

4. Resultados e discussão

4.1. Formulação base – testes *offline*

Os resultados obtidos na caracterização das PE e PEI (sem e com ibuprofeno, respetivamente), produzidas segundo a formulação base (Tabela 2) são apresentados na Tabela 4 e Figura 13. O rendimento global é de 57%, para as PE, enquanto que no caso das PEI, o rendimento global é de 16%. Esta diferença pode estar relacionada com algumas hipóteses: (i) a etilcelulose pode possuir uma baixa capacidade de carregamento do IB, provocando uma eventual fuga do IB da fase dispersa para a fase contínua durante a solidificação das PEI; (ii) após o processo de secagem das PEI, observou-se que as partículas eram bastante mais endurecidas e fortemente agregadas em comparação com as PE, o que pode justificar a perda de parte destas partículas que ao agregarem-se, possam ter ficado retidas na peneira com malha de 600 μm . A capacidade de carregamento do IB nas partículas de etilcelulose não foi objeto de estudo no presente trabalho.

Tabela 4 - Resultados da caracterização das partículas obtidas pela formulação base – testes *offline*.

Amostra	Massa final (g)	Rendimento global (%)	Tamanhos sem ultrassons			Tamanhos após ultrassons		
			d(10)	d(50)	d(90)	d(10)	d(50)	d(90)
PE	1,37	57	93	145	224	93	145	224
PEI	0,58	16	117	239	410	102	232	403

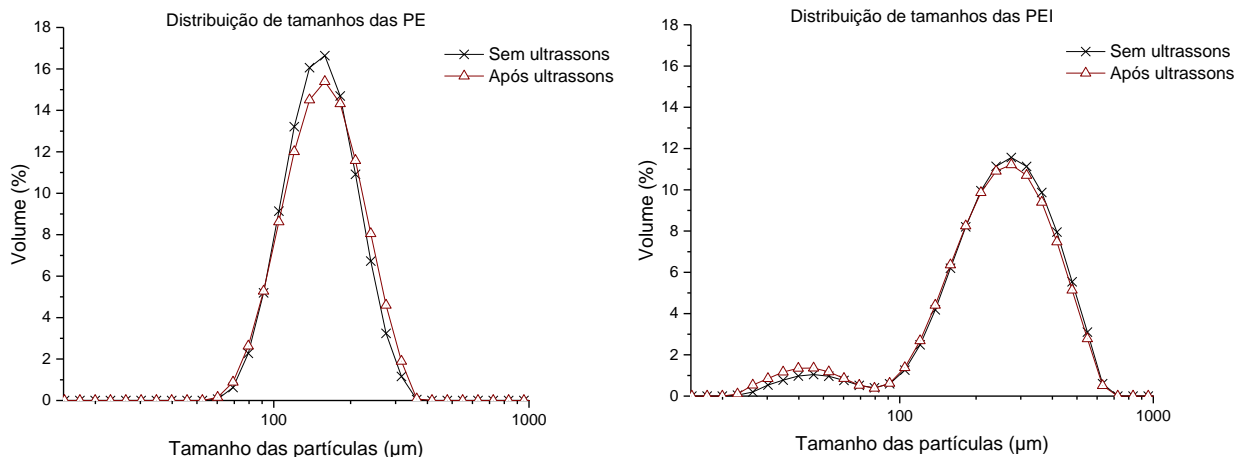


Figura 13 - Distribuição de tamanhos das PE e PEI.

Quanto à distribuição de tamanhos, verifica-se que as PEI apresentam maiores diâmetros e uma distribuição de tamanhos mais alargada. Também se verifica um comportamento bimodal na distribuição de tamanhos das PEI, havendo uma minoria de partículas (menos de 10%) com tamanhos inferiores a 100 μm , o que pode indicar que não se tratam apenas de partículas, mas também de cristais de ibuprofeno presentes na solução.

A aplicação de ultrassons não influenciou os tamanhos das PE, sendo também pouco significativa nas PEI. A microscopia ótica (Figura 14) confirma (qualitativamente) as distribuições obtidas por LDS, indicando que as PEI possuem um grupo de pequenas partículas e também que a maioria das partículas tem tamanho superior às PE.

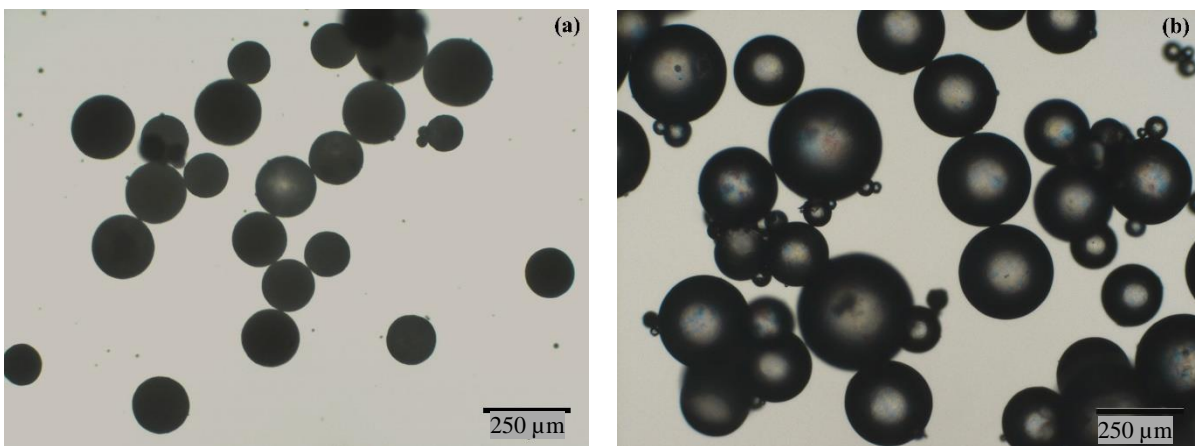


Figura 14 - Imagens obtidas em microscópio ótico das PE (a) e PEI (b). Ampliação 40x.

A Figura 15 apresenta as imagens obtidas em SEM das PE e PEI, e verifica-se que as PE são esféricas, apresentam uma superfície lisa, possuem poucos agregados e uma distribuição de tamanhos mais estreita, tal como na Figura 14. Enquanto que as PEI (Figura 16), também esféricas, apresentam sobre sua superfície cristais de ibuprofeno e uma distribuição de tamanhos mais alargada, com um grupo de pequenas partículas.

Para verificar se havia coerência entre os tamanhos apresentados das partículas nas imagens do SEM (Figuras 15 e 16) e os diâmetros $d(50)$ obtidos na distribuição de tamanhos das partículas (Tabela 4), realizou-se medições do tamanho das partículas nas imagens do SEM, através de *software* de análise de imagens, e verificou-se que os tamanhos apresentados nas duas técnicas são próximos e por isso, um possível desvio aparente que se possa verificar deve-se ao fato da distribuição de tamanhos das partículas por LDS ser medida em volume.

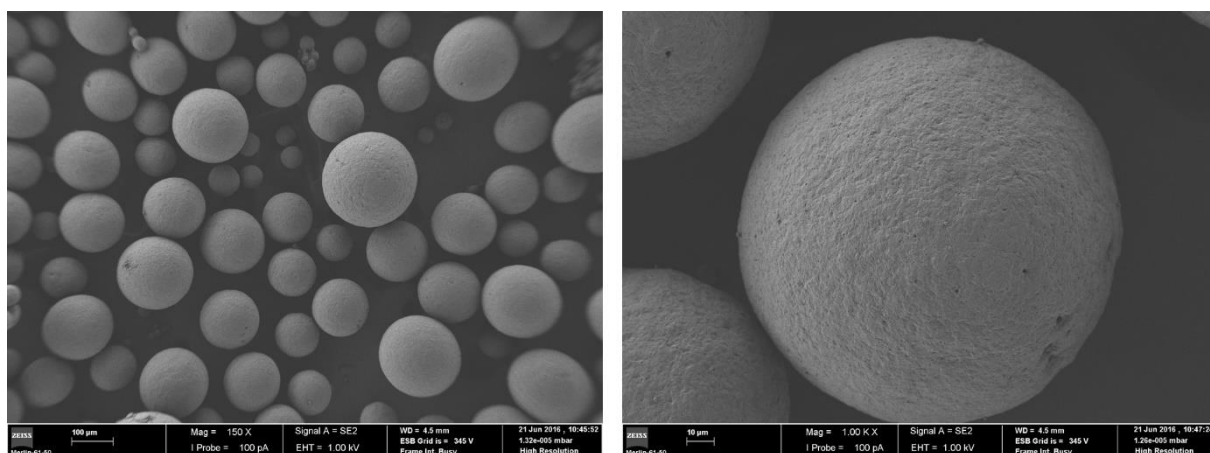


Figura 15 - Imagens obtidas em SEM das PE com ampliação de 150x e escala de 100 µm (imagem a esquerda) e ampliação de 1000x e escala de 10 µm (imagem a direita).

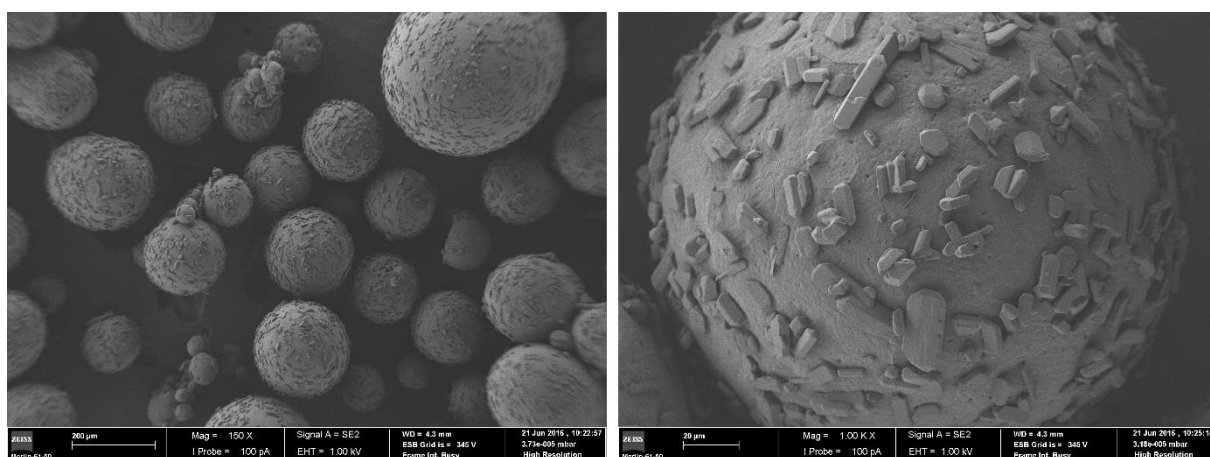


Figura 16 - Imagens obtidas em SEM das PEI com ampliação de 150x e escala de 200 µm (imagem a esquerda) e ampliação de 1000x e escala de 20 µm (imagem a direita).

De modo a verificar se as PEI produzidas se tratavam de microcápsulas ou microesferas, realizaram-se cortes às partículas para avaliar o seu interior (Figura 17). Diante da presença de IB à superfície da partícula, tentou-se estimar uma relação entre a quantidade de IB à superfície e no interior da partícula. Por meio de alguns cálculos baseados numa estimativa da massa específica das PEI¹ e supondo que a proporção entre a EC e IB se mantêm a mesma que a inicial, obteve-se um indicativo de que a relação entre o ibuprofeno no interior e sobre a superfície da partícula era de 2:1, indicando que a maior parte do ibuprofeno na partícula pode estar dissolvido em seu interior. Esta estimativa de IB no interior da partícula, bem como características do processo de produção, fazem concluir que se pode tratar de microesferas.

¹ Massa específica das PEI igual a 0,4 g/mL (Momoh et al. 2014).

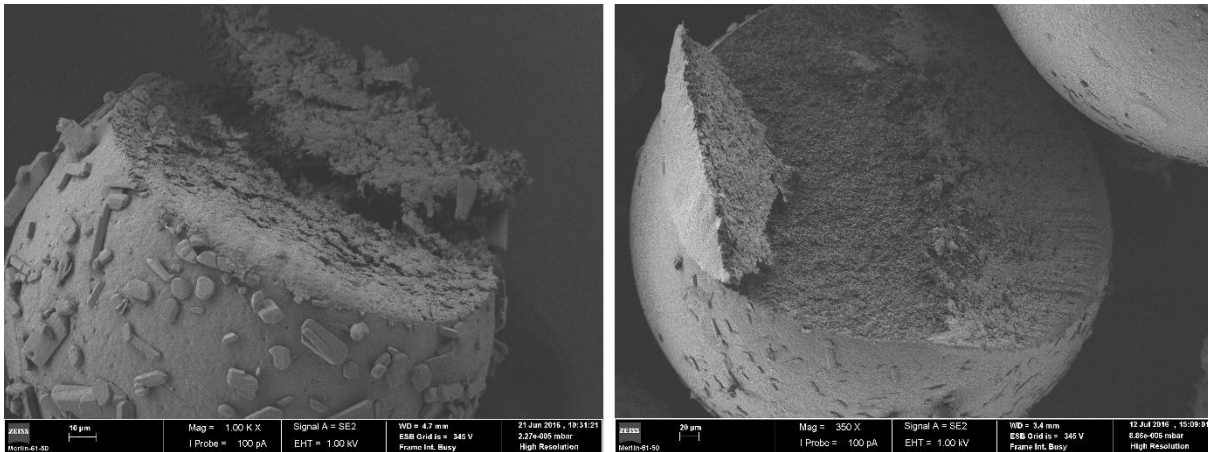


Figura 17 - Imagens obtidas em SEM das PEI cortadas com ampliação de 1000x e escala de 10 µm (imagem a esquerda) e ampliação de 350x e escala de 20 µm (imagem a direita).

Através de metodologia e formulações simples, as partículas produzidas nos testes *offline* serviram como um importante ponto de partida na definição do plano de experiências para a monitorização *online* da formação das partículas (Tabela 3). Os resultados obtidos na monitorização *online* da formação das partículas são apresentados a seguir.

4.2. Monitorização *online* da formação das partículas

4.2.1. Resultados globais e análise comparativa

A Tabela 5 apresenta os resultados do rendimento global e tamanhos das partículas produzidas (sem e após ultrassons) nos testes apresentados no plano de experiências para a monitorização *online* da formação das partículas (Tabela 3).

Verifica-se que o rendimento global dos testes não ultrapassou os 30%, tendo alguns testes apresentado rendimentos globais abaixo de 1%, indicando que praticamente não houve produção de partículas com tamanhos abaixo dos 600 µm. Na tentativa de clarificar os motivos destes baixos rendimentos globais, levantou-se algumas hipóteses:

(i) a etilcelulose possui grande tendência a adesão e, à medida que o diclorometano é extraído da fase dispersa para a fase contínua, parte da etilcelulose que não se estabilizou como gotas começa a aderir aos equipamentos, nomeadamente, ao agitador mecânico (fase I), a bomba e agitador do Mastersizer (fase II) e ao copo da emulsificação, ou seja, parte da etilcelulose inicial se transforma em resíduo, diminuindo a quantidade de partículas produzidas;

(ii) a hidrodinâmica do equipamento favorece a agregação das partículas, produzindo aglomerados de partículas com tamanhos acima dos 600 μm , fazendo com que parte das partículas que foram produzidas e monitorizadas não sejam contabilizadas no rendimento global por ficarem retidas na peneira com malha de 600 μm ;

(iii) as partículas produzidas em LDS apresentaram-se mais deformadas em comparação com as partículas dos testes *offline* (PE), fazendo com que apresentassem uma maior tendência a agregação durante o processo de secagem. Esta tendência reduz o rendimento global na medida que, ao apresentarem agregações com tamanhos superiores a 600 μm , estas também ficam retidas na peneira com malha de 600 μm ;

Os parâmetros e condições de operação avaliados na monitorização também podem diminuir o rendimento global. Estes aspetos serão discutidos em detalhe nos estudos das respetivas influências (secções 4.2.3. a 4.2.7.).

Tabela 5 - Resultados dos testes do plano de experiências para a monitorização *online* da formação das partículas.

Teste	Rendimento global (%)	Tamanhos sem ultrassons (μm)			Tamanhos após ultrassons (μm)		
		d(10)	d(50)	d(90)	d(10)	d(50)	d(90)
$\phi +$	3,3	166	498	1015	33	386	818
base	12,6	69	298	508	48	247	417
$\phi -$	20,0	78	216	445	39	203	402
base	12,6	69	298	508	48	247	417
EC +	3,0	79	345	580	76	355	564
EC ++	2,7	290	400	585	80	357	563
tween -	0,9	-	-	-	-	-	-
base	12,6	69	298	508	48	247	417
tween +	30,0	139	309	604	87	180	374
rpm -	4,8	43	201	355	1079	1381	1694
base	12,6	69	298	508	48	247	417
rpm +	2,6	79	139	310	68	107	200
EC + / rpm -	0,02	-	-	-	-	-	-
EC +	3,0	79	345	580	76	355	564
EC + / rpm +	0,7	-	-	-	-	-	-
IB -	5,9	-	-	-	-	-	-
IB	5,1	-	-	-	-	-	-
IB +	0,57	-	-	-	-	-	-

Ao comparar os rendimentos globais da Tabela 5, verifica-se que os testes ϕ - e tween + destacam-se significativamente perante aos restantes, com rendimentos globais de 20 e 30%, respetivamente. No caso da redução da fração volumétrica da fase dispersa (teste ϕ -), a emulsão está menos concentrada e com isso a extração do solvente da fase dispersa para a fase contínua e a solidificação das partículas ocorrem mais rapidamente, fazendo com que a emulsão passe da fase I para a fase II da monitorização com gotículas mais estabilizadas, facilitando a formação das partículas no equipamento de LDS. Já no caso do aumento da concentração de surfactante (teste tween +), a produção das partículas pode ter sido melhorada devido a redução da tensão interfacial e redução da aglomeração das gotas, principalmente nos momentos iniciais da aquisição em LDS em que a transição da emulsificação da fase I para a fase II pode causar uma maior instabilidade na emulsão.

Nos testes que obtiveram um rendimento global abaixo de 1% (tween -, EC + / rpm -, EC + /rpm + e IB +), não foi possível medir a distribuição de tamanhos das partículas por LDS por não haver uma quantidade razoável de partículas produzidas. No caso dos testes IB - e IB, apesar de apresentarem um rendimento global superior a 5%, optou-se por utilizar as partículas produzidas numa avaliação mais detalhada em microscópio ótico e SEM.

Os tamanhos das partículas produzidas nos testes ϕ + e rpm -, apresentam valores duvidosos. No caso do teste ϕ +, os valores de d(90) sem e após ultrassons, indicam que 90% das partículas apresentam tamanhos inferiores a 1015 e 818 μm , respetivamente. Estes resultados não são coerentes uma vez que as partículas passaram por peneira com malha de 600 μm e com isso, o expectável destes resultados é que apresentassem valores de d(90) à volta dos 600 μm . A mesma inconsistência ocorre no teste rpm -, que após ultrassons apresentou todos os percentis dos diâmetros acima dos 1000 μm , um aumento súbito quando comparado com os resultados sem ultrassons, embora por vezes, em partículas com tendência para aglomerar, os ultrassons passam a ter um efeito contraproducente.

Ao comparar os valores de d(90) (após ultrassons) entre os testes de cada uma das influências avaliadas, verifica-se uma redução significativa dos diâmetros com o aumento da concentração de surfactante (tween +) e da velocidade de agitação no LDS (rpm +). Por outro lado, o aumento da viscosidade da fase dispersa (EC + e EC ++) ocasionou um aumento do diâmetro das partículas produzidas, como seria de esperar.

No Anexo III são apresentadas as evoluções dos diâmetros d(10), d(50) e d(90) ao longo do tempo de emulsificação dos testes cujo estes resultados não são apresentados ao longo deste capítulo.

4.2.2. Formulação base

De modo a viabilizar a monitorização *online* da formação das partículas no Mastersizer, definiu-se uma formulação base (teste base) através de adaptações realizadas sobre a formulação base (PE) dos testes *offline*. As adaptações passaram por diluir a emulsão, reduzindo a fração volumétrica da fase dispersa (de $\phi = 10\%$ para $\phi = 3\%$) e por reduzir a concentração de surfactante nas mesmas proporções da redução de ϕ (de 1% para 0,3% Tween 80).

Os resultados obtidos neste teste base foram importantes para a definição de novas formulações na avaliação de diferentes influências na formação das partículas e para a visualização das características dos resultados fornecidos pelo LDS. Deste modo, apresenta-se a seguir os resultados com uma maior riqueza de detalhes, com o intuito de interpretar não só os resultados finais, como também para perceber melhor as características hidrodinâmicas do LDS, nomeadamente, a instabilidade inicial das aquisições e a tendência para agregação das partículas.

A Figura 18 apresenta as distribuições de tamanhos das partículas do teste base após 47 min (início da aquisição em LDS), 1 h (estabilização da emulsificação), 1h30min (início do aquecimento), 1h50min (emulsão atinge 35°C) e 3h30min (fim da emulsificação) de emulsificação. Verifica-se que após 47 min de emulsificação a curva de distribuição é bimodal, tendo o 2º pico uma distribuição de tamanhos de gotas/partículas com mais de 1000 μm . Este 2º pico pode indicar um momento de instabilidade na aquisição, provocada pelo surgimento de bolhas na janela de aquisição durante os primeiros ciclos ou por uma instabilidade na emulsão devido a transferência do copo de emulsificação da fase I para a fase II da monitorização. A emulsificação estabiliza-se após 15 min de monitorização (1 h de emulsificação), mas continua a apresentar uma curva de distribuição de tamanhos bimodal, alargada e com tamanhos de gotas/partículas entre aproximadamente 10 e 900 μm .

A emulsão começa a ser aquecida (1h30min de emulsificação), apresenta uma curva sutilmente mais deslocada para a esquerda, com uma distribuição de tamanhos de gotas/partículas entre aproximadamente 7 e 800 μm e com um 2º pico mais acentuado. A rampa de aquecimento tem duração de 20 min e, após 1h50min de emulsificação, a emulsão alcança os 35°C. Neste instante a curva de distribuição apresenta uma redução do 2º pico da curva, indicando a redução do tamanho de parte das partículas devido à sua solidificação. No fim da emulsificação (3h30min) a curva de distribuição de tamanhos das gotas/partículas mantém-se

alargada, quase que formando 3 picos, o que deve corresponder à existência de agregados de partículas na suspensão e, eventualmente, a algumas partículas de polímero.

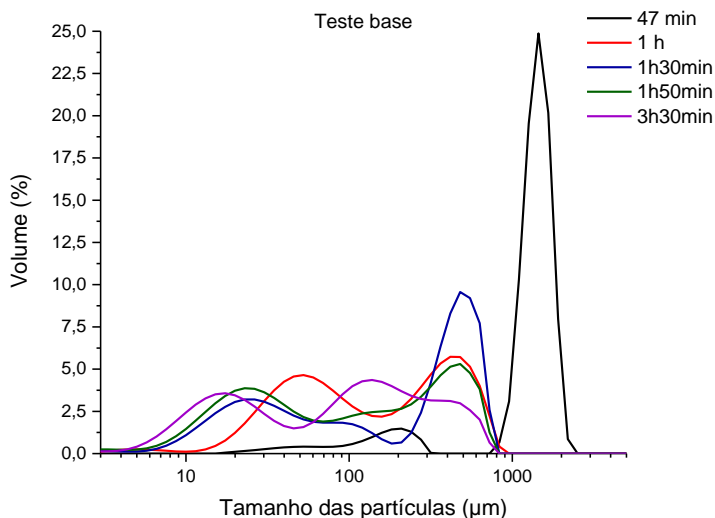


Figura 18 - Distribuição de tamanhos das gotas/partículas do teste base após 47 min, 1 h, 1h30min, 1h50min e 3h30min de emulsificação.

A representação do $d(90)$ ao longo da emulsificação (Figura 19) ilustra o momento inicial de instabilidade na emulsão, que tem duração de aproximadamente 15 min após a transferência do copo de emulsificação da fase I para a fase II da monitorização. Nestes 15 min de instabilidade, os valores dos diâmetros vão de 1650 μm até valores à volta dos 500 μm . Se verifica que, mesmo após a estabilização da emulsificação, os valores adquiridos entre os 155 min (2h35min) e o fim da emulsificação apresentam alguma instabilidade, podendo ser atribuída a uma possível agregação das partículas.

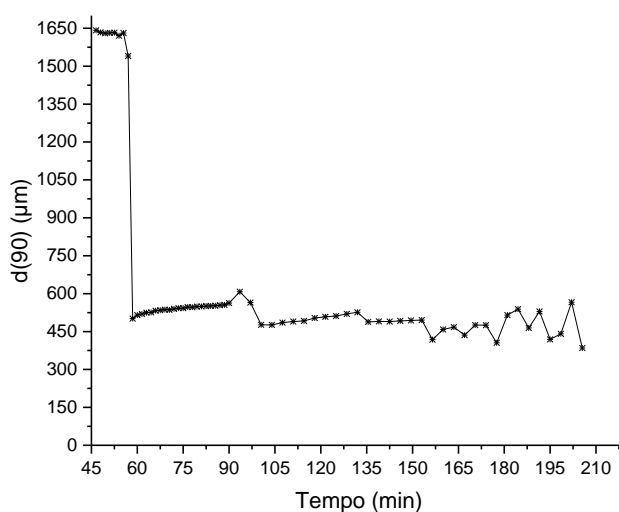


Figura 19 – Evolução do diâmetro $d(90)$ ao longo da emulsificação do teste base.

A Figura 20 apresenta a evolução dos diâmetros $d(10)$, $d(50)$ e $d(90)$ em função do tempo. Optou-se por excluir a instabilidade inicial de 15 min para que a escala do gráfico pudesse ser reduzida e com isso fosse possível avaliar melhor as oscilações dos diâmetros ao longo da emulsificação. Verifica-se que ao longo da emulsificação surgem alguns pontos de instabilidade em determinados instantes, sendo os mais significativos: (i) por volta dos 100 min (1h40min), altura em que a emulsão está a passar pelo processo de aquecimento, o que pode ser motivo de alguma instabilidade na medição, devido a correntes de convecção na zona da janela; (ii) por volta dos 135 min (2h15min) surge outro momento de instabilidade (mais visível nas representações do $d(50)$ e $d(90)$), menos significativo que a instabilidade anterior, indicando que pode se tratar de alguma pequena falha de aquisição do próprio LDS; (iii) de aproximadamente 160 min (2h40min) até o fim da emulsificação, os pontos adquiridos apresentam uma instabilidade ao oscilar os diâmetros, como por exemplo, na representação de $d(90)$ em que os diâmetros oscilam desde 400 até 550 μm o que pode ser devido ao surgimento de agregados à medida que as gotas solidificaram, tratando-se por isso de uma instabilidade do próprio método de aquisição.

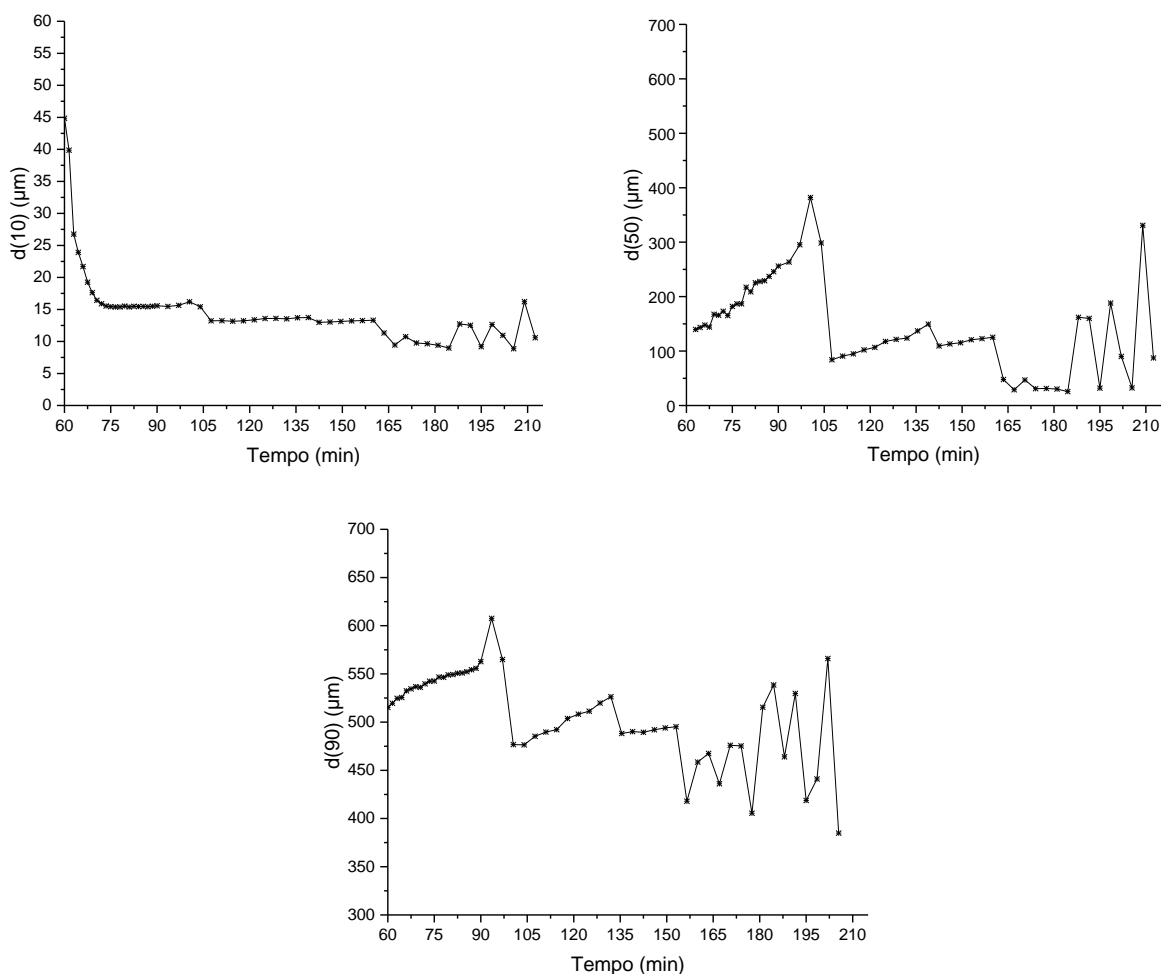


Figura 20 - Evolução dos diâmetros $d(10)$, $d(50)$ e $d(90)$ ao longo do tempo de emulsificação do teste base.

É de realçar nestes perfis da Figura 20, uma tendência inicial para aumento dos tamanhos das gotas/partículas (mais visível nas representações de $d(50)$ e $d(90)$), que pode resultar eventualmente de uma tendência para a coalescência devido à hidrodinâmica do equipamento. Quando a solidificação se aproxima da fase final, existe uma tendência para um a ligeira diminuição do tamanho das partículas.

As imagens obtidas em microscópio ótico após 1h30min, 2 h, 3 h e 3h30min de emulsificação, são apresentadas na Figura 21. Ao longo destes instantes é visível a redução da quantidade de gotas ao longo da emulsificação, embora, no fim da emulsificação (3h30min), ainda seja possível visualizar a presença de algumas pequenas gotas não solidificadas e partículas já agregadas. As partículas solidificadas são esféricas e apresentam diferentes tamanhos.

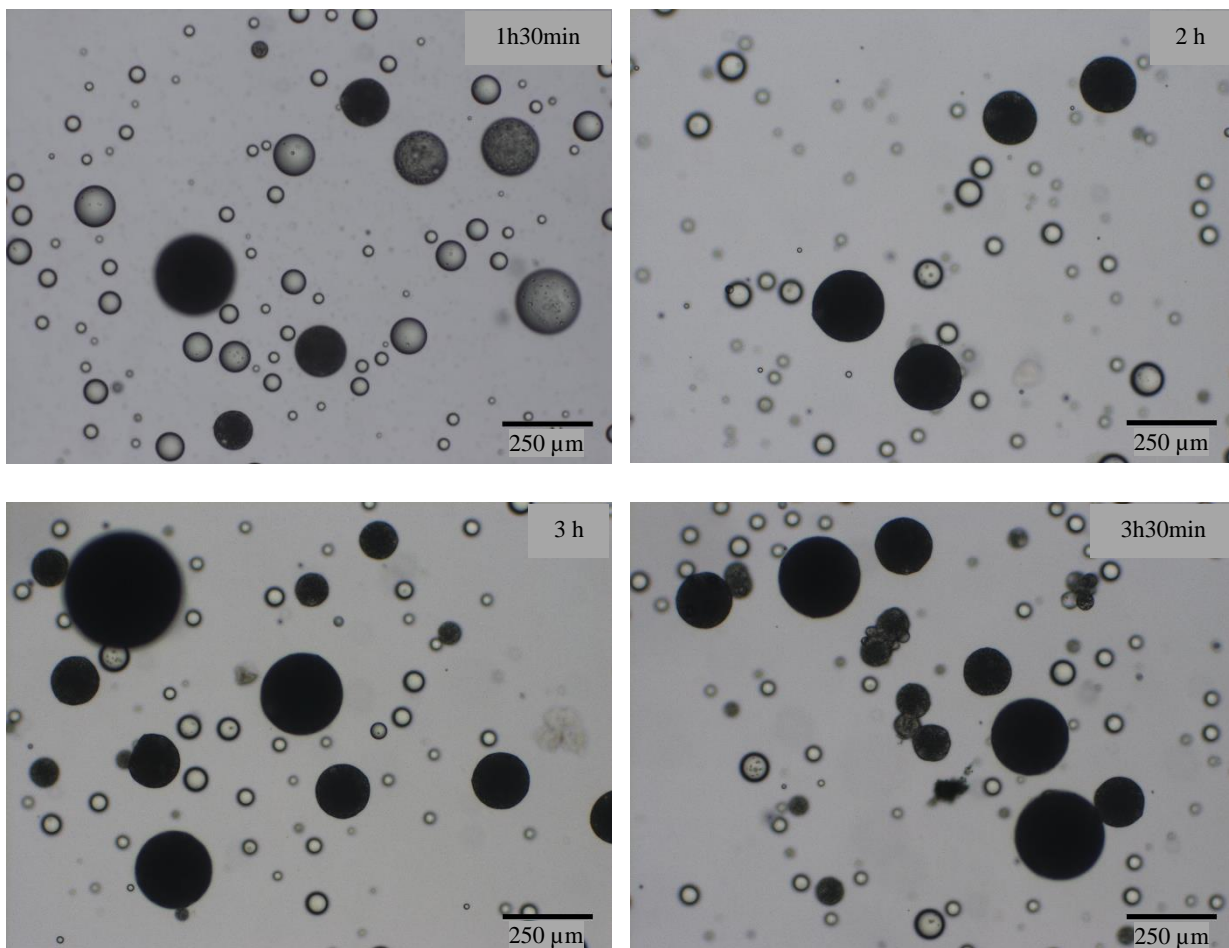


Figura 21 - Imagens obtidas em microscópio ótico para 1h30min, 2 h, 3 h e 3h30min de emulsificação do teste base. Ampliação 40x.

O teste base apresentou um rendimento global de 12,6% e a Figura 22 apresenta imagens obtidas em microscópio ótico das partículas produzidas com uma ampliação de 40 e 100x. Verifica-se que as partículas apresentam algumas deformações, não sendo todas perfeitamente esféricas e possuem elevada tendência a agregação após a secagem. Ao longo da monitorização *online* da formação das partículas já se verificava alguma tendência a agregação (Figura 20), que pode ter sido agravada durante a secagem devido a má formação esférica das partículas.

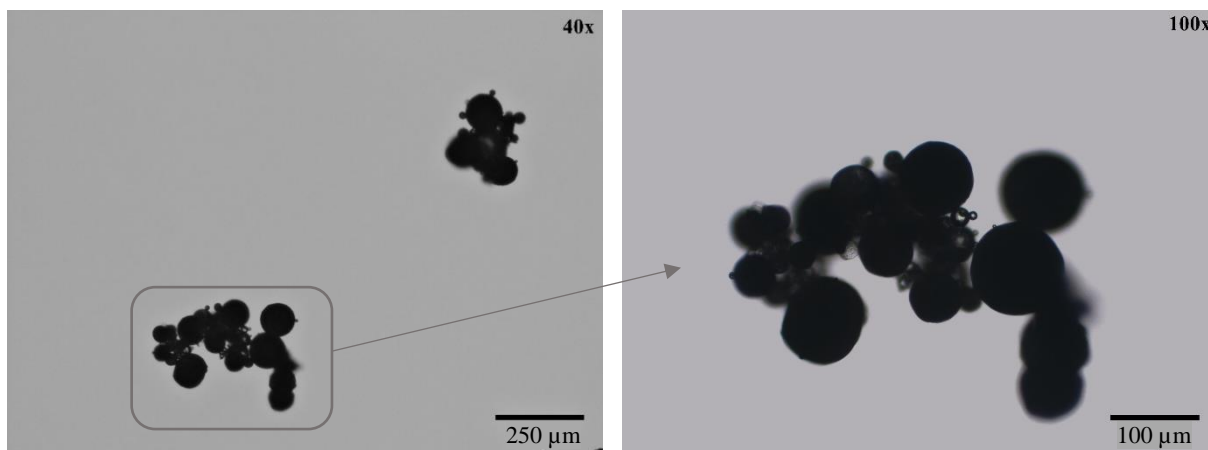


Figura 22 - Imagens obtidas em microscópio ótico das partículas produzidas no teste base com aumentos de 40 e 100x.

A curva de distribuição de tamanhos das partículas do teste base (Figura 23) é bimodal sem e após ultrassons. Verifica-se que antes dos ultrassons o 1º pico é constituído por partículas com tamanhos entre 30 e 130 µm e, após ultrassons, observa-se um estreitamento do 2º pico e um aumento do 1º pico, indicando uma possível desagregação das partículas maiores e confirmando, portanto, a existência de agregados no produto.

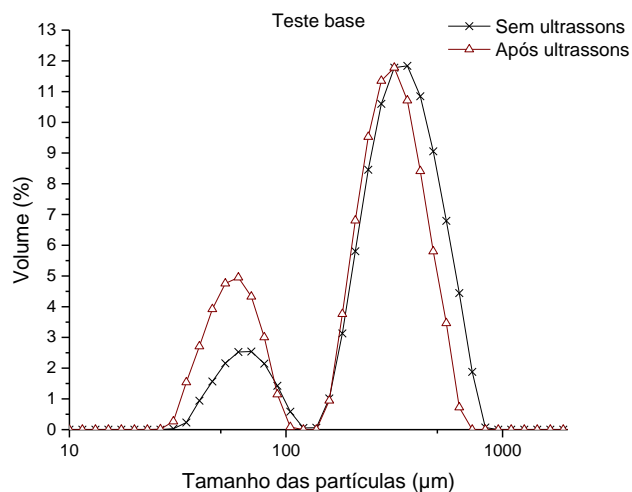


Figura 23 - Distribuição de tamanhos das partículas do teste base sem e após ultrassons.

4.2.3. Influência da fração volumétrica da fase dispersa

A influência da fração volumétrica da fase dispersa na formação das partículas foi avaliada através de emulsões formuladas com ϕ iguais a 4% (teste $\phi +$), 3% (teste base) e 2% (teste $\phi -$). A Figura 24 apresenta as distribuições de tamanhos das gotas/partículas dos testes após 50 min, 1h50min (emulsão atinge 35°C) e 3 h de emulsificação.

Verifica-se que aos 50 min de emulsificação, os testes base ($\phi = 3\%$) e $\phi -$ ($\phi = 2\%$) apresentam curvas que indicam alguma instabilidade na emulsificação, com uma distribuição de tamanhos de partículas que ultrapassam os 1000 μm , que devem resultar do surgimento de bolhas na janela de aquisição durante os primeiros ciclos ou por uma instabilidade na emulsão devido à transferência do copo de emulsificação da fase I para a fase II da monitorização. No caso do teste $\phi +$ ($\phi = 4\%$), aos 50 min de emulsificação, a curva de distribuição de tamanhos é bimodal, e o 1º pico possui tamanhos de partículas que não ultrapassam 1 μm . Estas partículas tão pequenas podem ser um indicativo da formação de partículas satélites que ao longo da emulsificação surgem pela ação do surfactante desaparecendo posteriormente.

Ao fim de 1h50min, os testes apresentam curvas bimodais e mais deslocadas para direita do gráfico consoante a redução de ϕ , indicando assim, um aumento do tamanho das gotas/partículas com a redução de ϕ . Após 3 h de emulsificação, a curva de distribuição de tamanhos do teste $\phi +$ praticamente mantêm-se constante em comparação com a curva apresentada às 1h50min de emulsificação, apresentando tamanhos de gotas/partículas entre aproximadamente 2 e 400 μm . Os testes base e $\phi -$ apresentam curvas mais deslocadas para a esquerda, em comparação com as curvas às 1h50min de emulsificação, indicando uma redução dos tamanhos das gotas/partículas devido a solidificação. O teste base apresenta partículas entre aproximadamente 5 e 800 μm , enquanto que o teste $\phi -$ apresenta gotas/partículas com tamanhos entre 5 e 400 μm .

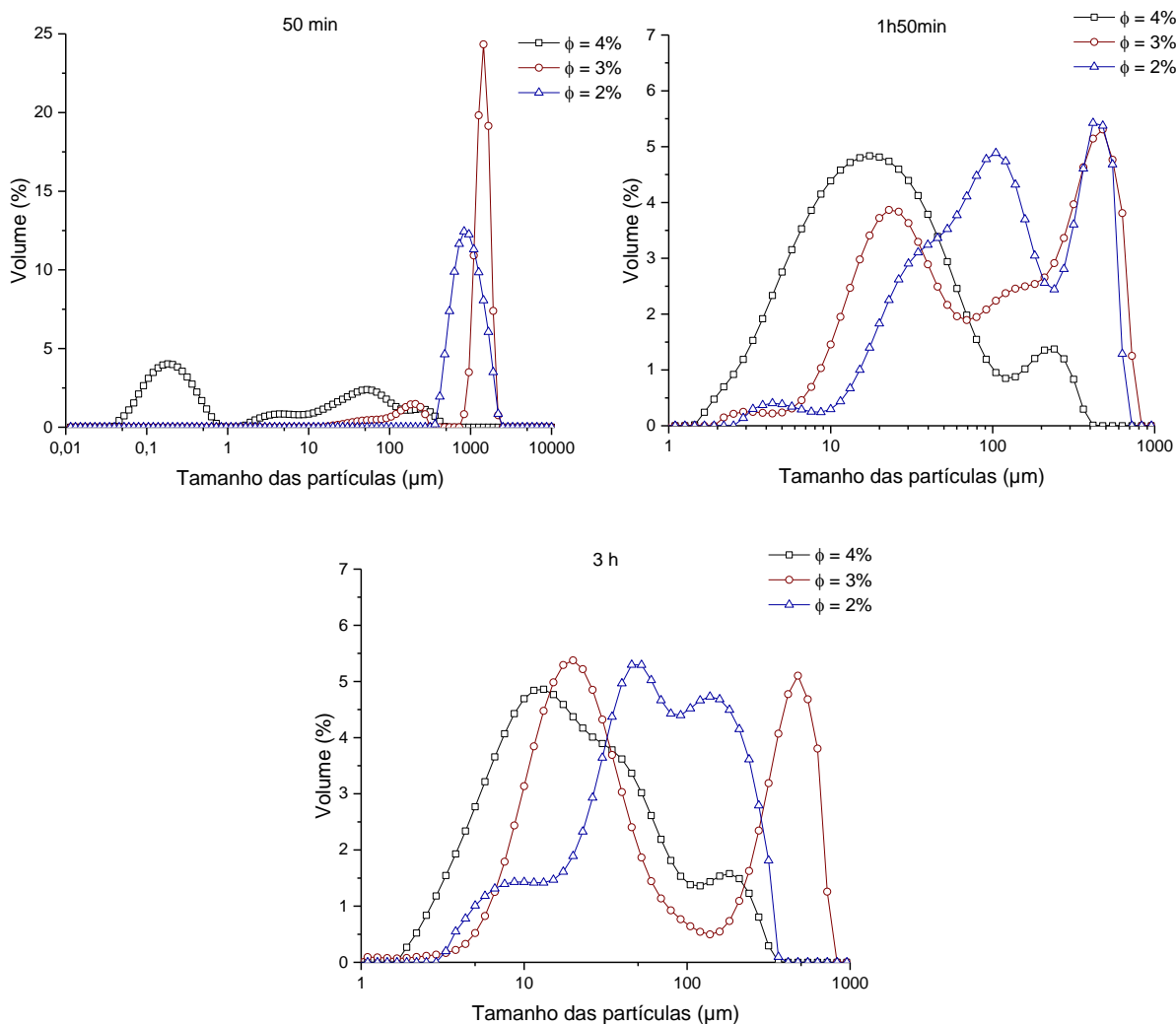


Figura 24 - Distribuição de tamanhos das gotas/partículas dos testes $\phi +$ ($\phi = 4\%$), base ($\phi = 3\%$) e $\phi -$ ($\phi = 2\%$), após 50 min, 1h50min e 3 h de emulsificação.

A Figura 25 apresenta as imagens obtidas em microscópio ótico dos testes após 2 h de emulsificação. Observa-se neste instante da emulsificação que a quantidade de gotas por solidificar diminui com a redução de ϕ , indicando que as partículas possam se solidificar mais depressa com a redução da concentração de fase dispersa na emulsão. Esta tendência é aceitável, uma vez que, em emulsões com frações volumétricas mais baixas, o processo de extração do solvente da fase dispersa para a fase contínua ocorre mais rapidamente, reduzindo o tempo de solidificação das partículas.

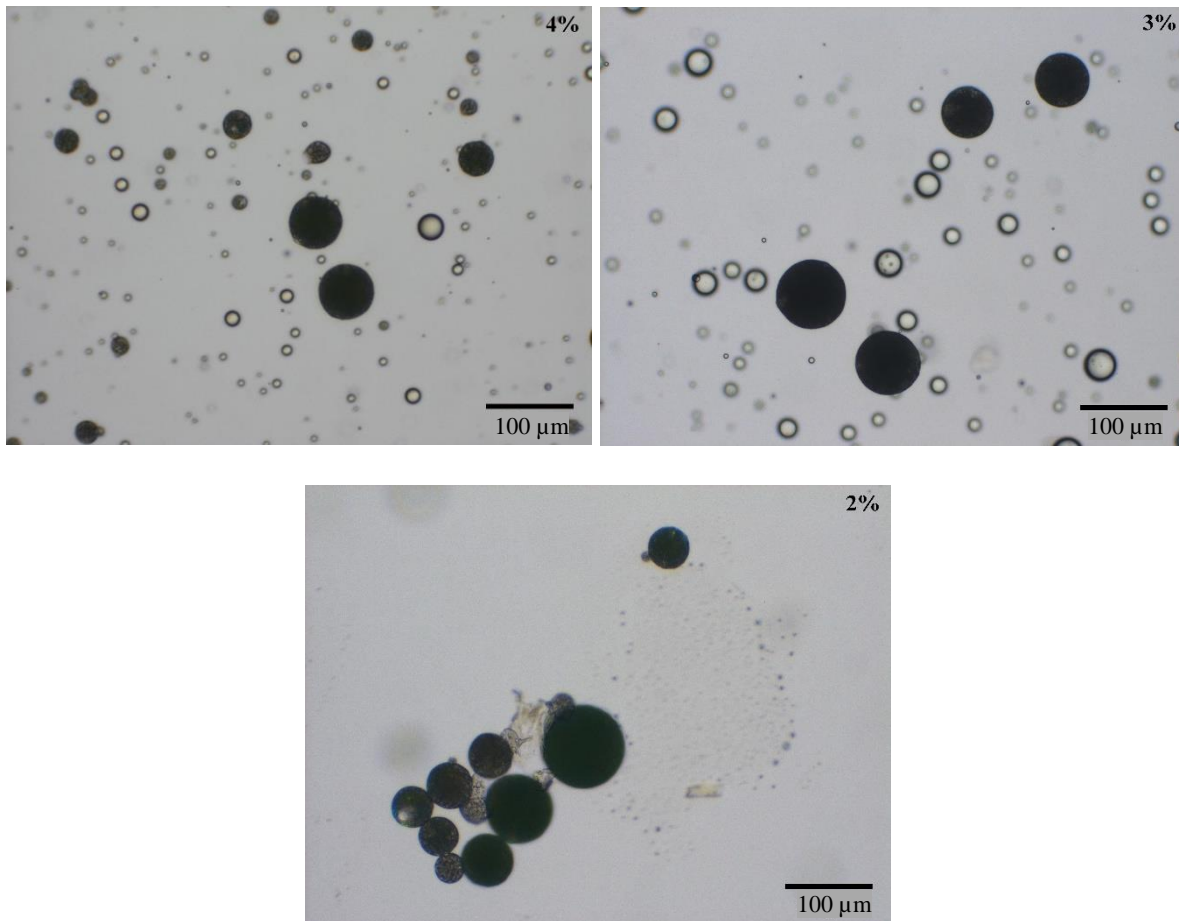


Figura 25 - Imagens obtidas em microscópio ótico dos testes $\phi +$ ($\phi = 4\%$), base ($\phi = 3\%$) e $\phi -$ ($\phi = 2\%$), após 2 h de emulsificação. Ampliação de 100x.

Os testes $\phi +$ ($\phi = 4\%$), base ($\phi = 3\%$) e $\phi -$ ($\phi = 2\%$) apresentaram, respetivamente, um rendimento global de 3,3, 12,6 e 20%. Verifica-se que a redução de ϕ aumentou significativamente o rendimento global dos testes, esta tendência pode ser explicada pelo fato de que quanto menor é o ϕ , mais rapidamente ocorre a extração do solvente da fase dispersa para a fase contínua e, conseqüentemente, hidrodinâmica do LDS pouco afeta negativamente a formação das partículas a partir de gotas que já foram bem estabilizadas na agitação mecânica (fase I). O raciocínio contrário se aplica claramente para explicar o baixo rendimento global do teste $\phi +$ afinal, uma emulsão mais concentrada em fase dispersa precisa de mais tempo para se estabilizar, sendo um indicativo de que a hidrodinâmica do LDS não favorece a formação de partículas em emulsões pouco estabilizadas.

Através da Figura 26, é possível verificar que as partículas produzidas são esféricas e possuem alguma agregação após a secagem. As partículas produzidas no teste $\phi +$ ($\phi = 4\%$) apresentam as menores partículas esféricas, já as partículas produzidas no teste base ($\phi = 3\%$)

apresentam uma maior tendência à agregação e alguma deformação. No teste $\phi - (\phi = 2\%)$, as partículas também são esféricas e existem partículas com diferentes tamanhos.

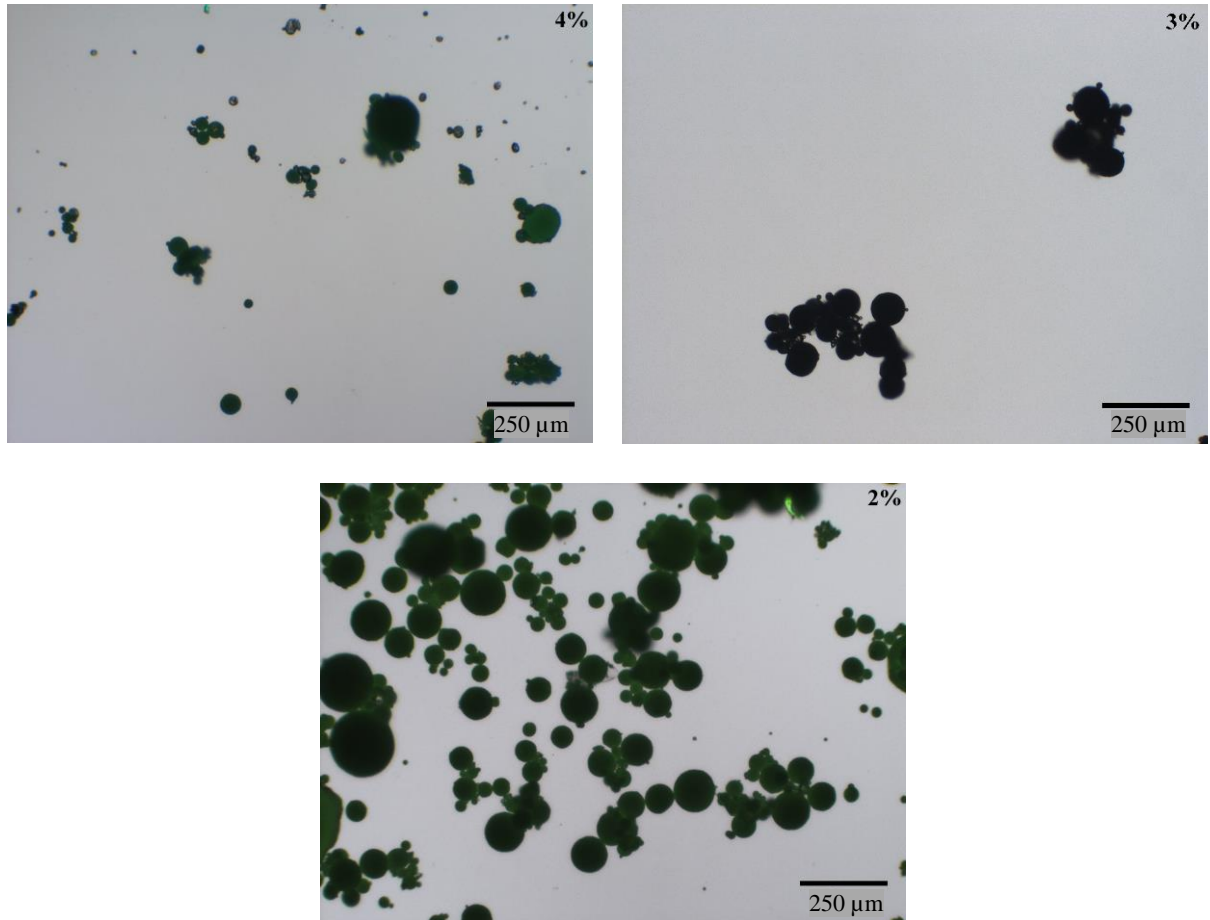


Figura 26 - Imagens obtidas em microscópio ótico das partículas produzidas nos testes $\phi + (\phi = 4\%)$, base ($\phi = 3\%$) e $\phi - (\phi = 2\%)$. Ampliação de 40x.

A Tabela 6 apresenta os tamanhos das partículas produzidas nos testes $\phi + (\phi = 4\%)$, base ($\phi = 3\%$) e $\phi - (\phi = 2\%)$. Como já citado na secção 4.2.1., os resultados do $d(90)$ do teste $\phi +$ são duvidosos pois indicam que 90% das partículas apresentam tamanhos inferiores a 1015 e 818 μm , respetivamente, sem e após ultrassons. O expectável destes resultados é que apresentassem valores de $d(90)$ a volta dos 600 μm (malha em que as partículas foram peneiradas).

A diferença de tamanhos entre os testes base e $\phi -$ é mais significativa sem ultrassons, sendo o teste $\phi -$ o que possui as partículas com menores tamanhos. Após a aplicação dos ultrassons, o teste base apresenta uma redução tamanho das partículas, indicando uma maior

desagregação das mesmas, e aproxima-se mais dos tamanhos das partículas do teste $\phi -$ (que pouco foram influenciadas pela aplicação dos ultrassons).

Em todo o caso, os resultados obtidos apresentam uma tendência esperada, com o tamanho das partículas a diminuir quando a concentração de fase dispersa diminui, seja devido à redução da viscosidade ou devido uma maior tendência para a agregação das partículas produzidas por emulsões mais concentradas.

Tabela 6 - Tamanhos das partículas produzidas nos testes $\phi +$ ($\phi = 4\%$), base ($\phi = 3\%$) e $\phi -$ ($\phi = 2\%$).

ϕ (%)	Tamanhos sem ultrassons (μm)			Tamanhos após ultrassons (μm)		
	d(10)	d(50)	d(90)	d(10)	d(50)	d(90)
4	166	498	1015	33	386	818
3	69	298	508	48	247	417
2	78	216	445	39	203	402

A fração volumétrica da fase dispersa indica o quão concentrada estará a emulsão e no LDS, esta concentração é medida pelo nível de obscuração do feixe de luz *laser*, ou seja, a escolha da fração volumétrica também passa pelo nível de obscuração ideal (10-20%) ou tolerável (5-50%) que se deseja para o teste. Os valores da obscuração adquiridas ao longo da emulsificação dos testes $\phi +$, base e $\phi -$ são apresentados no Anexo IV e verifica-se que os testes $\phi +$ e base estiveram dentro da gama tolerável de obscuração ao longo de toda a emulsificação, ao contrário do teste $\phi -$ que a dada altura da emulsificação (1h40min), começou a apresentar valores de obscuração abaixo dos 5%. Notou-se neste teste $\phi -$ que as partículas já sólidas começaram a ficar depositadas no fundo do copo e nos tubos de circulação, o que pode explicar esta redução repentina do nível de obscuração, pois, parte das partículas já sólidas não chegavam a passar pela janela de aquisição.

4.2.4. Influência da viscosidade da fase dispersa

A influência da viscosidade da fase dispersa foi verificada através de testes formulados com concentrações de 4% (teste base), 6% (teste EC +) e 8% (teste EC ++) de EC na fase dispersa, que apresentaram viscosidades médias iguais a 0,076 Pa.s, 0,251 Pa.s e 0,342 Pa.s,

respetivamente. O Anexo V apresenta os resultados obtidos da tensão de corte (τ), velocidade de corte ($\dot{\gamma}$) e viscosidade (μ) ao longo dos ensaios.

A Figura 27 apresenta a distribuição de tamanhos das gotas/partículas dos testes após 1 h e 3h30min de emulsificação (fim da emulsificação). Todas as curvas de distribuição de tamanhos são bimodais e após 1 h de emulsificação, verifica-se que o 2º pico da curva é maior quando a viscosidade da fase dispersa dos testes é menor, sendo o teste base (4% EC) o que possui um 2º pico mais acentuado. No fim da emulsificação (3h30min) todas as curvas exibem uma redução dos tamanhos das partículas devido à sua solidificação e verifica-se uma distribuição de tamanhos mais alargada e com uma maior tendência a agregação nos testes com menores concentrações de EC na fase dispersa, em que o teste base apresenta tamanhos de gotas/partículas entre aproximadamente 5 e 800 μm , o teste EC + (6% EC) apresenta gotas/partículas com tamanhos entre 5 e 500 μm e por fim o teste EC ++ (8% EC) apresenta gotas/partículas com tamanhos entre 5 e 140 μm .

Esta menor tendência a agregação e a distribuição de tamanhos mais estreita do teste EC ++ (8% EC) é razoável, pois uma fase dispersa mais viscosa apresenta gotas mais resistentes à tensão de corte, o que pode resultar numa maior estabilidade ao longo da aquisição fazendo com que a tendência a agregação seja reduzida e a distribuição de tamanhos mais estreita.

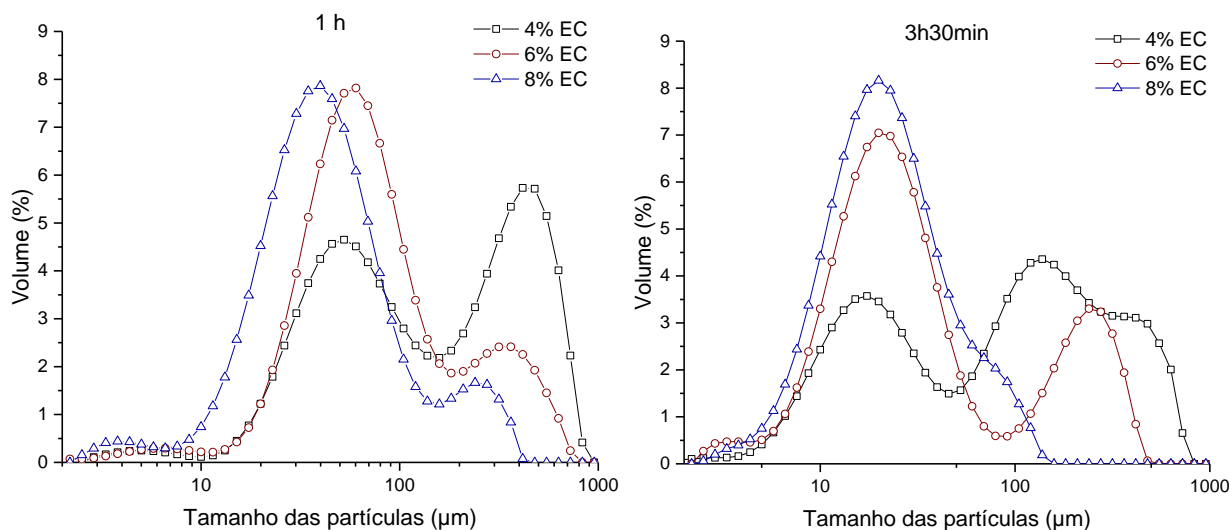


Figura 27 - Distribuição de tamanhos das gotas/partículas dos testes com 4% (teste base), 6% (teste EC +) e 8% (teste EC ++) de EC na fase dispersa, após 1 h e 3h30min de emulsificação.

A Figura 28 apresenta imagens obtidas em microscópio ótico dos testes após 1h45min de emulsificação. O teste EC ++ (8% EC) é o que apresenta uma maior quantidade de gotas ainda por solidificarem. Esta tendência é razoável pois gotas mais viscosas precisam de mais tempo para serem quebradas, terem o seu solvente extraído para a fase contínua e solidificarem. Neste âmbito, o teste base (4% EC) é o que apresenta uma maior velocidade de solidificação das partículas, sendo o teste em que se observa mais partículas já solidificadas neste instante da emulsificação.

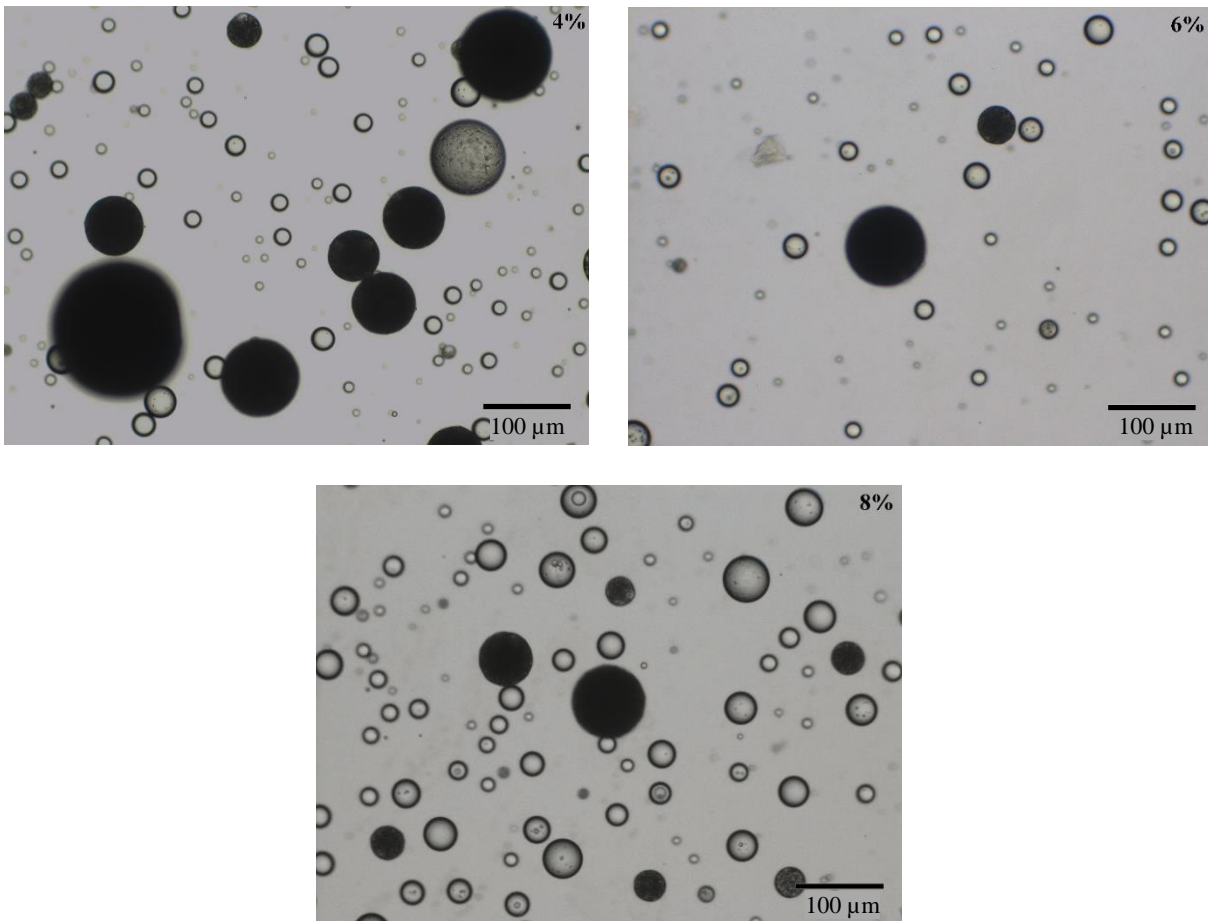


Figura 28 - Imagens obtidas em microscópio ótico dos testes com 4% (teste base), 6% (teste EC +) e 8% (teste EC ++) de EC na fase dispersa, após 1h45min de emulsificação. Ampliação de 100x.

Os testes base (4% EC), EC + (6% EC) e EC ++ (8% EC) apresentaram, respetivamente, um rendimento global de 12,6, 3 e 2,7%. A produção de partículas diminuiu com o aumento da viscosidade da fase dispersa, e esta redução pode ser justificada pelas seguintes hipóteses: (i) a hidrodinâmica do LDS pode não favorecer a formação de partículas a partir de gotas mais viscosas, devido ao sistema de agitação/sucção acoplado ao LDS; (ii) emulsões com uma fase dispersa mais viscosa precisam de mais tempo para terem suas gotas estabilizadas na fase I da monitorização, e por isso, os rendimentos globais destes testes podem ser menores; (iii) a EC

possui grande tendência em aderir aos equipamentos durante a emulsificação e, uma fase dispersa mais concentrada com EC pode acentuar esta característica, fazendo com que mais EC fique aderida aos equipamentos e reduzindo a quantidade de partículas produzidas.

Com base na Figura 29, verifica-se que as partículas produzidas pelo teste base (4% EC) são esféricas, possuem ligeiras deformações e uma tendência para agregação durante a secagem. As partículas dos testes EC + (6% EC) e EC ++ (8% EC) apresentam elevadas deformações, com um grupo de pequenas partículas esféricas agregadas às partículas má formadas. Estas deformações podem ter agravado a tendência a agregação durante a secagem, o que também explicaria os resultados apresentados na Tabela 7, em que se verifica que ao contrário do teste base, que teve suas partículas desagregadas após a aplicação de ultrassons, os testes EC + e EC ++ praticamente não sofreram alterações, indicando que as agregações entre partículas má formadas possam ser mais resistentes a influência dos ultrassons. Desta forma, os tamanhos das partículas produzidas nos testes EC + e EC ++ (que possuem resultados próximos entre si), sem e após ultrassons, apresentam partículas maiores em comparação às do teste base.

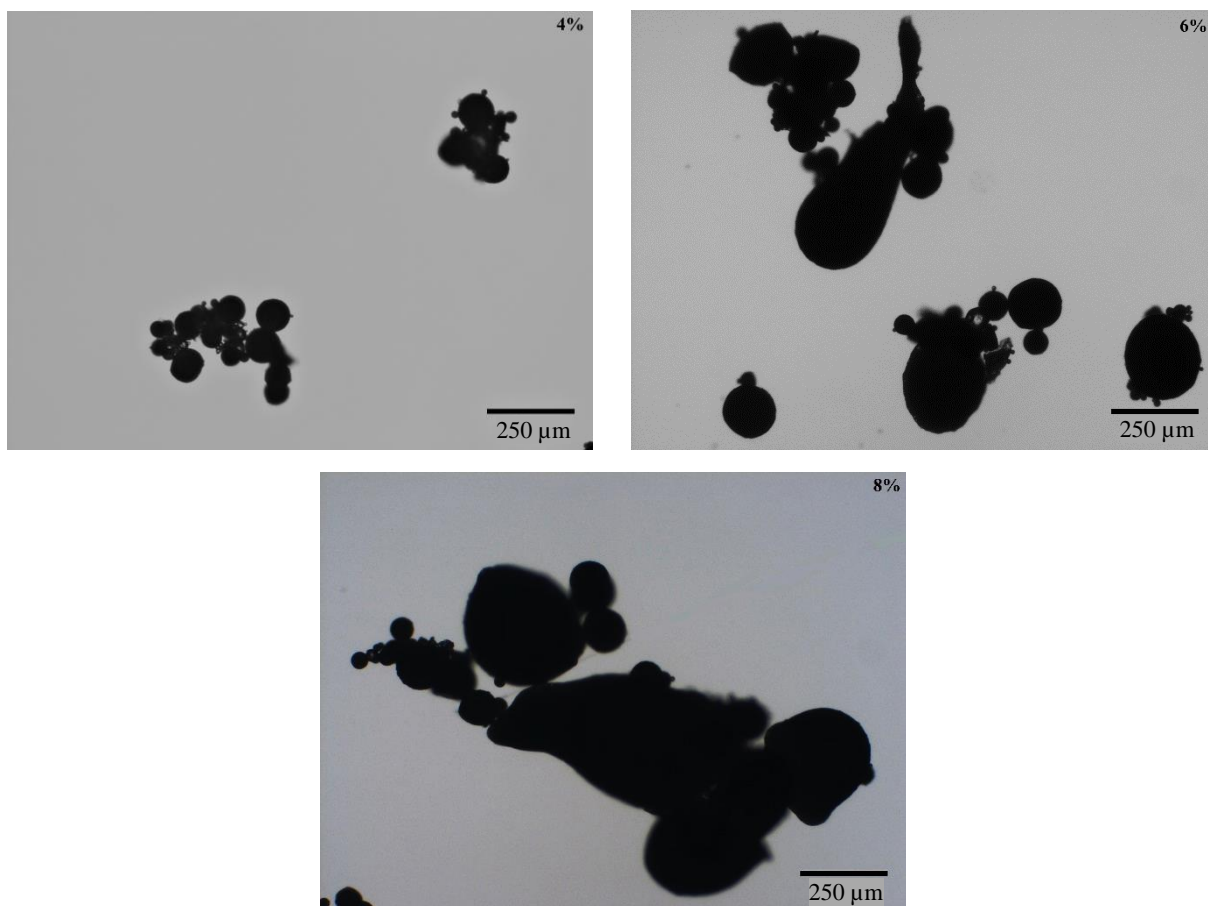


Figura 29 - Imagens obtidas em microscópio ótico das partículas produzidas nos testes com 4% (teste base), 6% (teste EC +) e 8% (teste EC ++) de EC na fase dispersa. Ampliação de 40x.

Ao comparar as curvas de distribuição de tamanhos ao longo da emulsificação (Figura 27) e os resultados dos tamanhos das partículas produzidas (Tabela 7), verifica-se que às 3h30min de emulsificação, as curvas de distribuição de tamanhos das gotas/partículas do teste EC ++ (8% EC) apresentavam tamanhos que não ultrapassavam os 140 μm , enquanto que obteve como diâmetro d(90) das partículas produzidas um valor de 563 μm (após ultrassons), ou seja, verifica-se uma tendência de tamanhos significativamente diferente, e esta observação pode ser um indicativo de que o processo de secagem exerce forte influência sobre a tendência a agregação das partículas, principalmente quando estão má formadas.

Tabela 7 - Tamanhos das partículas produzidas nos testes com 4% (teste base), 6% (teste EC +) e 8% (teste EC ++) de EC na fase dispersa.

EC (%)	Tamanhos sem ultrassons (μm)			Tamanhos após ultrassons (μm)		
	d(10)	d(50)	d(90)	d(10)	d(50)	d(90)
4	69	298	508	48	247	417
6	79	345	580	76	355	564
8	290	400	585	80	357	563

Verifica-se nestes resultados que o aumento da concentração de EC fase dispersa de 6% para 8% praticamente não exerceu influência sobre o rendimento global e sobre os tamanhos das partículas produzidas. A influência da viscosidade da fase dispersa foi mais significativa ao comparar-se os resultados do teste base (4% EC) com o teste EC + (6% EC), em que se verifica uma redução significativa do rendimento global e um aumento do tamanhos das partículas finais quando a quantidade de EC aumenta.

4.2.5. Influência da concentração de surfactante

A influência da concentração de surfactante foi avaliada através de emulsões com concentrações de 0,1% (teste tween -), 0,3% (teste base) e 0,5% (teste tween +) de Tween 80. A Figura 30 apresenta a distribuição de tamanhos das gotas/partículas após 1 h, 1h50min (emulsão atinge 35°C) e 3h30min de emulsificação (fim da emulsificação).

Verifica-se que após 1 h de emulsificação todas as curvas são bimodais, sendo a curva do teste tween + (0,5% Tween 80) a que se apresenta mais deslocada para a direita do gráfico indicando a presença de gotas/partículas maiores. Às 1h50min de emulsificação, as curvas de todos os testes começam a deslocarem-se para a esquerda do gráfico devido ao início da

solidificação de parte das partículas. Neste instante o teste tween + apresenta uma curva de distribuição de tamanhos mais alargada (entre aproximadamente 2 e 2000 μm) e com três picos, enquanto que os testes tween – (0,1% Tween 80) e base (0,3% Tween 80) apresentam tamanhos de gotas/partículas que não ultrapassam os 800 μm .

No fim da emulsificação verifica-se que todos os testes apresentam curvas de distribuição de tamanhos bimodais. A distribuição de tamanhos do teste tween + apresenta uma estreitamento em comparação com a curva das 1h50min de emulsificação, apresentando tamanhos de gotas/partículas entre aproximadamente 5 e 300 μm . Os testes tween – e base apresentam a mesma tendência de tamanhos que às 1h50min de emulsificação, com gotas/partículas que não ultrapassam os 800 μm . Estes resultados podem ser um indicativo de que a tendência para a agregação das partículas pode ser reduzida com o aumento da concentração de surfactante na emulsão.

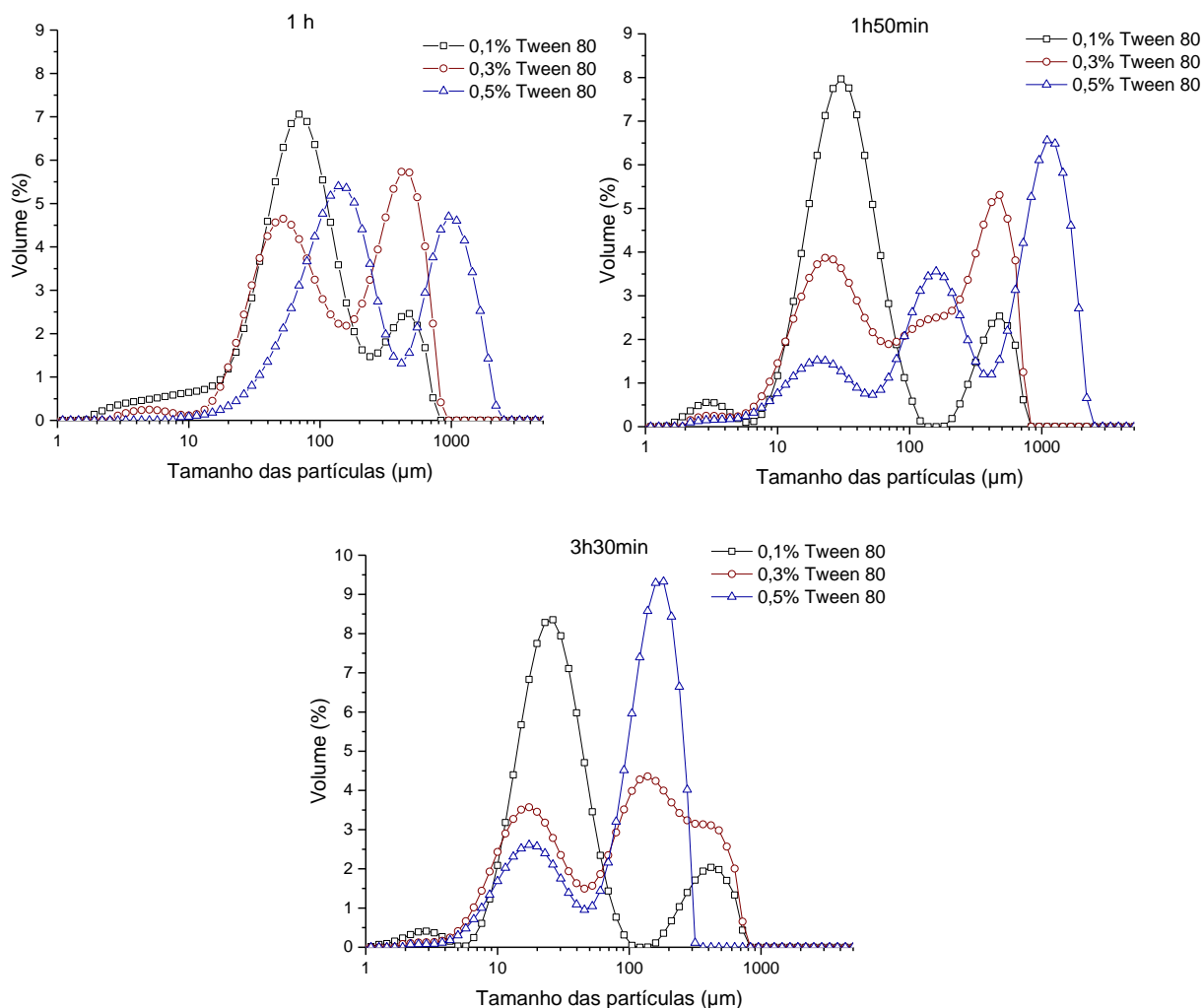


Figura 30 - Distribuição de tamanhos das gotas/partículas dos testes tween – (0,1% Tween 80), base (0,3% Tween 80) e tween + (0,5% Tween 80), após 1 h, 1h50min e 3h30min de emulsificação.

As Figuras 31 e 32 apresentam as imagens obtidas em microscópio ótico após 2 h e 3 h de emulsificação dos testes tween – (0,1% Tween 80), base (0,3% Tween 80) e tween + (0,5% Tween 80). Ao comparar os testes da Figura 31, verifica-se a presença de mais partículas solidificadas a medida que a concentração de surfactante aumenta. Este aumento da quantidade de partículas sólidas pode estar relacionado com a redução da tensão interfacial na solução, facilitando a quebra e solidificação das partículas. Também se verifica esta tendência após 3h de emulsificação (Figura 32), indicando que um aumento da concentração de surfactante poderá reduzir o tempo de solidificação das partículas.

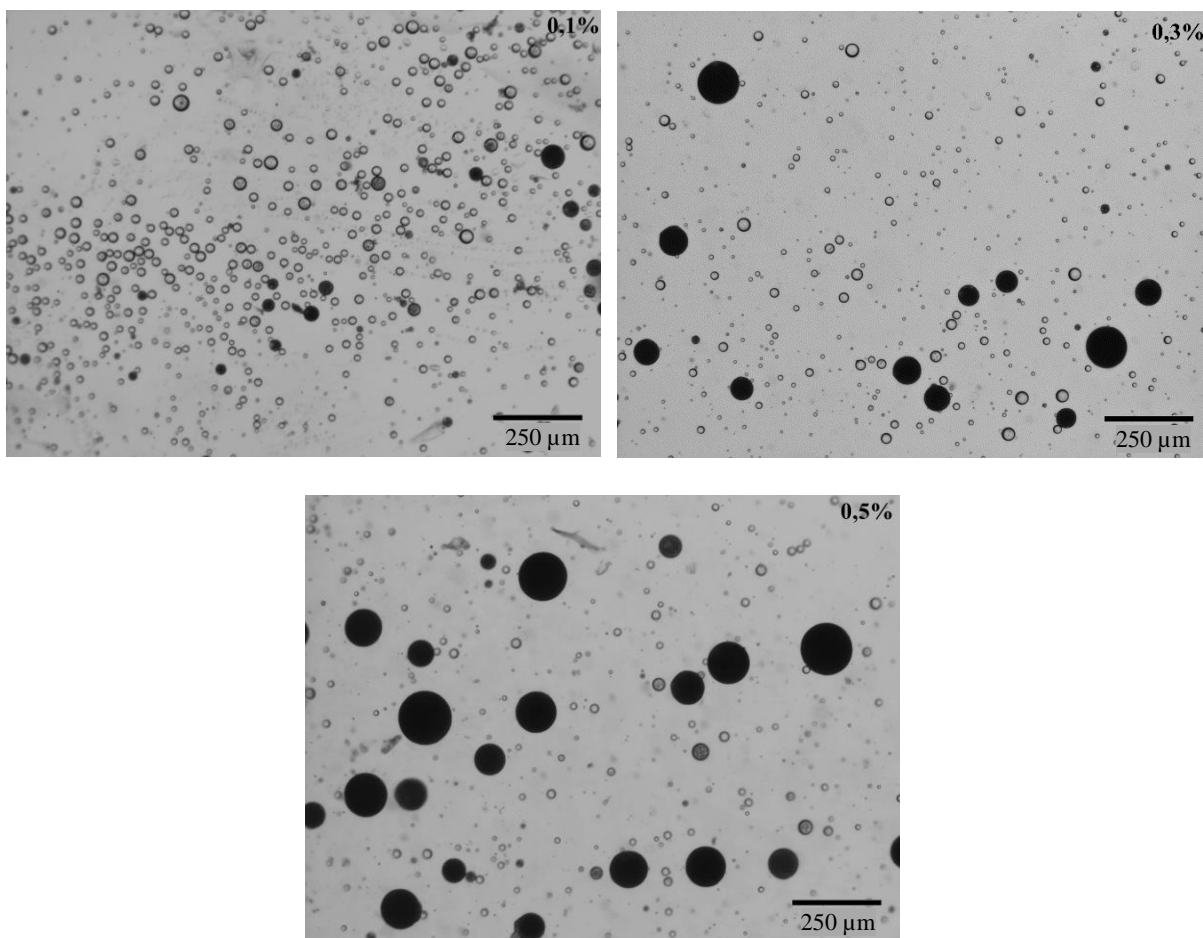


Figura 31 - Imagens obtidas em microscópio ótico dos testes tween – (0,1% Tween 80), base (0,3% Tween 80) e tween + (0,5% Tween 80), após 2h de emulsificação. Ampliação de 40x.

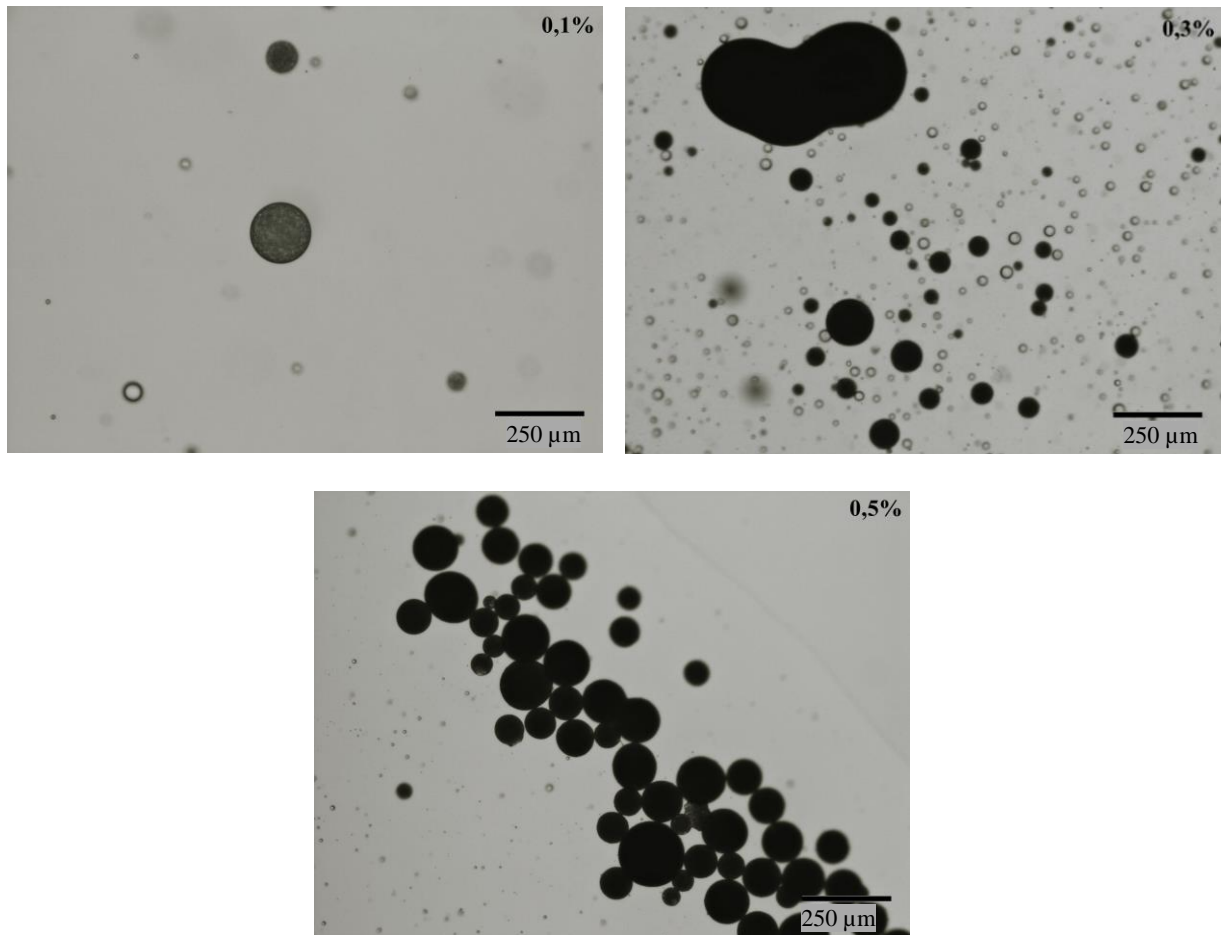


Figura 32 - Imagens obtidas em microscópio ótico dos testes tween – (0,1% Tween 80), base (0,3% Tween 80) e tween + (0,5% Tween 80), após 3 h de emulsificação. Ampliação de 40x.

Os testes tween – (0,1% Tween 80), base (0,3% Tween 80) e tween + (0,5% Tween 80) apresentaram, respetivamente, um rendimento global de 0,9, 12,6 e 30%. O aumento de surfactante pode ter auxiliado na estabilidade da emulsão, principalmente nos momentos iniciais da aquisição em LDS, em que a transição da fase I para a fase II pode causar grande instabilidade. Este aumento de surfactante também pode ter sido importante na redução na tendência a aglomeração das gotas no LDS.

A Figura 33 apresenta imagens do microscópio ótico das partículas produzidas nos testes tween –, base e tween + e verifica-se que as partículas de todos os testes apresentam uma tendência a agregação após a secagem. As partículas dos testes tween – e base apresentam algumas deformações que podem favorecer a agregação, enquanto que as partículas do teste tween + apresentam formas mais esféricas, com menos deformações e com uma distribuição de tamanhos mais alargada, apresentando partículas mais pequenas devido à maior concentração de surfactante.

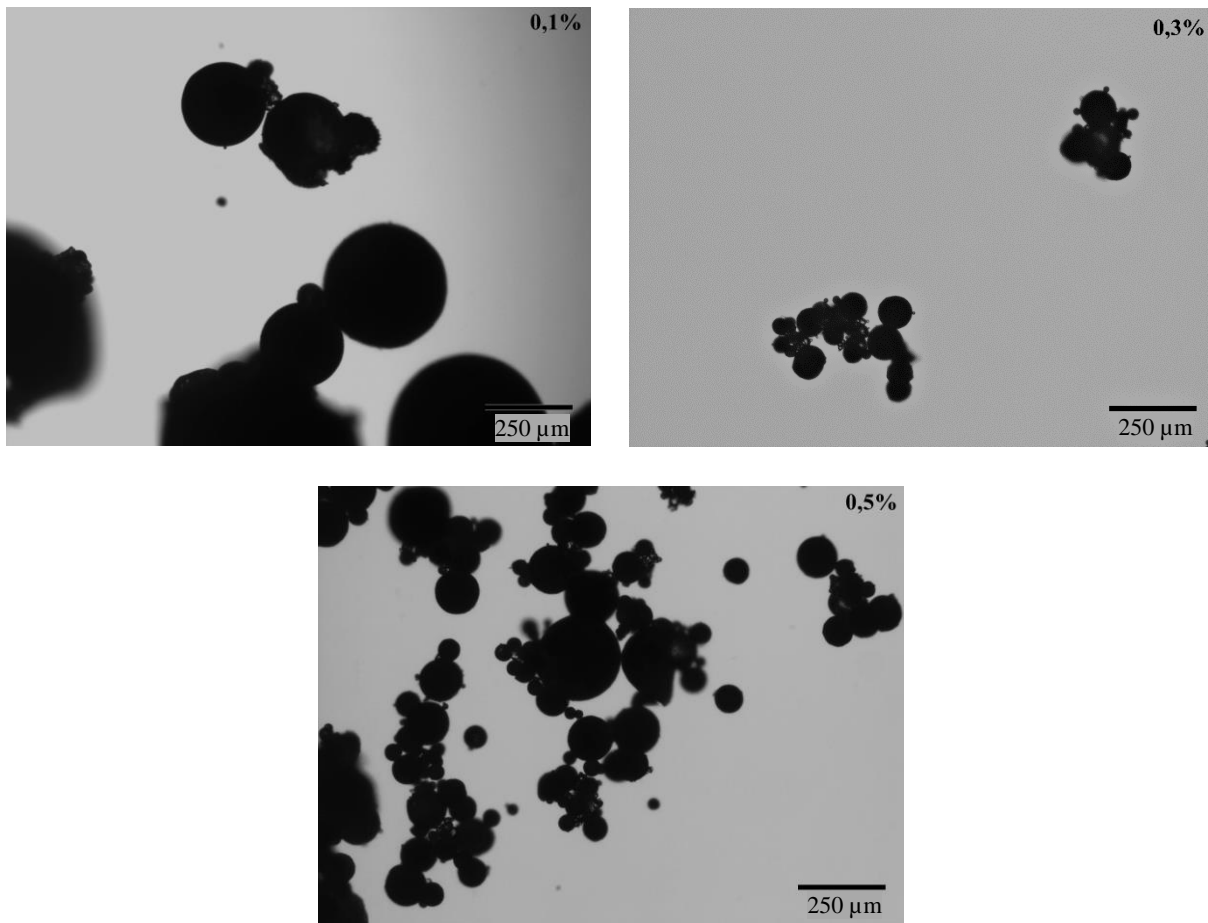


Figura 33 - Imagens obtidas em microscópio ótico das partículas produzidas nos testes tween – (0,1% Tween 80), base (0,3% Tween 80) e tween + (0,5% Tween 80). Ampliação de 40x.

Os tamanhos das partículas produzidas nos testes base (0,3% Tween 80) e tween + (0,5% Tween 80) são apresentados na Tabela 8. É possível verificar a desagregação das partículas, com uma redução significativa dos diâmetros principalmente no teste tween + que no diâmetro $d(50)$, por exemplo, passa de 309 para 180 µm após ultrassons. Ao comparar os valores dos diâmetros $d(90)$ entre os testes (após ultrassons), constata-se que as partículas produzidas no teste tween + possuem diâmetros inferiores as do teste base.

As partículas produzidas no teste tween – (0,1% Tween 80) não tiveram a sua distribuição de tamanhos avaliada devido ao rendimento global abaixo de 1% (ver secção 4.2.1.).

Tabela 8 - Tamanhos das partículas produzidas nos testes base (0,3% Tween 80) e tween + (0,5% Tween 80).

Tween 80 (%)	Tamanhos sem ultrassons (μm)			Tamanhos após ultrassons (μm)		
	d(10)	d(50)	d(90)	d(10)	d(50)	d(90)
0,3	69	298	508	48	247	417
0,5	139	309	604	87	180	374

As distribuições de tamanhos das partículas produzidas nos testes base (0,3% Tween 80) e tween + (0,5% Tween 80) (Figura 34) confirmam que a aplicação de ultrassons desagregou as partículas de ambos os testes. No teste base, a distribuição de tamanhos de partículas é bimodal, com duas classes de tamanhos estreitas e, após ultrassons, o 1º pico (com partículas entre aproximadamente 30 e 130 μm) aumenta e o 2º pico sofre um estreitamento. No caso do teste tween +, a distribuição de tamanhos das partículas é constituída por uma única classe de tamanhos que se desloca da direita para a esquerda do gráfico após a aplicação de ultrassons, indicando a redução da distribuição de tamanhos das partículas.

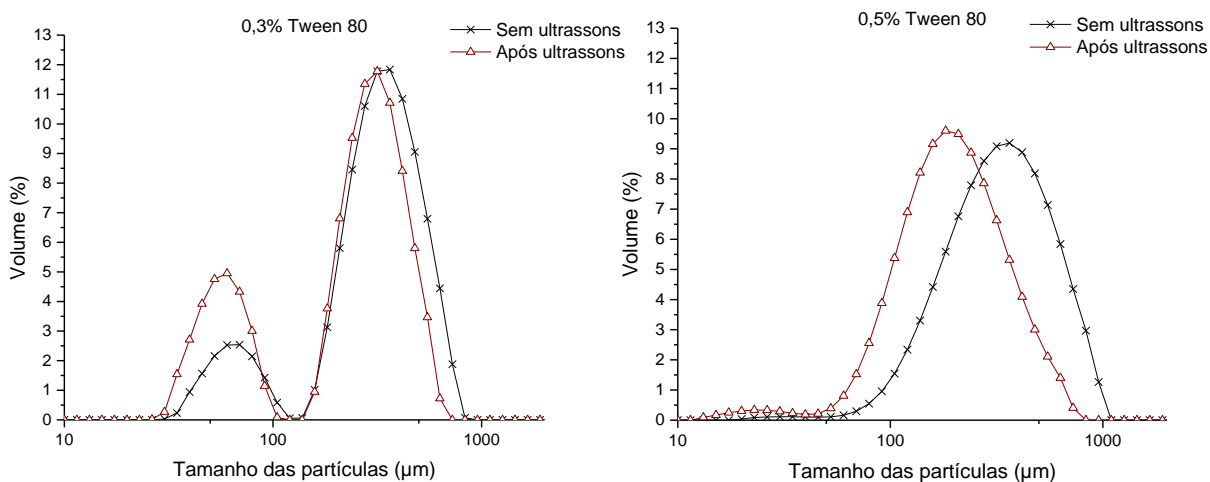


Figura 34 - Distribuição de tamanhos das partículas produzidas nos testes base (0,3% Tween 80) e tween + (0,5% Tween 80).

4.2.6. Influência da velocidade de agitação

A influência da velocidade de agitação foi avaliada através da monitorização *online* da formação de partículas formuladas com uma fase dispersa concentrada com 4 e 6% de etilcelulose (EC). Os resultados são apresentados a seguir.

Concentração de 4% de etilcelulose na fase dispersa

A Figura 35 apresenta as distribuições de tamanhos das gotas/partículas fabricadas com velocidades de agitação em LDS de 1300 rpm (teste rpm -), 1500 rpm (teste base) e 1900 rpm (teste rpm +), após 58 min, 1h50min (emulsão atinge 35°C) e 3h30min de emulsificação (fim da emulsificação).

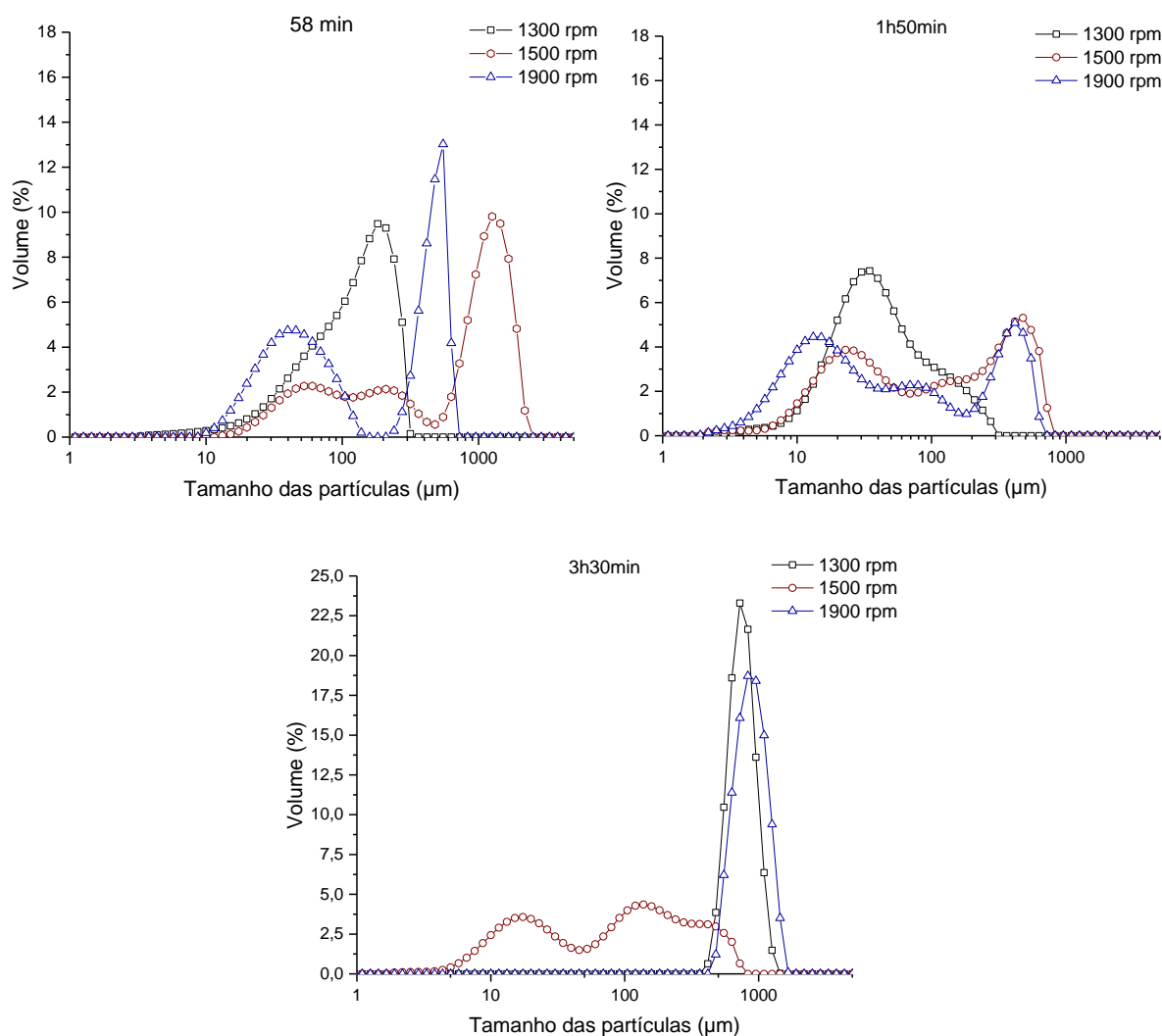


Figura 35 - Distribuição de tamanhos das gotas/partículas dos testes rpm - (1300 rpm), base (1500 rpm) e rpm + (1900 rpm), após 58 min, 1h50min e 3h30min de emulsificação.

Pela Figura 35, verifica-se que após 58 min de emulsificação, os testes base e rpm + apresentam curvas com um 2º pico mais deslocado para a direita do gráfico, indicando uma possível instabilidade ou presença de bolhas na janela de aquisição. O contrário se verifica no teste rpm -, que apresenta uma curva unimodal, mais deslocada para a esquerda do gráfico e com partículas que não ultrapassam, aproximadamente, os 500 μm . Após 1h50min de

emulsificação, todos os testes apresentam uma redução dos tamanhos das gotas/partículas, indicando o início da solidificação, sendo o teste rpm + o que apresenta uma distribuição mais alargada, com tamanhos de partículas que vão desde aproximadamente 5 a 800 μm . Por fim, após 3h30min de emulsificação, os testes rpm – e rpm + são os que apresentam uma maior tendência agregação das partículas já solidificadas, enquanto que o teste base apresenta uma curva bimodal e alargada, com partículas que vão desde aproximadamente 5 a 800 μm .

De modo a avaliar o efeito da velocidade de agitação do LDS sobre a evolução do tamanho das gotas/partículas ao longo da emulsificação, representou-se a evolução dos diâmetros $d(10)$, $d(50)$ e $d(90)$ em função do tempo na Figura 36. Ao analisar a representação de $d(10)$ ao longo do tempo, verifica-se uma tendência à agregação das partículas no teste rpm – (1300 rpm) após aproximadamente 110 min de emulsificação (altura em que a emulsão atinge os 35°C) e, no teste rpm + (1900 rpm), esta tendência a agregação surge por volta dos 150 min de emulsificação. Pela ampliação do início da representação de $d(10)$, nota-se que até os 110 min, os diâmetros adquiridos nos testes rpm – e base (1500 rpm) são aproximadamente iguais e o teste rpm + apresenta diâmetros sutilmente menores.

Nas representações de $d(50)$ e $d(90)$, os testes rpm – e rpm + apresentam menores partículas que o teste base até o instante em que as agregações são verificadas, respetivamente, 110 e 150 min de emulsificação. Nas representações não são apresentados os primeiros 15 min de emulsificação do teste base (secção 4.2.2.).

Os testes rpm – (1300 rpm), base (1500 rpm) e rpm + (1900 rpm) apresentaram, respetivamente, um rendimento global de 4,8, 12,6 e 2,6%. Estes baixos rendimentos globais dos testes rpm – e rpm + podem ser justificados pela maior tendência a agregação das partículas durante a monitorização e também pela agregação que ocorre durante a secagem, fazendo com que parte das partículas agregadas com mais de 600 μm fiquem retidas na malha da peneira.

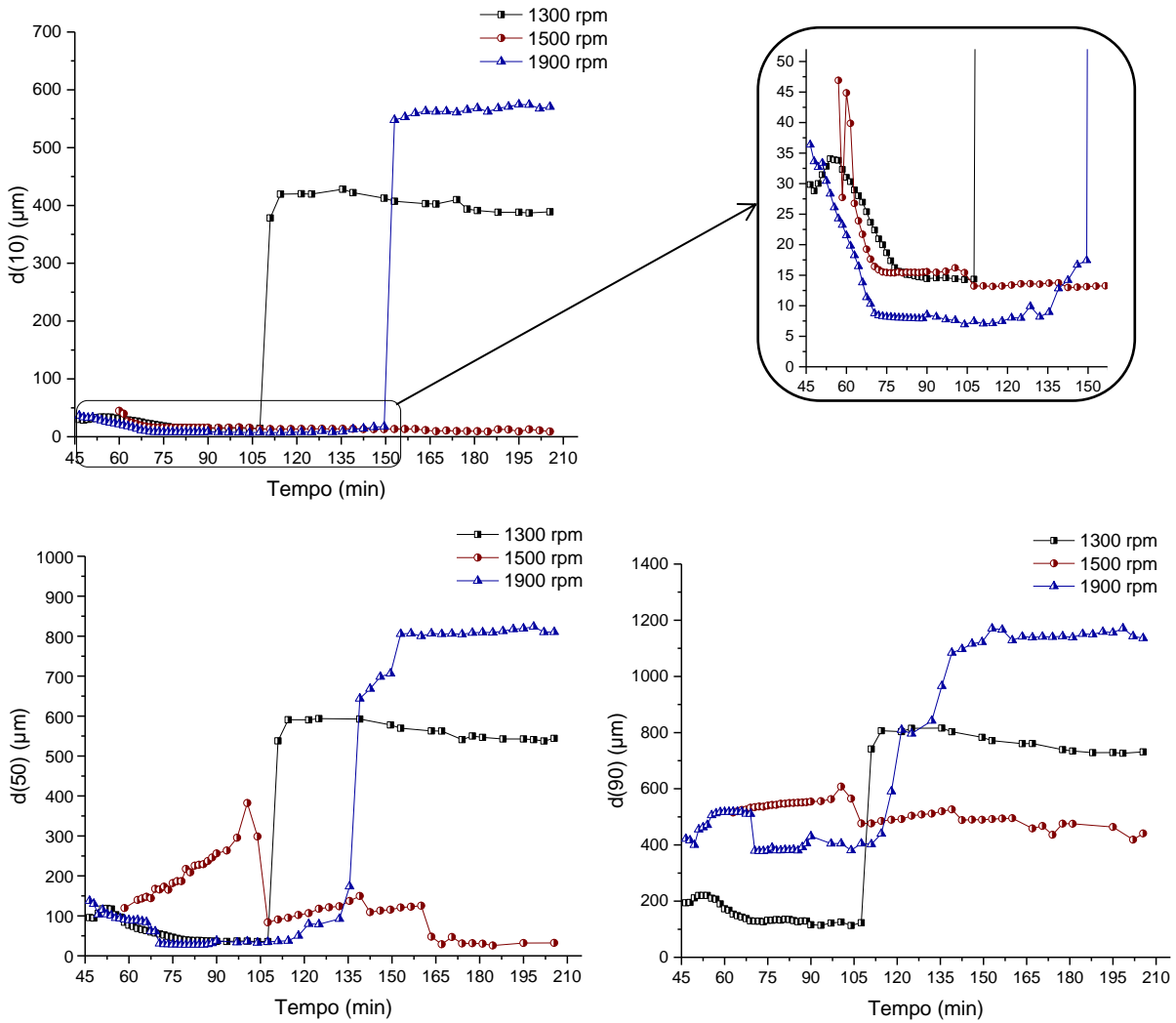


Figura 36 - Evolução dos diâmetros $d(10)$, $d(50)$ e $d(90)$ ao longo da emulsificação dos testes rpm – (1300 rpm), base (1500 rpm) e rpm + (1900 rpm).

A Tabela 9 apresenta os tamanhos das partículas dos testes base (1500 rpm) e rpm + (1900 rpm) sem e após ultrassons, e verifica-se que as partículas produzidas no teste rpm + apresentam valores de $d(50)$ e $d(90)$ menores que as do teste base. Estes resultados indicam que uma velocidade de agitação em LDS mais alta reduz o tamanho das partículas. Verifica-se também que a aplicação de ultrassons auxiliou na desagregação das partículas de ambos os testes.

Os tamanhos das partículas produzidas no teste rpm – (1300 rpm) indicam valores duvidosos após a aplicação de ultrassons, apresentando diâmetros percentis acima dos 1000 μm . Trata-se de um aumento súbito quando comparado com os tamanhos sem ultrassons, embora por vezes, em partículas com tendência para aglomerar, os ultrassons passam a ter um efeito contraproducente. Por isso, não foi possível realizar uma comparação fiável entre os tamanhos das partículas de todos os testes.

Tabela 9 - Tamanhos das partículas produzidas nos testes rpm – (1300 rpm), base (1500 rpm) e rpm + (1900 rpm).

Velocidade de agitação (rpm)	Tamanhos sem ultrassons (μm)			Tamanhos após ultrassons (μm)		
	d(10)	d(50)	d(90)	d(10)	d(50)	d(90)
1300	43	201	355	1079	1381	1694
1500	69	298	508	48	247	417
1900	79	139	310	68	107	200

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que a velocidade de agitação do LDS, mesmo após a agitação mecânica comum a todos os testes (fase I), pode provocar resultados significativamente diferentes entre os testes. Em comparação com o teste base (1500 rpm), tanto uma velocidade mais baixa (1300 rpm), quanto uma velocidade mais alta (1900 rpm) reduziram significativamente o rendimento global dos respetivos testes, indicando que possa existir uma velocidade de agitação ótima para emulsificações em LDS, e que esta velocidade ótima estaria mais próxima dos 1500 rpm.

Concentração de 6% de etilcelulose na fase dispersa

A Figura 37 apresenta as distribuições de tamanhos das gotas/partículas fabricadas com velocidade de agitação em LDS de 1300 rpm (teste EC + / rpm -), 1500 rpm (teste EC +) e 1900 rpm (teste EC + / rpm +), após 1 h, 1h50min (emulsão atinge 35°C) e 3h30min de emulsificação (fim da emulsificação).

Verifica-se que após 1 h de emulsificação, os testes com velocidades de agitação de 1300 rpm (EC + / rpm -) e 1900 rpm (EC + / rpm -) apresentam um 1º pico (mais a esquerda do gráfico) na curva de distribuição de tamanhos com partículas que não ultrapassam 1 μm , indicando a formação de partículas satélites que ao longo da emulsificação surgem pela ação do surfactante, desaparecendo posteriormente. Após 1h50min de emulsificação, as curvas de todos os testes são bimodais, como no caso anterior e apresentam formas semelhantes estando mais deslocadas para a esquerda do gráfico consoante o aumento da velocidade de agitação dos testes, com distribuições de tamanhos entre aproximadamente 0,5 e 500 μm (1300 rpm), 2 e 500 μm (1500 rpm) e 2 e 200 μm (1900 rpm). Por fim, nas distribuições de tamanhos das gotas/partículas ao fim da emulsificação (3h30min), as curvas bimodais dos testes apresentam um estreitamento, com distribuições de tamanhos entre aproximadamente 10 e 400 μm (1300

rpm), 3 e 400 μm (1500 rpm) e 2 e 140 μm (1900 rpm), indicando uma redução do tamanho das partículas devido a solidificação.

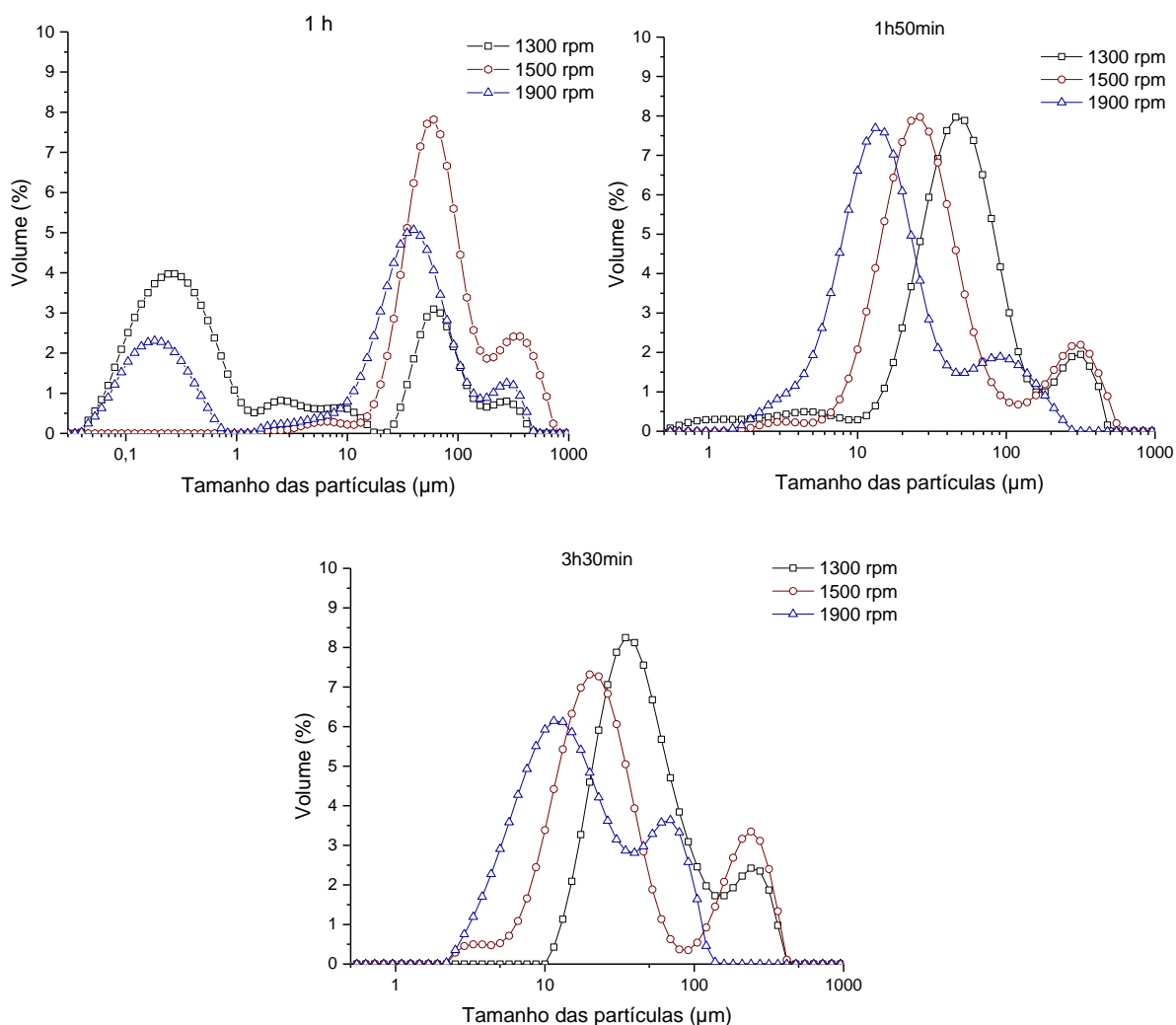


Figura 37 - Distribuição de tamanhos das gotas/partículas nos testes com velocidade de agitação em LDS de 1300 rpm (teste EC + / rpm -), 1500 rpm (teste EC +) e 1900 rpm (teste EC + / rpm +), após 1 h, 1h50min e 3h30min de emulsificação.

De modo a avaliar o efeito da velocidade de agitação sob a evolução do tamanho das gotas/partículas ao longo da emulsificação, representou-se a evolução dos diâmetros $d(10)$, $d(50)$ e $d(90)$ em função do tempo (Figura 38). Nas representações do teste com velocidade de agitação de 1300 rpm (EC + / rpm -), os resultados indicam que o sistema de sucção levou algum tempo para levar a emulsão do copo a janela de aquisição do LDS, apresentando valores próximos de 0 μm nos primeiros 75, 60 e 55 min de emulsificação das representações de $d(10)$, $d(50)$ e $d(90)$, respetivamente. Após este primeiro momento de instabilidade, assinalado com

um círculo nos gráficos, o teste passa então a apresentar diâmetros $d(10)$, $d(50)$ e $d(90)$ que não ultrapassam aproximadamente 20, 45 e 175 μm , respetivamente.

No teste com velocidade de agitação de 1500 rpm (EC +), também se verifica uma instabilidade inicial, provocada provavelmente pela transferência da agitação mecânica para o LDS, e caracterizada pela presença de gotas/partículas com elevados tamanhos que se reduzem até alcançarem valores aproximadamente constantes a partir dos 75 min de emulsificação. Após estes 30 min de instabilidade na aquisição, os diâmetros $d(10)$, $d(50)$ e $d(90)$ passam a apresentar valores que não ultrapassam aproximadamente 12, 30 e 225 μm .

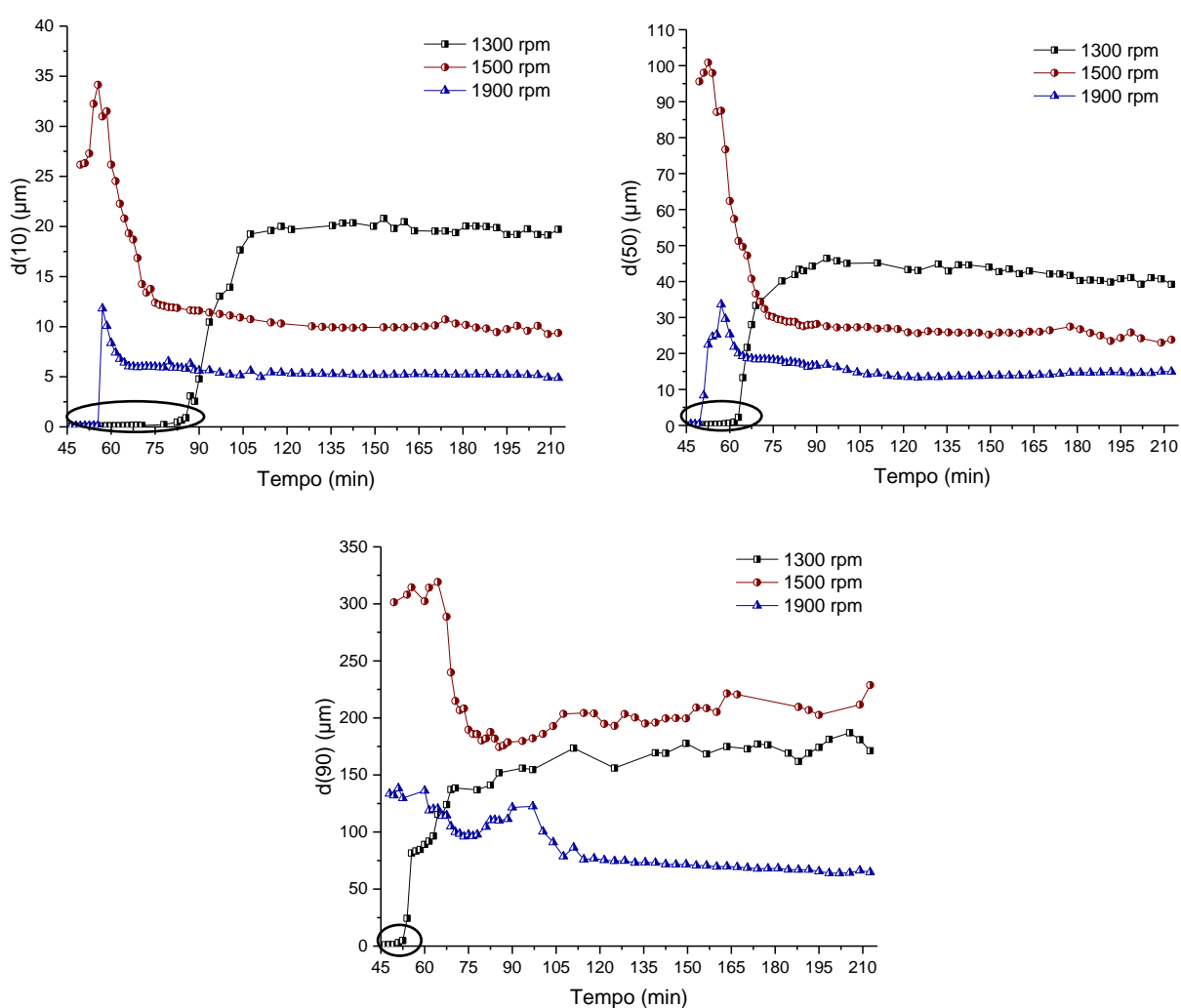


Figura 38 - Evolução dos diâmetros $d(10)$, $d(50)$ e $d(90)$ ao longo da emulsificação dos testes com velocidade de agitação em LDS de 1300 rpm (teste EC + / rpm -), 1500 rpm (teste EC +) e 1900 rpm (teste EC + / rpm +).

Os testes com velocidade de agitação em LDS de 1300 rpm (teste EC + / rpm -), 1500 rpm (teste EC +) e 1900 rpm (teste EC + / rpm +) apresentaram, respetivamente, rendimentos

globais de 0,02, 3 e 0,7%. Diante dos rendimentos abaixo de 1% obtidos nos testes com velocidades de agitação de 1300 e 1900 rpm, não foram avaliadas as distribuições de tamanhos das partículas produzidas.

Os tamanhos das partículas produzidas no teste EC + são apresentados na Tabela 7 e verifica-se que após ultrassons, 90% das partículas possuíam diâmetros inferiores a 583 μm . O desvio entre os resultados do diâmetro $d(90)$ ao longo da emulsificação (aproximadamente 225 μm) e o da partícula produzida (583 μm), pode ser um indicativo de que as partículas produzidas adquiriram elevada tendência a agregação durante o processo de secagem (tal como descrito na secção 4.2.4.).

Ao comparar os resultados obtidos nos testes com fases dispersas concentradas com 4 e 6% de EC na fase dispersa, dentro do estudo da influência da velocidade de agitação, observa-se que o aumento da concentração de EC, proporcionou maior estabilidade ao longo da emulsificação, reduzindo a tendência a agregação das gotas/partículas ao longo da emulsificação, porém, o rendimento global reduziu-se significativamente indicando que a hidrodinâmica do LDS não favorece a emulsificação de gotas mais viscosas. Outra hipótese para esta redução do rendimento global dos testes mais viscosos, pode estar relacionada com a possibilidade da EC adquirir ainda maior tendência a aderir aos equipamentos fazendo com que uma parte ainda maior de EC não se forme como partículas e se transforme em resíduo.

Nos testes com velocidade de agitação de 1300 rpm, excluindo o fenómeno de agregação das gotas/partículas no teste rpm – (4% EC, Figura 36) e a dificuldade inicial na aquisição dos dados no teste EC + / rpm – (6% EC, Figura 38), é possível verificar que os testes apresentaram diâmetros $d(90)$ das gotas/partículas relativamente próximos, 190 μm e 175 μm , respetivamente.

Ao comparar os resultados dos diâmetros $d(90)$ dos testes com velocidade de agitação de 1500 rpm, verifica-se que o aumento da concentração de 4% (teste base, Figura 36) para 6% (teste EC +, Figura 38) de etilcelulose na fase dispersa (excluindo a instabilidade inicial) reduziu os diâmetros das gotas/partículas de valores a volta de 500 μm para 225 μm , respetivamente.

No caso dos testes com velocidades de agitação de 1900 rpm, o aumento da concentração de 4% (teste rpm +, Figura 36) para 6% (teste EC + / rpm +, Figura 38) de etilcelulose na fase dispersa, excluindo o fenómeno de agregação das partículas no teste rpm + e a instabilidade inicial no teste EC + / rpm +, reduziu os diâmetros $d(90)$ de 400 μm para 75 μm , respetivamente.

Os resultados deste estudo podem ser um indicativo de que emulsões com uma fase dispersa mais viscosa, podem reduzir os tamanhos de gotas/partículas ao longo da emulsificação, sendo esta redução mais significativa a medida que a velocidade de agitação aumenta. Neste estudo não foi possível avaliar o efeito da velocidade de agitação em conjunto com a concentração de EC sobre as partículas finais, devido ao baixo rendimento global de alguns dos testes.

4.2.7. Influência da concentração de fármaco

A influência da concentração de fármaco foi objeto de estudo através de formulações com concentrações de 1,5% (teste IB -), 3% (teste IB) e 4,5% (teste IB +) de ibuprofeno (IB) na fase dispersa. A Figura 39 apresenta a distribuição de tamanhos das gotas/partículas após 1 h e 3h30min de emulsificação (fim da emulsificação). Verifica-se a concentração de IB praticamente não influenciou sobre a distribuição de tamanhos das gotas/partículas em ambos os instantes de emulsificação e, ao fim da emulsificação, verifica-se uma redução do tamanho das gotas/partículas provocada pela sua solidificação.

Pela Figura 40, também se verifica que as diferentes concentrações de IB praticamente não exerce influência sobre os percentis dos diâmetros ($d(10)$, $d(50)$ e $d(90)$) em função do tempo de emulsificação, de modo que, após um momento inicial de instabilidade (devido à transferência do copo de emulsificação da fase I para a fase II) comum a todos os testes, apresentam valores próximos entre si em todas as representações. No caso da representação de $d(10)$, verifica-se no teste IB + (4,5% IB) um momento pontual de instabilidade (aos 140 min de emulsificação), provavelmente devido a alguma falha na aquisição do LDS.

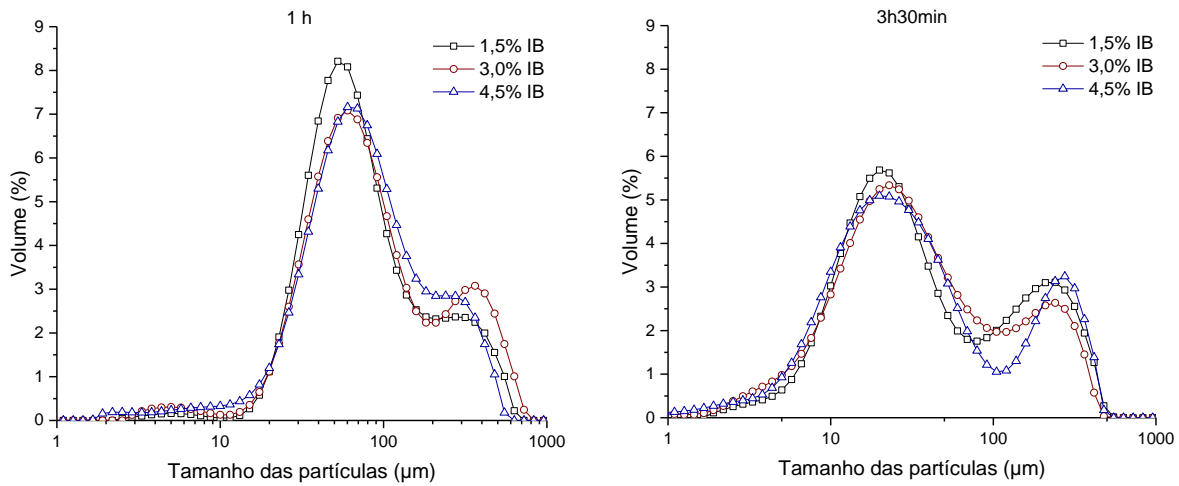


Figura 39 - Distribuição de tamanhos das gotas/partículas dos testes IB – (1,5% IB), IB (3% IB) e IB + (4,5% IB), após 1 h e 3h30min de emulsificação.

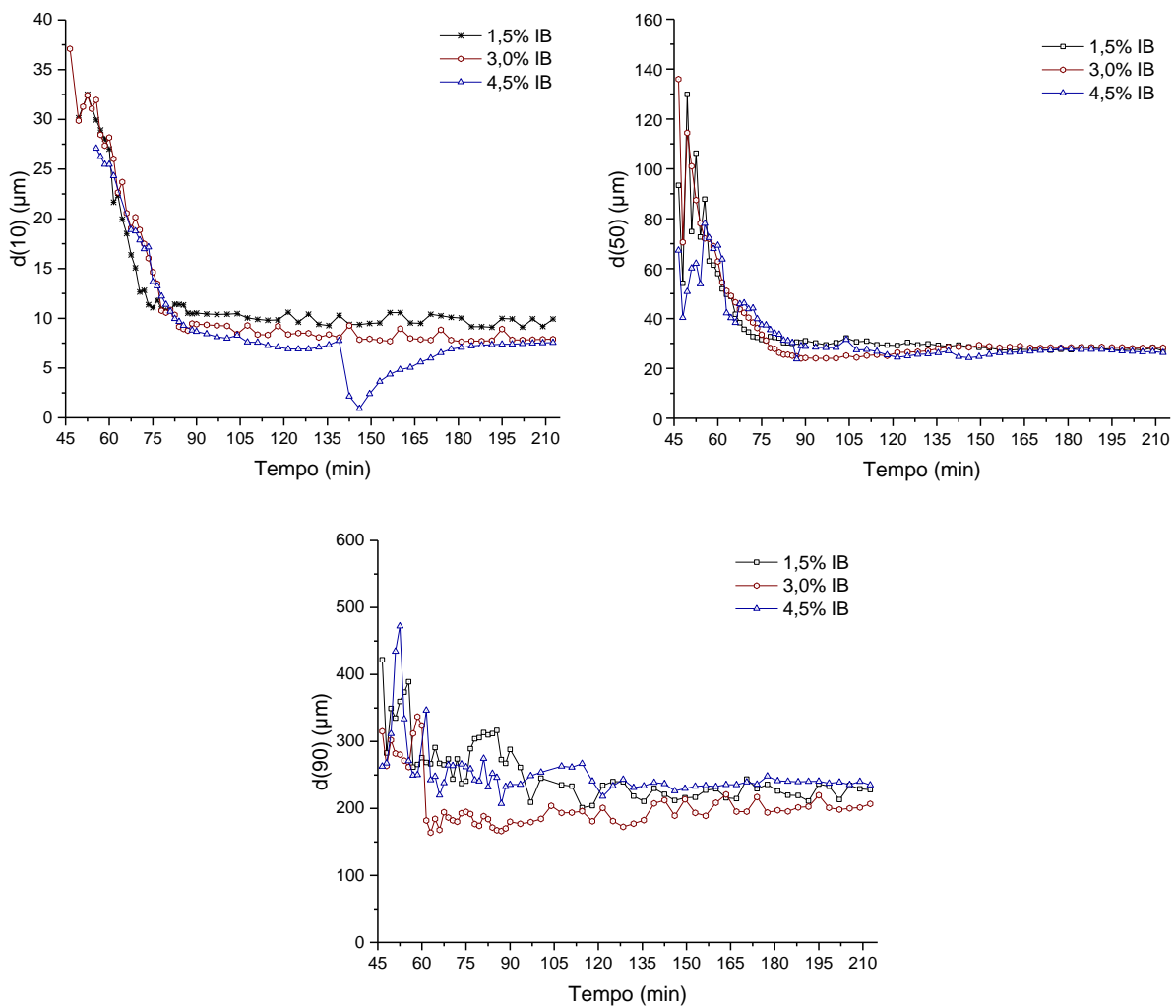


Figura 40 - Evolução dos diâmetros $d(10)$, $d(50)$ e $d(90)$ ao longo da emulsificação dos testes IB – (1,5% IB), IB (3% IB) e IB + (4,5% IB).

A Figura 41 apresenta as imagens obtidas em microscópio após 1h30min de emulsificação dos testes IB – (1,5% IB), IB (3% IB) e IB + (4,5% IB). Verifica-se uma maior quantidade de gotas por solidificar no teste IB +, indicando uma menor velocidade de solidificação neste teste. Esta diferença entre as velocidades de solidificação não é tão evidente ao comparar as imagens do testes IB – e IB.

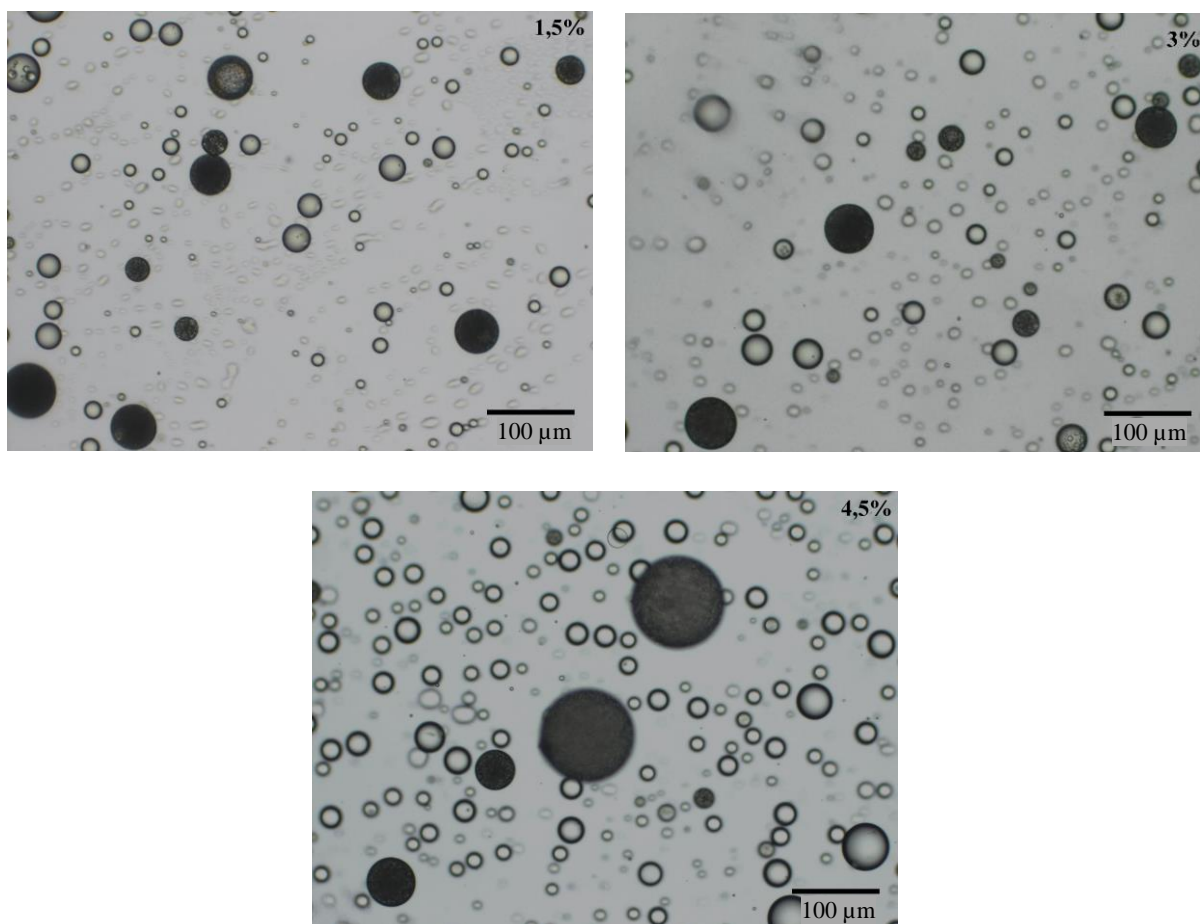


Figura 41 - Imagens obtidas em microscópio ótico dos testes IB – (1,5% IB), IB (3% IB) e IB + (4,5% IB). Ampliação 100x.

Os testes IB – (1,5% IB), IB (3% IB) e IB + (4,5% IB) apresentaram, respetivamente, rendimentos globais de 5,9, 5,1 e 0,57%. Esta redução significativa do rendimento global no teste IB + pode ser justificada por duas hipóteses: (i) o IB pode estar em excesso na formulação, o que provocaria a sua fuga da fase dispersa para a fase contínua; (ii) as partículas deste teste apresentaram elevada deformação (Figura 42), o que pode ter favorecido a uma maior tendência a agregação durante a secagem e com isso, parte das partículas possam ter ficado retidas na peneira com malha de 600 μm.

Ao comparar os resultados destes testes com o teste base adotado neste estudo da influência da concentração de fármaco (teste EC +, com 6% de EC na fase dispersa), verifica-se que a presença de ibuprofeno aumentou o rendimento global de 3% (teste EC+) para 5,9% (teste IB -) e 5,1% (teste IB). Este aumento de rendimento global não se verificou no teste IB + (rendimento global de 0,57%), sendo mais uma confirmação de que a formulação já teria alcançado o seu limite de fármaco na fase dispersa. Ao comparar também as curvas de distribuição de tamanhos entre os testes com ibuprofeno (Figura 39) e o teste EC + (Figura 27), após 3h30min de emulsificação, verifica-se que a presença de ibuprofeno praticamente não exerceu influência sobre as curvas de distribuição de tamanhos das gotas/partículas.

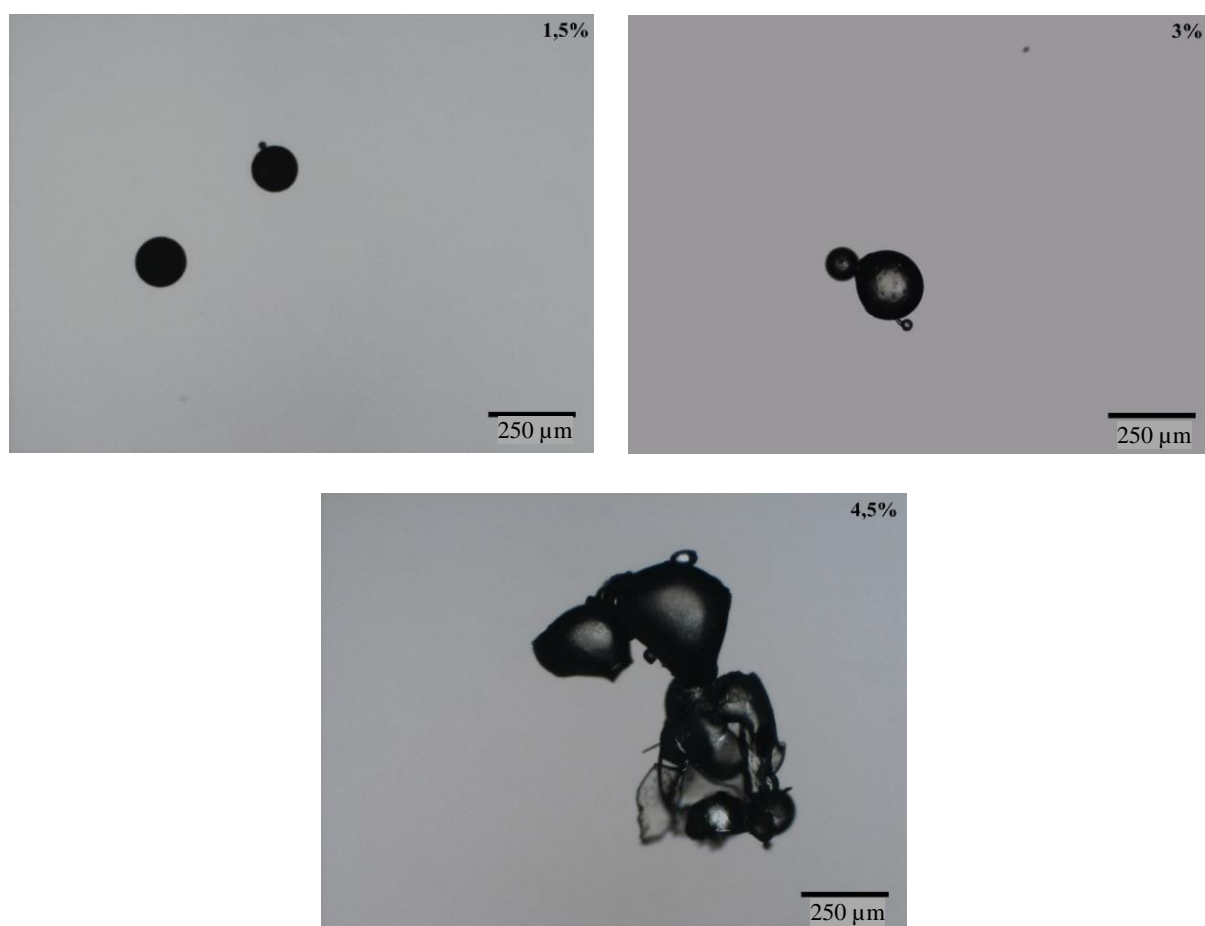


Figura 42 - Imagens obtidas em microscópio ótico das partículas produzidas nos testes IB - (1,5% IB), IB (3% IB) e IB + (4,5% IB). Ampliação de 40x.

As Figuras 43 e 44 apresentam as imagens obtidas em SEM das partículas do teste IB (3% IB) inteiras e cortadas, respetivamente. Pela Figura 43, verifica-se que as partículas são esféricas e com algumas deformações, possuem uma superfície praticamente lisa e estão agregadas.

Não se verifica a presença de IB sobre a superfície destas partículas, tal como se verificou nas PEI do teste *offline* (Figura 16), e através dos cortes nas partículas (Figura 44), não se consegue confirmar a presença de IB em seu interior, o que indica que o IB poderá estar dissolvido no meio da etilcelulose.

Ao comparar as imagens obtidas em SEM das PEI do teste *offline* (Figura 16) com as partículas do teste IB (Figura 43), nota-se que as partículas produzidas em LDS se apresentam mais agregadas e deformadas, apesar do teste IB, que possui uma emulsão mais diluída, apresentar as mesmas proporções entre as matérias-primas que o teste *offline* para produção das PEI.

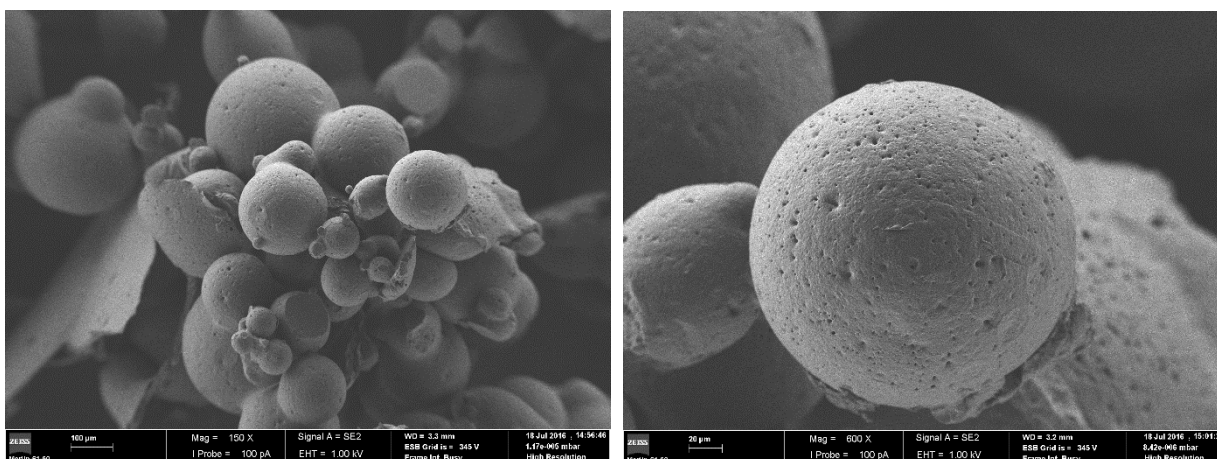


Figura 43 - Imagens obtidas em SEM das partículas do teste IB (3% IB). Ampliação de 150x e escala de 100 µm (imagem a esquerda) e ampliação de 600x e escala de 20 µm (imagem a direita).

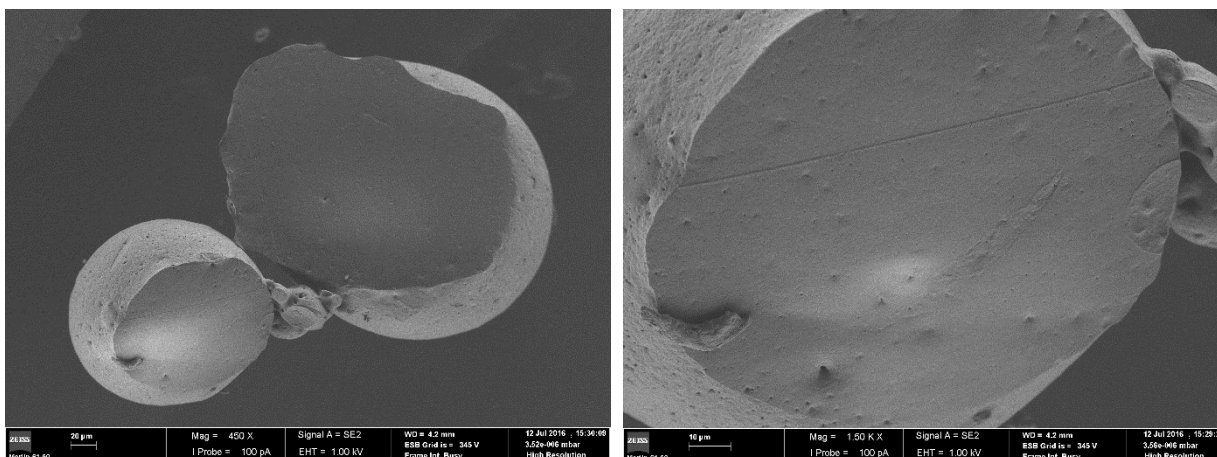


Figura 44 - Imagens obtidas em SEM das partículas do teste IB (3% IB). Ampliação de 450x e escala de 20 µm (imagem a esquerda) e ampliação de 1500x e escala de 10 µm (imagem a direita).

4.2.8. Sumário final

Os resultados destes estudos indicam que é possível avaliar a influência da variação de parâmetros e condições de operação na monitorização *online* da formação das partículas em LDS. O estudo realizado no presente trabalho foi relevante para a visualizar em linha as diferentes fases do processo de emulsificação e para verificar como a variação dos parâmetros ou condições de operação influenciavam ao longo da formação das partículas, na produção final dos testes, morfologia e distribuição de tamanhos das partículas produzidas.

Com exceção do estudo da influência da concentração de fármaco, todos os outros estudos apresentaram distribuições de tamanhos das gotas/partículas ao longo da emulsificação sensíveis às variações dos parâmetros ou condições de operação.

Verificou-se que o rendimento global dos testes tanto aumentou (teste $\phi -$ e tween +) como diminuiu significativamente em comparação com o teste base, indicando que o rendimento global é um resultado muito sensível a variações dos parâmetros e condições de operação e, por isso, um estudo com mais níveis de variações dentro de cada influência seria o mais indicado para avaliar melhor a capacidade de produção de partículas em LDS e com isso obter um rendimento global ótimo.

A morfologia das partículas foi fortemente influenciada pelo aumento da viscosidade da fase dispersa e pelo aumento da concentração de fármaco, deixando as partículas produzidas má formadas e pouco esféricas.

Verificou-se a velocidade de agitação é a condição de operação que mais exerce influência sobre o tamanho das partículas produzidas, reduzindo-as significativamente. Um estudo com mais níveis de velocidades de agitação entre 1300 e 1900 rpm, poderia trazer mais informações com vista a otimização da velocidade de agitação.

Também foi possível avaliar características dos resultados apresentados pelo Mastersizer, nomeadamente, a tendência para a agregação das partículas, a dificuldade de sucção de emulsões mais viscosas com velocidades de agitação mais baixas e a instabilidade inicial das aquisições devido à transferência da agitação mecânica (fase I) para o Mastersizer (fase II). Mesmo com as dificuldades encontradas em relação à hidrodinâmica do Mastersizer, que não é a mais apropriada para emulsificações, o estudo de uma forma global e de maneira exploratória mostrou-se útil na medida que traz a possibilidade de otimizar uma formulação ou condição de operação neste processo de emulsificação/evaporação do solvente.

5. Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

Através do método de emulsificação/evaporação do solvente foi possível obter partículas formuladas e processadas de maneira simples e eficaz. Os resultados dos testes *offline* para a produção das PE (partículas de etilcelulose) indicaram que se tratam de partículas esféricas, com uma superfície lisa, com poucos agregados e uma distribuição de tamanhos estreita. No caso das PEI (partículas de etilcelulose carregadas com ibuprofeno), também se apresentaram esféricas, tendo na sua superfície cristais de ibuprofeno, partículas mais agregadas e uma distribuição de tamanhos mais alargada.

Com base nos cortes realizados às PEI e por meio de alguns cálculos, obteve-se um indicativo de que a relação entre o ibuprofeno no interior e sobre a superfície da partícula era de 2:1, indicando que a maior parte do ibuprofeno na partícula pode estar dissolvido em seu interior. Esta estimativa de IB no interior da partícula, bem como características do processo de produção, fazem concluir que podem se tratar de microesferas.

De modo a viabilizar a monitorização *online* da formação das partículas no Mastersizer, definiu-se uma formulação base (teste base) através de adaptações realizadas sobre a formulação base (PE) dos testes *offline*. A monitorização ao longo do teste apresentou uma instabilidade no início das aquisições, devido à transição da agitação mecânica (fase I) para o LDS (fase II); e ao fim da emulsificação, indicando alguma tendência para a agregação das partículas. As partículas produzidas apresentaram-se esféricas, com algumas deformações, agregadas após a secagem e com uma distribuição de tamanhos bimodal. Os resultados obtidos neste teste foram importantes para a visualização das características dos resultados fornecidos pelo LDS, bem como para a definição de novas formulações para avaliação de diferentes influências na formação das partículas.

Do estudo da influência da fração volumétrica da fase dispersa (ϕ) na formação das partículas, concluiu-se que a variação de ϕ exerce uma influência significativa sobre os seguintes aspetos: (i) formação das partículas, pois verificou-se que ao longo da emulsificação os testes com maiores ϕ apresentavam uma redução da distribuição de tamanhos das gotas/partículas; (ii) velocidade de solidificação, que aumentou com a redução de ϕ nos testes; (iii) rendimentos globais, que aumentaram significativamente com a redução de ϕ . Concluiu-se também que a redução ϕ de 3 para 2% pouco influenciou sobre os tamanhos das partículas

produzidas após serem desagregadas (após ultrassons), e que a fração volumétrica de fase dispersa é um importante parâmetro a ser avaliado, principalmente num equipamento como o LDS, que é sensível a níveis de concentração da fase dispersa na emulsão, e que pode conduzir a resultados menos confiáveis no caso de níveis de obscurações fora dos limites toleráveis (5-50%).

No estudo da influência da viscosidade da fase dispersa, através da variação da concentração de EC na fase dispersa, conclui-se que o aumento da viscosidade da fase dispersa: (i) trouxe uma maior estabilidade à emulsão e uma menor tendência para a agregação das partículas; (ii) deixou a distribuição de tamanhos de gotas/partículas mais estreita; (iii) reduziu a velocidade de solidificação; (iv) reduziu o rendimento global dos testes à medida que as concentrações de EC aumentaram, verificando-se que esta redução foi mais significativa ao comparar os testes com 4 e 6% de EC; (v) deixou as partículas produzidas mais deformadas, agravando também a tendência a agregação durante a secagem; (vi) aumentou os tamanhos das partículas produzidas, apresentando uma diferença mais significativa ao comparar-se o teste base (4% EC) com os testes EC + (6% EC) e EC ++ (8% EC) (que apresentaram tamanhos muito próximos). Por fim, concluiu-se também que a hidrodinâmica do LDS pode não favorecer a formação de partículas a partir de gotas mais viscosas, que emulsões com uma fase dispersa mais viscosa precisam de mais tempo para terem suas gotas estabilizadas na fase I da monitorização e que a EC possui grande tendência em aderir aos equipamentos durante a emulsificação e, uma fase dispersa mais concentrada com EC pode acentuar esta característica, fazendo com que mais EC fique aderida aos equipamentos e reduzindo a quantidade de partículas produzidas.

Para o estudo da influência da concentração de surfactante, chegou-se à conclusão que um aumento da concentração de surfactante: i) reduziu o tamanho das gotas/partículas ao longo da emulsificação e proporcionaram uma distribuição de tamanhos mais estreita, (ii) reduziu o tempo de solidificação; (iii) aumentou o rendimento global dos testes; (iv) foi responsável pela produção de partículas com menos deformações, indicando que um aumento da concentração de surfactante pode melhorar a morfologia das partículas; (v) reduziu o tamanho das partículas finais após a aplicação de ultrassons (ao comparar o teste base (0,3% Tween 80) com o teste tween + (0,5% Tween 80)). Com estes resultados foi possível concluir também que o surfactante exerce um papel de extrema importância seja ao longo da formação das partículas (reduzindo o tamanho das gotas/partículas), como também nas características das partículas finais produzidas (aumentando o rendimento global e reduzindo os tamanhos das partículas produzidas), mesmo em sistemas complexos como o do Mastersizer.

Com o estudo da influência da velocidade de agitação sobre formulação com 4% de EC na fase dispersa, foi possível concluir que a velocidade de agitação do LDS, mesmo após a agitação mecânica comum a todos os testes (fase I), pode provocar resultados significativamente diferentes entre os testes. Os resultados ao longo da emulsificação não foram conclusivos devido a tendência a aglomeração das gotas em LDS dos testes rpm – (1300 rpm) e rpm + (1900 rpm). Em comparação com o teste base (1500 rpm), tanto uma velocidade mais baixa (1300 rpm), quanto uma velocidade mais alta (1900 rpm) reduziram significativamente o rendimento global dos respetivos testes, indicando que possa existir uma velocidade de agitação ótima para a produção de partículas em LDS, e esta velocidade ótima estaria mais próxima dos 1500 rpm. Ao comparar o teste base com o rpm +, concluiu-se que o aumento da velocidade de agitação reduziu significativamente o tamanho das partículas produzidas. Os tamanhos das partículas produzidas no teste rpm –, após a aplicação de ultrassons, são duvidosos e por isso não foi possível realizar uma comparação fiável entre todos os testes.

Com o estudo da influência da velocidade de agitação sobre formulação com 6% de EC na fase dispersa, foi possível concluir que o aumento da velocidade reduz o tamanho das gotas/partículas ao longo da emulsificação. O rendimento global esteve abaixo de 3%, confirmando que a hidrodinâmica do LDS não favorece a formação de partículas formuladas com fases dispersas mais viscosas, mesmo em velocidades de agitação mais baixas (1300 rpm) ou mais altas (1900 rpm) que a velocidade de agitação base (1500 rpm). As partículas produzidas nos testes teste EC + / rpm – (1300 rpm) e teste EC + / rpm + (1900 rpm) não tiveram as suas distribuições de tamanhos avaliadas devido ao rendimento global abaixo de 1%. As partículas finais produzidas no teste EC + apresentaram um diâmetro d(90) (após ultrassons) de 583 µm, e ao comparar este resultado com o diâmetro d(90) das gotas/partículas ao longo da emulsificação (aproximadamente 225 µm), concluiu-se que este desvio pode ser provocado pela tendência a agregação das partículas durante o processo de secagem.

Ao avaliar a influência da viscosidade da fase dispersa em conjunto com a velocidade de agitação, concluiu-se que o aumento da concentração de EC proporcionou maior estabilidade ao longo da emulsificação em todas as velocidades de agitação avaliadas, reduzindo a tendência a agregação das gotas/partículas ao longo da emulsificação, porém, o rendimento global reduziu significativamente indicando que a hidrodinâmica do LDS não favorece a emulsificação de gotas mais viscosas, ou ainda, para uma fase dispersa mais concentrada com EC, a tendência a aderência da EC aos equipamentos pode aumentar, fazendo com que uma parte da EC não dê origem a partículas. Também foi possível concluir que o aumento da viscosidade reduziu o tamanho das gotas/partículas ao longo da emulsificação de todas as velocidades de agitação

avaliadas. Não foi possível avaliar o efeito da velocidade de agitação em conjunto com viscosidade da fase dispersa sobre as partículas finais devido ao baixo rendimento global de alguns dos testes.

Por fim, da influência da concentração de IB na fase dispersa, conclui-se que: (i) a variação da concentração de IB pouco influenciou a distribuição de tamanhos das gotas/partículas ao longo da emulsificação; (ii) o aumento da concentração de ibuprofeno para 4,5% reduziu significativamente o rendimento global do teste e produziu partículas com elevada deformação. As partículas produzidas no teste IB foram levadas ao SEM e não foi possível concluir sobre a presença ou não de ibuprofeno, o qual deve estar dissolvido no meio da EC. Ao comparar os resultados deste estudo com o teste base adotado (teste EC +), verifica-se que a presença de ibuprofeno aumentou o rendimento global de 3% (teste EC+) para 5,9% (teste IB -) e 5,1% (teste IB). Este aumento de rendimento global não se verificou no teste IB + (rendimento global de 0,57%), sendo mais uma confirmação de que a formulação já teria alcançado o seu limite de fármaco na fase dispersa. Também foi possível concluir que a presença de ibuprofeno na formulação (em comparação com o teste EC +) praticamente não influenciou a curva de distribuição de tamanhos de gotas/partículas às 3h30min de emulsificação. Em comparação com os testes *offline*, as partículas produzidas pela monitorização *online* apresentavam-se mais agregadas e deformadas. Não foi possível concluir sobre os tamanhos das partículas produzidas neste estudo.

O estudo realizado no presente trabalho foi relevante para a visualização em linha das diferentes fases do processo de emulsificação, e com isso, verificar como a variação dos parâmetros ou condições de operação influenciavam ao longo da formação das partículas, na sua produção final, morfologia e distribuição de tamanhos. Concluiu-se que mesmo com as dificuldades encontradas em relação a hidrodinâmica do LDS, que não é a mais apropriada para emulsificações, o estudo de uma forma global e de maneira exploratória mostrou-se útil na medida que traz a possibilidade de otimizar uma formulação ou condições de operação neste processo de emulsificação/evaporação do solvente.

Sendo assim, o presente trabalho levantou algumas sugestões para trabalhos futuros:

- i. De forma a controlar melhor a hidrodinâmica do LDS, seria conveniente adotar um sistema de agitação externo, o mais próximo possível das características do reator e de agitação apresentadas (secção 2.3.2.), onde a emulsificação ocorreria ao mesmo tempo que parte da emulsão fosse levada para janela de aquisição do LDS, retornando as gotas/partículas medidas, para a emulsificação após medição;

- ii. Realizar os testes em triplicado, de modo a assegurar a reprodutibilidade dos resultados e assim obter um significado estatístico no trabalho;
- iii. Minimizar o tempo de emulsificação na fase I da monitorização (agitação mecânica em *hotte*), na tentativa de monitorizar o início da emulsificação e com isso obter mais informações sobre o processo inicial de quebra das gotas;
- iv. Medir o tamanho das gotas até o início da solidificação das partículas e avaliar o efeito da viscosidade sobre o diâmetro médio (d_{32}) das gotas dos testes *offline*, criando um modelo que pudesse validar a Equação 2;
- v. Avaliar o efeito do tempo de extração e evaporação do solvente na formação das partículas e sobre as suas características finais;
- vi. Avaliar a influência da temperatura e da pressão sobre a formação e características finais das partículas produzidas;
- vii. Estudar o efeito dos parâmetros e condições de operação na formação das partículas de forma mais aprofundada, com mais níveis e também avaliando em conjunto alguns destes efeitos, por exemplo, o efeito da fração volumétrica em conjunto com o efeito da concentração de surfactante;
- viii. Avaliar a eficiência de encapsulamento e de carregamento das partículas de etilcelulose com ibuprofeno e, desta forma, estimar com maior precisão a quantidade de ibuprofeno presente nas partículas (no interior e sobre a superfície);
- ix. Avaliar o efeito de outros parâmetros e condições de operação, tais como os avaliados nas partículas de apenas etilcelulose, sobre a formação das partículas com ibuprofeno;
 - x. Realizar a monitorização da formação das partículas adequando a produção dessas a um fim terapêutico, avaliando tamanhos, morfologia, perfis e velocidades de libertação do ibuprofeno;
 - xi. Reduzir a aderência da etilcelulose aos equipamentos utilizando uma película anti-aderente, por exemplo, na janela de aquisição e nos agitadores (mecânico e do LDS).

6. Bibliografia

- Bandana, S. et al., 2010. Formulation and evaluation of floating microspheres of Curcumin. *International Journal of PharmaTech Research*, 2(2), pp.1415–1420.
- Batlouni, M., 2010. Anti-Inflamatórios Não Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, Cérebro-Vasculares e Renais. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 94(4), pp.556–563.
- Benita, S. ed., 2006. *Microencapsulation: methods and industrial applications* 2nd ed., New York: CRC Press.
- Chung, T.W., Huang, Y.Y. & Liu, Y.Z., 2001. Effects of the rate of solvent evaporation on the characteristics of drug loaded PLLA and PDLLA microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 212(2), pp.161–169.
- Dash, V. et al., 2010. Release kinetic studies of aspirin microcapsules from ethyl cellulose, cellulose acetate phthalate and their mixtures by emulsion solvent evaporation method. *Scientia Pharmaceutica*, 78(1), pp.93–101.
- Dedavid, B.A., Gomes, C.I. & Machado, G., 2007. *Microscopia Eletrônica de Varredura - Aplicações e preparação de amostras*, Porto Alegre: EDIPUCRS.
- Devrim, B. & Alemdar, M., 2016. The Application of Different Microencapsulation Methods and Formulation Parameters on Antibiotic Loaded PLGA Microparticles for Pulmonary Delivery. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), pp.57–68.
- Dow Cellulosics, 2005. Ethylcellulose Polymers Technical Handbook.
- EDQM, 2013. European Pharmacopoeia 8.0. *European Pharmacopoeia 8.0*, pp.333–336. Available at: <https://www.edqm.eu/> [Accessed July 18, 2016].
- Favaro-Trindade, C.S., Pinho, S.C. & Rocha, G.A., 2008. Revisão : Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, 11, pp.103–112.
- Franchetti, S.M.M. & Marconato, J.C., 2006. Polímeros Biodegradáveis - Uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. *Química Nova*, 29(4), pp.811–816.
- Freitas, S., Merkle, H.P. & Gander, B., 2005. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: Reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of Controlled Release*, 102(2), pp.313–332.
- Fu, J. et al., 2015. A new technique for determining critical micelle concentrations of surfactants and oil dispersants via UV absorbance of pyrene. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 484, pp.1–8.
- Ghosh, S.K. ed., 2006. Functional Coatings and Microencapsulation: A General Perspective. In *Functional Coatings*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Grodowska, K. & Parczewski, A., 2010. Organic solvents in the pharmaceutical industry. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 67(1), pp.3–12.

- Heiskanen, H., Denifl, P., Hurme, M., et al., 2012. Effect of Physical Properties and Emulsification Conditions on the Microsphere Size Prepared Using a Solvent Extraction Process. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 33(2), pp.234–244.
- Heiskanen, H., Denifl, P., Pitkänen, P., et al., 2012. Effect of preparation conditions on the properties of microspheres prepared using an emulsion-solvent extraction process. *Chemical Engineering Research and Design*, 90(10), pp.1517–1526.
- Hercules Inc., 2002. *Aqualon - Ethylcellulose (EC) Physical and Chemicals Properties*, Wilmington, DE.
- Hwisa, N.T. et al., 2013. Solvent Evaporation Techniques as Promising Advancement in Microencapsulation. *Vedic Research International Biological Medicinal Chemistry*, 1(1), pp.8–22.
- Jyothi, N.V.N. et al., 2010. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of microencapsulation*, 27(3), pp.187–197.
- Jyothi, S.S. et al., 2012. Microencapsulation: A review. *Internacional Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3(1), pp.509–531.
- Kang, J., Sah, E. & Sah, H., 2014. Applicability of non-halogenated methyl propionate to microencapsulation. *Journal of Microencapsulation*, 31(4), pp.323–332.
- Khan, P.F.K.A. et al., 2015. A Review on Microencapsulation. *Pharma Science Monitor*, 6(2), pp.38–49.
- Lai, M.-K. & Tsiang, R.C.-C., 2004. Encapsulating acetaminophen into poly(L-lactide) microcapsules by solvent-evaporation technique in an O/W emulsion. *Journal of microencapsulation*, 21(3), pp.307–316.
- Leimann, F.V., 2008. *Microencapsulação de óleo essencial de capim limão utilizando o processo de coacervação simples*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina.
- Li, M., Rouaud, O. & Poncelet, D., 2008. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics*, 363(1–2), pp.26–39.
- Malmsten, M., 2002. *Surfactants and Polymers in Drug Delivery*, Stockholm, Sweden: Marcel Dekker.
- Malvern Instruments Ltd, 2007a. *Hydro 2000MU User Manual*, United Kingdom.
- Malvern Instruments Ltd, 2007b. *Mastersizer 2000 User Manual*, United Kingdom.
- Matsumoto, A. et al., 2008. A novel preparation method for PLGA microspheres using non-halogenated solvents. *Journal of Controlled Release*, 129(3), pp.223–227.
- Matté, G.M. & Rosa, S. da, 2013. a Tecnologia Da Microencapsulação Através Das Microesferas De Quitosana. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 14(5), pp.206–218.
- Medendorp, J. et al., 2015. Development and beyond: Strategy for long-term maintenance of

- an online laser diffraction particle size method in a spray drying manufacturing process. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 112, pp.79–84.
- Mendes, L.G., 2012. *Microencapsulação do corante natural de urucum: uma análise da eficiência da goma do cajueiro como material de parede*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Ceará.
- Mokale, V.J. et al., 2014. Preparation and Characterization of Biodegradable Glimepiride Loaded PLA Nanoparticles by o/w Solvent Evaporation Method Using High Pressure Homogenizer: A Factorial Design Approach. *Scholarena Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1(1), pp.1–10.
- Momoh, M.A. et al., 2014. Formulation and In vitro Evaluation of Ibuprofen-Loaded Poly (D,L-lactide-co-glycolide) Microparticles. *Tropical Journal of Pharmaceutic al Research*, 13(10), pp.1571–1576.
- Morrison, I.D. & Ross, S., 2002. *Colloidal Dispersions - Suspensions, Emulsions and Foams*, New York: John Wiley & Sons.
- Myers, D., 2006. *Surfactant Science and Technology* 3rd ed., New Jersey: John Wiley & Sons.
- Nepal, P.R., Chun, M.K. & Choi, H.K., 2007. Preparation of floating microspheres for fish farming. *International Journal of Pharmaceutics*, 341(1–2), pp.85–90.
- Nova, M.V. et al., 2014. Formulation and characterization of ethylcellulose microparticles containing L-alanyl- L-glutamine peptide. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 40(10), pp.1308–1317.
- Okuro, P.K., Junior, F.E. de M. & Favaro-Trindade, C.S., 2013. Technological challenges for spray chilling encapsulation of functional food ingredients. *Food Technology and Biotechnology*, 51(2), pp.171–182.
- Oledzka, E. & Sobczak, M., 2012. Polymers in the Pharmaceutical Applications - Natural and Bioactive Initiators and Catalysts in the Synthesis of Biodegradable and Bioresorbable Polyesters and Polycarbonates. *Innovations in Biotechnology*, pp.139–160.
- Oliveira, A.G., 2010. *Caracterização da Distribuição do Tamanho de Gotas em Emulsões Água e Óleo Utilizando Diferentes Técnicas de Medição*. Dissertação para obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica. Universidade Federal de Itajubá.
- Paul, E.L., Atiemo-Obeng, V.A. & Kresta, S.M. eds., 2004. *Handbook of Industrial Mixing - Science and Practice*, New Jersey: John Wiley & Sons.
- Poncelet, D., 2006. Microencapsulation: fundamentals, methods and applications. *Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science*, pp.23–34.
- Qiao, X. et al., 2015. Stability and rheological behaviors of different oil/water emulsions stabilized by natural silk fibroin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 475(1), pp.84–93.
- Rodrigues, M.G.R.H., 2012. *Monitorização da cinética de formação de microcápsulas usando uma técnica de dispersão de luz*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Química

Farmacêutica Industrial. Universidade de Coimbra.

- Saini, N. & Saini, G., 2016. Formulation and Characterization of Fluvastatin Sodium Loaded Microspheres. *Internacional Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 7(5), pp.5034–5041.
- Saltzman, W.M., 2001. *Drug delivery: engineering principles for drug therapy*, New York: Oxford University Press, Inc.
- Servat, L. et al., 2010. Microencapsulação: uma Alternativa Promissora para a Preservação de Produtos Naturais. *Revista Fitos*, 5(2), pp.52–57.
- Silva, A.F.T. et al., 2013. Particle sizing measurements in pharmaceutical applications: Comparison of in-process methods versus off-line methods. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85, pp.1006–1018.
- Silva, C. et al., 2003. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 39(1), pp.1–20.
- Silva, P.T. et al., 2014. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*, 44(7), pp.1304–1311.
- Singh, M.N. et al., 2010. Microencapsulation: A promising techniques for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Science*, 5(2), pp.65–77.
- Sreelola, V. & Sailaja, A.K., 2014. Preparation and characterisation of ibuprofen loaded polymeric nanoparticles by solvent evaporation technique. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(8), pp.416–421.
- Tiwari, S. & Verma, P., 2011. Microencapsulation technique by solvent evaporation method (Study of effect of process variables). *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*, 2(8), pp.998–1005.
- Trino, A.S.M., 2012. *Estudo sistemático da formação de estrutura em processos de microencapsulação por evaporação de solvente*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Química Farmacêutica Industrial. Universidade de Coimbra.
- Valot, P. et al., 2009. Effects of process parameters on the properties of biocompatible Ibuprofen-loaded microcapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, 369(1–2), pp.53–63.
- Verma, N.K. et al., 2015. Formulation and characterization of floating microspheres of ibuprofen. *Internacional Journal of Research in Pharmacy and Science*, 5(1), pp.18–23.
- Villanova, J.C.O., Oréfice, R.L. & Cunha, A.S., 2010. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 20(1), pp.51–64.
- Wan, X. et al., 2011. Revealing formation process of microcapsules during in situ polymerization via confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Colloid and Polymer Science*, 289(15–16), pp.1719–1728.
- Yang, C.Y., Tsay, S.Y. & Tsiang, R.C.C., 2000. An enhanced process for encapsulating aspirin in ethyl cellulose microcapsules by solvent evaporation in an O/W emulsion. *Journal of*

Microencapsulation, 17(3), pp.269–277.

Yang, Y.Y., Chia, H.H. & Chiung, T.S., 2000. Effect of preparation temperature on the characteristics and release profiles of PLGA microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Journal of Controlled Release*, 69(1), pp.81–96.

Zhu, Y. et al., 2005. Influence of surfactants on the parameters of polylactide nanocapsules containing insulin. *Journal of Surfactants and Detergents*, 8(4), pp.353–358.

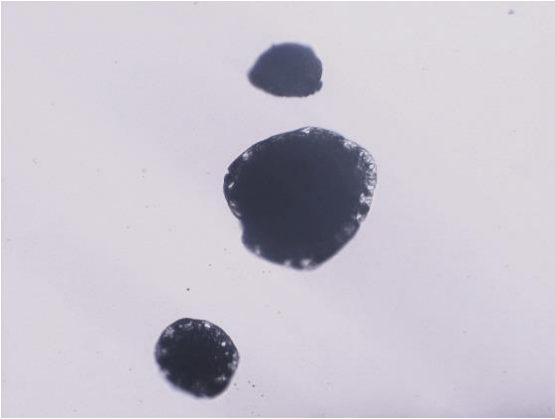
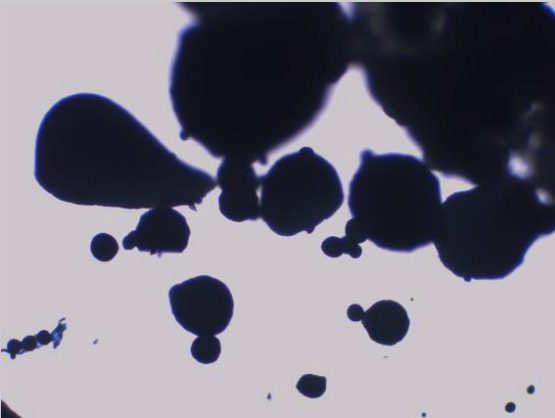
Zidan, A.S., Rahman, Z. & Khan, M. a., 2010. Online monitoring of PLGA microparticles formation using Lasentec focused beam reflectance (FBRM) and particle video microscope (PVM). *The AAPS Journal*, 12(3), pp.254–62.

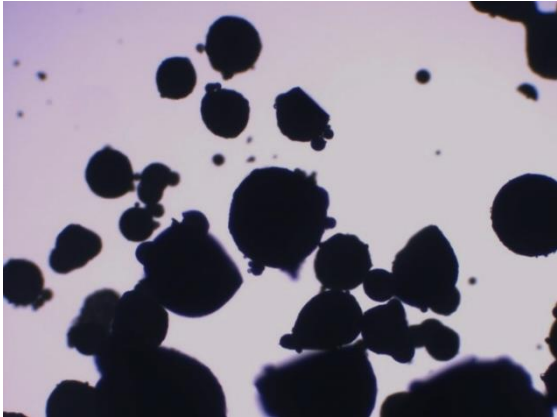

Anexo I

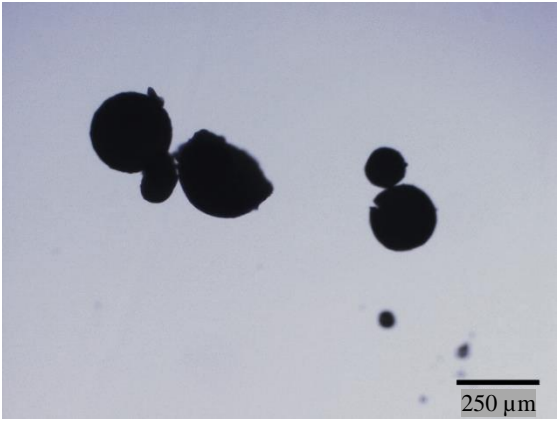

Os testes realizados para definição da formulação base dos testes *offline* são apresentados na Tabela I.1.

Tabela I.1 – Testes realizados para definição da formulação base dos testes *offline*.

Teste	Materiais	Condições	Microscopia ótica
1	<p>Fase dispersa: - 3,4 g PLA (6% em massa) - 40 mL DCM</p> <p>Fase contínua: - 400 mL água - 7,5 mL de Tween 80</p>	<p>- Fase dispersa: agitação magnética de 500 rpm e a temperatura de 25°C.</p> <p>- Fase contínua: agitação magnética de 500 rpm e temperatura 25°C.</p> <p>- Emulsificação a 25°C por 15 min, após manteve-se a 35°C por alguns minutos.</p>	Não formam-se partículas.
2	<p>Fase dispersa: - 3,4 g PLA (6% em massa) - 40 mL DCM</p> <p>Fase contínua: - 400 mL água - 7,5 mL de Tween 80</p>	<p>- Fase dispersa: agitação magnética de 500 rpm e a temperatura de 20°C.</p> <p>- Fase contínua: agitação magnética de 500 rpm e temperatura 20°C.</p> <p>- Emulsificação a 20°C durante os 25 min de emulsificação.</p>	Não formam-se partículas.
3	<p>Fase dispersa: - 3,4 g PLA (6% em massa) - 40 mL DCM</p> <p>Fase contínua: - 400 mL água - 7,5 mL de Tween 80</p>	<p>- Fase dispersa: agitação magnética de 500 rpm e a temperatura de 20°C.</p> <p>- Fase contínua: agitação magnética de 500 rpm e temperatura 20°C.</p> <p>- Emulsificação a 30°C por 30 min.</p>	Não formam-se partículas.

<p>4</p> <p>Fase dispersa: - 3,4085 g EC (6% em massa) - 40 mL DCM</p> <p>Fase contínua: - 400 mL água - 7,5 mL de Tween 80</p>	<p>- Fase dispersa: agitação magnética de 500 rpm e a temperatura ambiente.</p> <p>- Fase contínua: agitação mecânica de 300 rpm e temperatura 20°C.</p> <p>- Emulsificação: agitação mecânica de 300 rpm e temperatura 20°C por 15 min. 30°C por 1 h. 40°C por 30 min. Tempo total = 2 h.</p>	 <p>Ampliação 100x.</p>
<p>5</p> <p>Fase dispersa: - 2,2036 g EC (4% em massa) - 40 mL DCM</p> <p>Fase contínua: - 400 mL água - 7,5 mL de Tween 80</p>	<p>- Fase dispersa: agitação magnética de 500 rpm e temperatura ambiente.</p> <p>- Fase contínua: agitação mecânica de 600 rpm e temperatura 20°C.</p> <p>- Emulsificação: agitação mecânica de 600 rpm e temperatura 20°C por 15 min, após aumentou-se a temp para 35°C por 2 h. Tempo emulsificação = 2:15 h.</p>	 <p>Ampliação 40x.</p>

<p>6</p> <p>Fase dispersa: - 2,2039 g EC (4% em massa) - 40 mL DCM</p> <p>Fase contínua: - 400 mL água - 7,5 mL de Tween 80</p>	<p>- Fase dispersa: agitação magnética de 500 rpm e a temperatura ambiente.</p> <p>- Fase contínua: agitação mecânica de 600 rpm e temperatura 20°C.</p> <p>- Emulsificação: agitação mecânica de 600 rpm. 20°C por 15 min. 35°C por 1:30 h. Tempo emulsificação = 1:45 h.</p>	 <p>Ampliação 40x.</p>
<p>7</p> <p>Fase dispersa: - 2,2048 g EC (4% em massa) - 40 mL DCM</p> <p>Fase contínua: - 400 mL água - 7,5 mL de Tween 80 - 3 mL de DCM</p>	<p>- Fase dispersa: agitação magnética de 500 rpm e temperatura ambiente.</p> <p>- Fase contínua: agitação mecânica de 600 rpm e temperatura 20°C.</p> <p>- Emulsificação: agitação mecânica de 600 rpm. A 20°C por 15 min e a 35°C por 2 h. Tempo emulsificação = 2:15 h.</p>	 <p>Ampliação 40x.</p> <p>Massa partículas = 0,0903 g <u>Rendimento global = 4,1%</u></p>

<p>8</p> <p>Fase dispersa: - 2,2 g EC (4% em massa) - 40 mL DCM</p> <p>Fase contínua: - 400 mL água - 7,5 mL de Tween 80 - 4,5 mL de DCM</p>	<p>- Fase dispersa: agitação magnética de 500 rpm e temperatura ambiente.</p> <p>- Fase contínua: agitação mecânica de 600 rpm e temperatura 20°C.</p> <p>- Emulsificação: agitação mecânica de 600 rpm. A 20°C por 15 min e a 35°C por 2 h. Tempo emulsificação = 2:15 h.</p>	 <p>Ampliação 40x.</p> <p>Massa partículas = 0,0603 g <u>Rendimento global = 2,7%</u></p>
<p>9</p> <p>Fase dispersa: - 2,2027 g EC (4% em massa) - 40 mL DCM</p> <p>Fase contínua: - 400 mL água - 7,5 mL de Tween 80 - 3 mL de DCM</p>	<p>- Fase dispersa: agitação magnética de 500 rpm e temperatura ambiente.</p> <p>- Fase contínua: agitação mecânica de 600 rpm e temperatura 20°C.</p> <p>- Emulsificação: agitação mecânica de 600 rpm. A 20°C por 15 min e a 35°C por 1:45 h.</p> <p>Tempo emulsificação = 2 h.</p>	 <p>Ampliação 40x.</p>

10

Fase dispersa:
 - 2,1968 g
 PLA (4% em
 massa)
 - 40 mL DCM

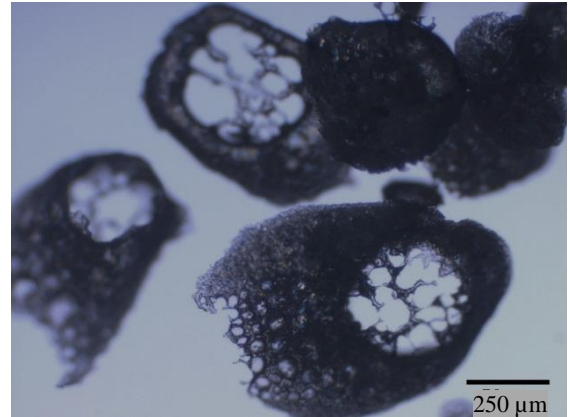
Fase contínua:
 - 400 mL
 água
 - 7,5 mL de
 Tween 80
 - 3 mL de
 DCM

- Fase dispersa:
 agitação magnética
 de 500 rpm e
 temperatura
 ambiente.

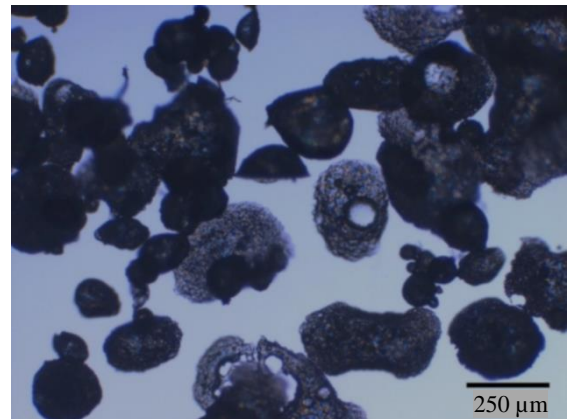
- Fase contínua:
 agitação mecânica
 de 600 rpm e
 temperatura 20°C.

- Emulsificação:
 agitação mecânica
 de 600 rpm. A 20°C
 por 15 min e a 35°C
 por 2 h.

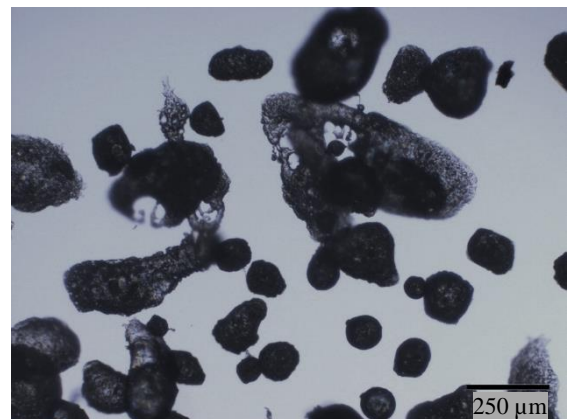
Tempo
 emulsificação =
 2:15 h.



Após peneira de 595 µm. Ampliação 40x.



Após peneira de 300 µm. Ampliação 40x.



Após peneira de 212 µm. Ampliação 40x.

11

Fase dispersa:
 - 2,2015 g EC
 (4% em massa)
 - 40 mL DCM

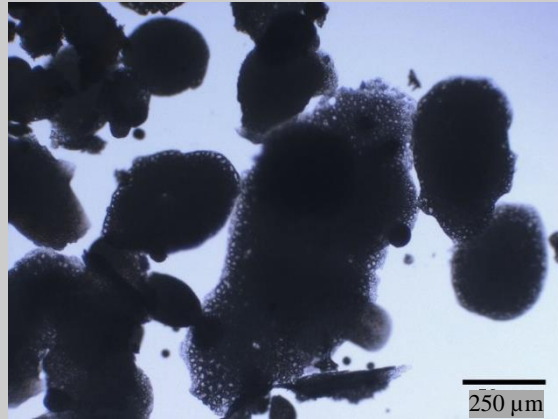
Fase contínua:
 - 400 mL água
 - 7,5 mL de Tween 80
 - 3mL de DCM

- Fase dispersa: agitação magnética de 500 rpm e temperatura ambiente.

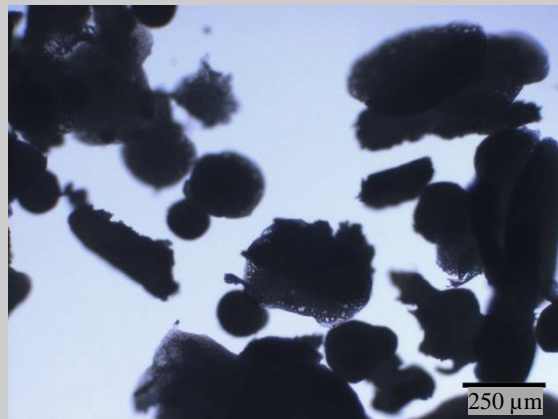
- Fase contínua: agitação mecânica de 600 rpm e temperatura 20°C.

- Emulsificação: agitação mecânica de 600 rpm. A 20°C por 15 min e a 35°C por 2:45 h.

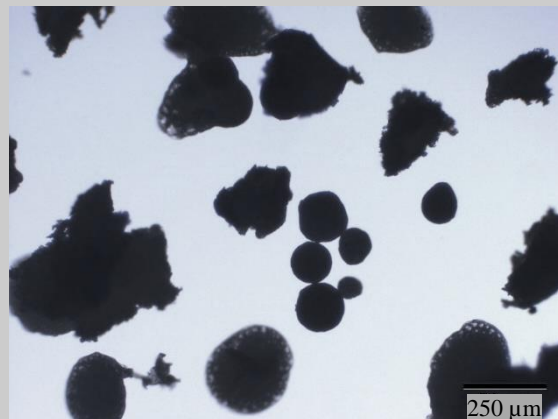
Tempo emulsificação = 3 h.



Após peneira 600 µm. Ampliação 40x.

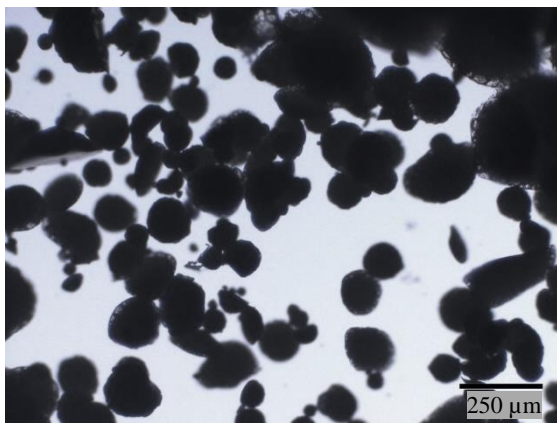
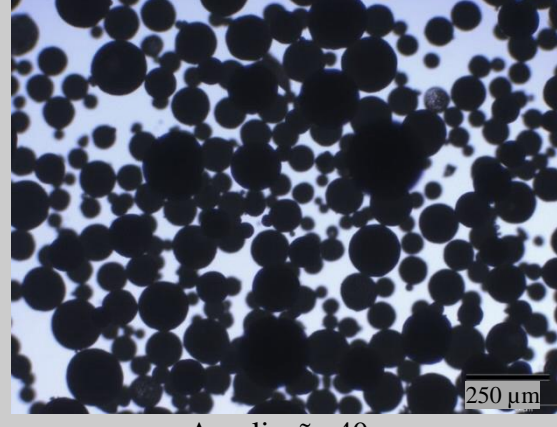



Após peneira 300 µm. Ampliação 40x.



Após peneira 212 µm. Ampliação 40x.

Massa partículas = 0,0618 g.
Rendimento global = 2,9%

<p>12</p>	<p>Fase dispersa: - 1,1085 g EC (4% em massa) - 20 mL DCM</p> <p>Fase contínua: - 400 mL água - 3,8 mL de Tween 80 (1% em massa) - 3 mL de DCM</p>	<p>- Fase dispersa: agitação magnética de 500 rpm e temperatura ambiente.</p> <p>- Fase contínua: agitação mecânica de 600 rpm e temperatura 20°C.</p> <p>- Emulsificação: agitação mecânica de 600 rpm. A 20°C por 15 min e a 35°C por 2:15 h.</p> <p>Tempo emulsificação = 2:30 h.</p>	 <p>Ampliação 40x.</p> <p>Massa partículas = 0,0087 g. <u>Rendimento global = 0,8%</u></p>
<p>13</p>	<p><u>TESTE BASE</u></p> <p>Fase dispersa: - 2,4017 g EC (4% em massa) - 43,1 mL DCM</p> <p>Fase contínua: - 400 mL água - 3,8 mL de Tween 80 - 3 mL de DCM</p>	<p>- Fase dispersa: agitação magnética de 500 rpm e temperatura ambiente.</p> <p>- Fase contínua: agitação mecânica de 600 rpm e temperatura 20°C.</p> <p>- Emulsificação: agitação mecânica de 600 rpm. A 20°C por 15 min e a 35°C por 4 h.</p> <p>Tempo emulsificação = 4:15 h</p>	 <p>Ampliação 40x.</p>  <p>Micropartículas após peneira de 600 μm. Massa partículas = 1,3735 g. <u>Rendimento global = 57%</u></p>

14

<p>Fase dispersa: - 2,1831 g PLA (4% em massa) - 40 mL DCM</p> <p>Fase contínua: - 400 mL água - 3,8 mL de Tween 80 (1% em massa) - 3 mL de DCM</p>	<p>- Fase dispersa: agitação magnética de 500 rpm e temperatura ambiente.</p> <p>- Fase contínua: agitação mecânica de 600 rpm e temperatura 20°C.</p> <p>- Emulsificação: agitação mecânica de 600 rpm. A 20°C por 15min e a 35°C por 2:30 h.</p> <p>Tempo total emulsão = 2:45 h.</p>	<p>Não formam-se partículas.</p>
---	---	----------------------------------

Anexo II

Procedimento detalhado para fabrico das partículas da formulação base por emulsificação/evaporação do solvente – testes *offline*

1. Equipamentos

- 1.1. Copo 600 mL com chicanas.
- 1.2. Copo de 100 mL.
- 1.3. Pipetas.
- 1.4. Magnetos.
- 1.5. Tinas de vidro.
- 1.6. Espátulas.
- 1.7. Papel de filtro.
- 1.8. Placa de aquecimento com termopar acoplado, Heidolph MR3001K.
- 1.9. Agitador mecânico, propeller, Heidolph RZR 2102 Control.
- 1.10. Balança AG 204, Metter Toledo.
- 1.11. Estufa, WTC Binder.
- 1.12. Exsiccador.
- 1.13. Sistema de filtração com vácuo.
- 1.14. Peneiro 600 μm , Retsch.

2. Materiais

- 2.1. Ibuprofeno, 2-(4-Isobutylphenyl) propionic, > 98%, Tokyo Chemical Industry (TCI).
- 2.2. Etilcelulose, Acros Organics, 48%, 22cps (solução 5% 80/20 tolueno/etanol).
- 2.3. Diclorometano, Fisher Chemical.
- 2.4. Tween 80, Merck KgaA.
- 2.5. Água destilada.

3. Preparação da fase dispersa

- 3.1. Pesar 2,2 g de etilcelulose.
- 3.2. Medir 40 mL de diclorometano e colocar no copo de 100 mL. Manter sob agitação magnética de 500 rpm e a temperatura ambiente.

- 3.3. Adicionar a etilcelulose ao diclorometano lentamente, para não formar aglomerado. Tapar o copo com parafilme e deixar agitar até que a etilcelulose se dissolva.

4. Preparação da fase contínua

- 4.1. No copo de 600 mL, adicionar 400 mL de água destilada. Manter sob agitação mecânica de 600 rpm e a temperatura controlada de 20°C.
- 4.2. Adicionar 3,8 mL de Tween 80 a água destilada sob agitação.
- 4.3. Adicionar 3mL de diclorometano a fase contínua e manter agitação.

5. Emulsificação

- 5.1. Adicionar a fase dispersa a fase contínua muito devagar, com auxílio de uma vareta (método de decantação).
- 5.2. Tapar o copo com parafilme para evitar a evaporação do diclorometano.
- 5.3. Emulsificar sob agitação mecânica de 600 rpm e a temperatura controlada de 20°C por 15 min.
- 5.4. Aumentar a temperatura do termopar para 35°C e manter sob agitação em 600 rpm até que todo o diclorometano evapore (verificação por diferença de volume e clarificação da emulsão).

6. Filtração e lavagem das partículas

- 6.1. Filtrar em vácuo, utilizando um filtro levado a peso constante.
- 6.2. Lavar com água destilada até não haver formação de espuma.

7. Secagem das partículas

- 7.1. Colocar o filtro com as partículas na estufa a 37°C durante 24 h.
- 7.2. Retirar e colocar em exsiccador. Pesar após 1 h.
- 7.3. Voltar a colocar na estufa a 37° C por mais 1 h.
- 7.4. Retirar da estufa e voltar a pesar o filtro contendo as partículas. Se as pesagens diferirem de 2 mg, voltar a repetir do ponto 7.2., se não, considerar as partículas secas.

8. Peneiração das partículas

- 8.1. Peneirar as partículas secas utilizando um peneiro com malha de 600 μm .
- 8.2. Guardar as partículas no exsiccador.

Procedimento detalhado para fabrico das partículas da formulação base por emulsificação/evaporação do solvente – monitorização *online*

1. Equipamentos

- 1.1. Copo 600 mL com chicanas.
- 1.2. Copo de 100 mL.
- 1.3. Pipetas.
- 1.4. Magnetos.
- 1.5. Tinas de vidro.
- 1.6. Espátulas.
- 1.7. Papel de filtro.
- 1.8. Placa de aquecimento com termopar acoplado, Heidolph MR3001K.
- 1.9. Agitador mecânico, propeller, Heidolph RZR 2102 Control.
- 1.10. Balança AG 204, Metter Toledo.
- 1.11. Estufa, WTC Binder.
- 1.12. Exsiccador.
- 1.13. Sistema de filtração com vácuo.
- 1.14. Peneiro 600 μm , Retsch.

2. Materiais

- 2.1. Ibuprofeno, 2-(4-Isobutylphenyl) propionic, > 98%, Tokyo Chemical Industry (TCI).
- 2.2. Etilcelulose, Acros Organics, 48%, 22cps (solução 5% 80/20 tolueno/etanol).
- 2.3. Diclorometano, Fisher Chemical.
- 2.4. Tween 80, Merck KgaA.
- 2.5. Água destilada.

3. Preparação da fase dispersa

- 3.1. Pesar 0,81 g de etilcelulose.
- 3.2. Medir 14,9 mL de diclorometano e colocar no copo de 50 mL. Manter sob agitação magnética de 500 rpm e a temperatura ambiente.
- 3.3. Adicionar a etilcelulose ao diclorometano lentamente, para não formar aglomerado. Tapar o copo com parafilme e deixar agitar até que a etilcelulose se dissolva.

4. Preparação da fase contínua

- 4.1. No copo de 600 mL, adicionar 500 mL de água destilada. Manter sob agitação mecânica de 600 rpm e a temperatura controlada de 20°C.
- 4.2. Adicionar 1,4 mL de Tween 80 a água destilada sob agitação.
- 4.3. Adicionar 3,4mL de diclorometano a fase contínua e manter agitação.

5. Emulsificação em *hotte* (Fase I)

- 5.1. Adicionar a fase dispersa a fase contínua muito devagar, com auxílio de uma vareta (método de decantação).
- 5.2. Tapar o copo com parafilme para evitar a evaporação do diclorometano.
- 5.3. Emulsificar sob agitação mecânica de 600 rpm e a temperatura controlada de 20°C por 45 min.

6. Preparação do equipamento

- 6.1. Lavar o LDS com água.
- 6.2. Introduzir o programa de monitorização dos tamanhos de 1,5 em 1,5 min durante 45 min.
- 6.3. Alinhar o feixe de luz laser com água destilada.

7. Emulsificação em LDS (Fase II)

- 7.1. Após a fase I de emulsificação, levar o copo contendo a emulsão para o LDS e iniciar a aquisição mantendo o copo tapado com parafilme. A emulsificação ocorre a 20°C durante os primeiros 45 min de aquisição.
- 7.2. Aumentar a temperatura do banho para 35°C e alterar o programa de monitorização dos tamanhos de 3,5 em 3,5 min durante mais 2 h de aquisição.

8. Filtração e lavagem das partículas

- 8.1. Filtrar em vácuo, utilizando um filtro levado a peso constante.
- 8.2. Lavar com água destilada até não haver formação de espuma.

9. Secagem das partículas

- 9.1. Colocar o filtro com as partículas na estufa a 37°C durante 24 h.
- 9.2. Retirar e colocar em exsiccador. Pesquisar após 1 h.
- 9.3. Voltar a colocar na estufa a 37° C por mais 1 h.
- 9.4. Retirar da estufa e voltar a pesar o filtro contendo as partículas. Se as pesagens diferirem de 2 mg, voltar a repetir do ponto 9.2., se não, considerar as partículas secas.

10. Peneiração das partículas

- 10.1. Peneirar as partículas secas utilizando um peneiro com malha de 600 µm.
- 10.2. Guardar as partículas no exsiccador.

Anexo III

A evolução dos diâmetros $d(10)$, $d(50)$ e $d(90)$ ao longo da emulsificação dos estudos da influência da fração volumétrica da fase dispersa, da viscosidade da fase dispersa e da concentração de surfactante são apresentadas, respetivamente, nas Figuras III.1, III.2 e III.3. Os pontos instáveis das aquisições foram removidos destas representações.

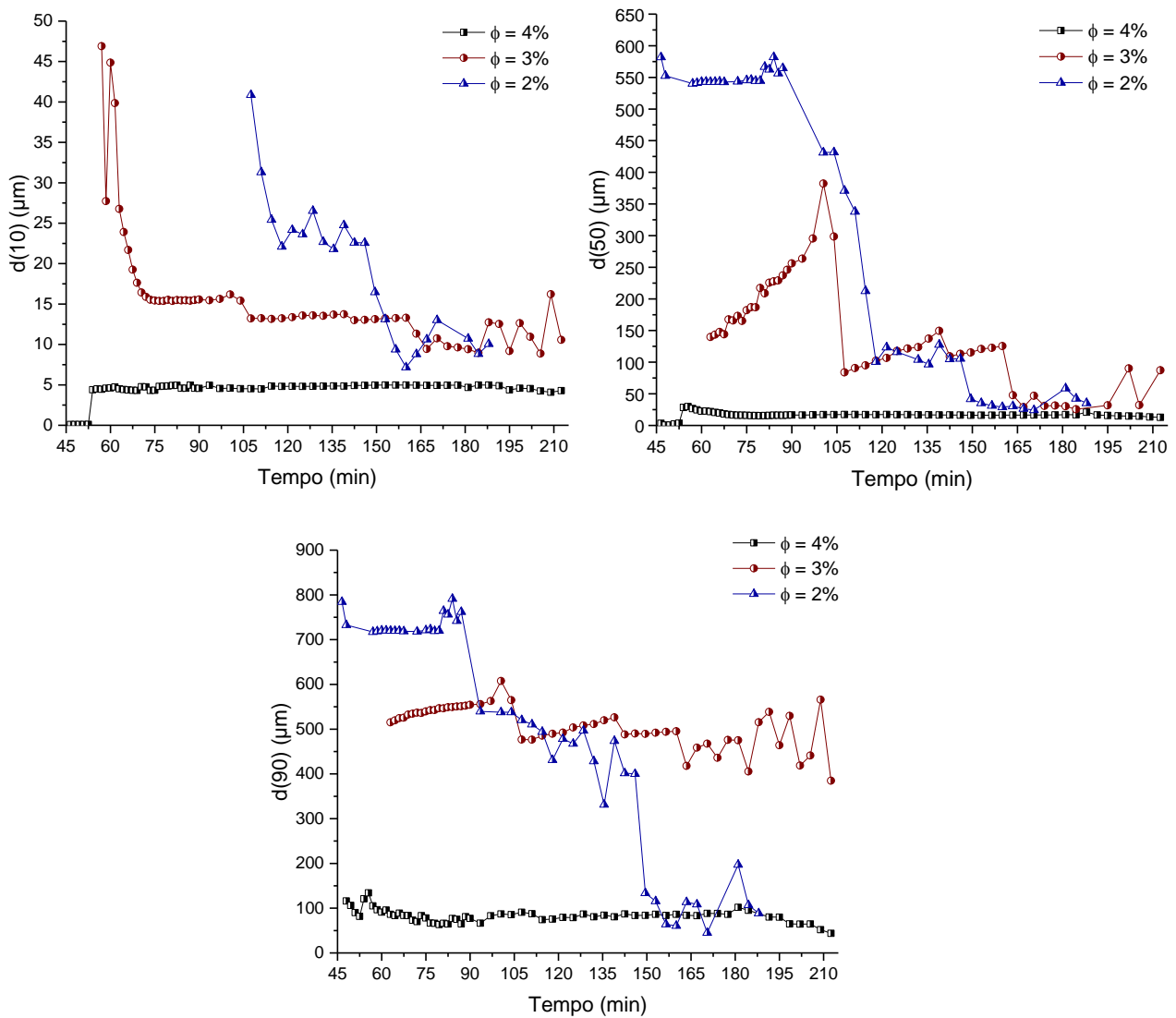


Figura III.1 – Evolução dos diâmetros $d(10)$, $d(50)$ e $d(90)$ dos testes $\phi +$ ($\phi = 4\%$), teste base ($\phi = 3\%$) e teste $\phi -$ ($\phi = 2\%$) ao longo da emulsificação.

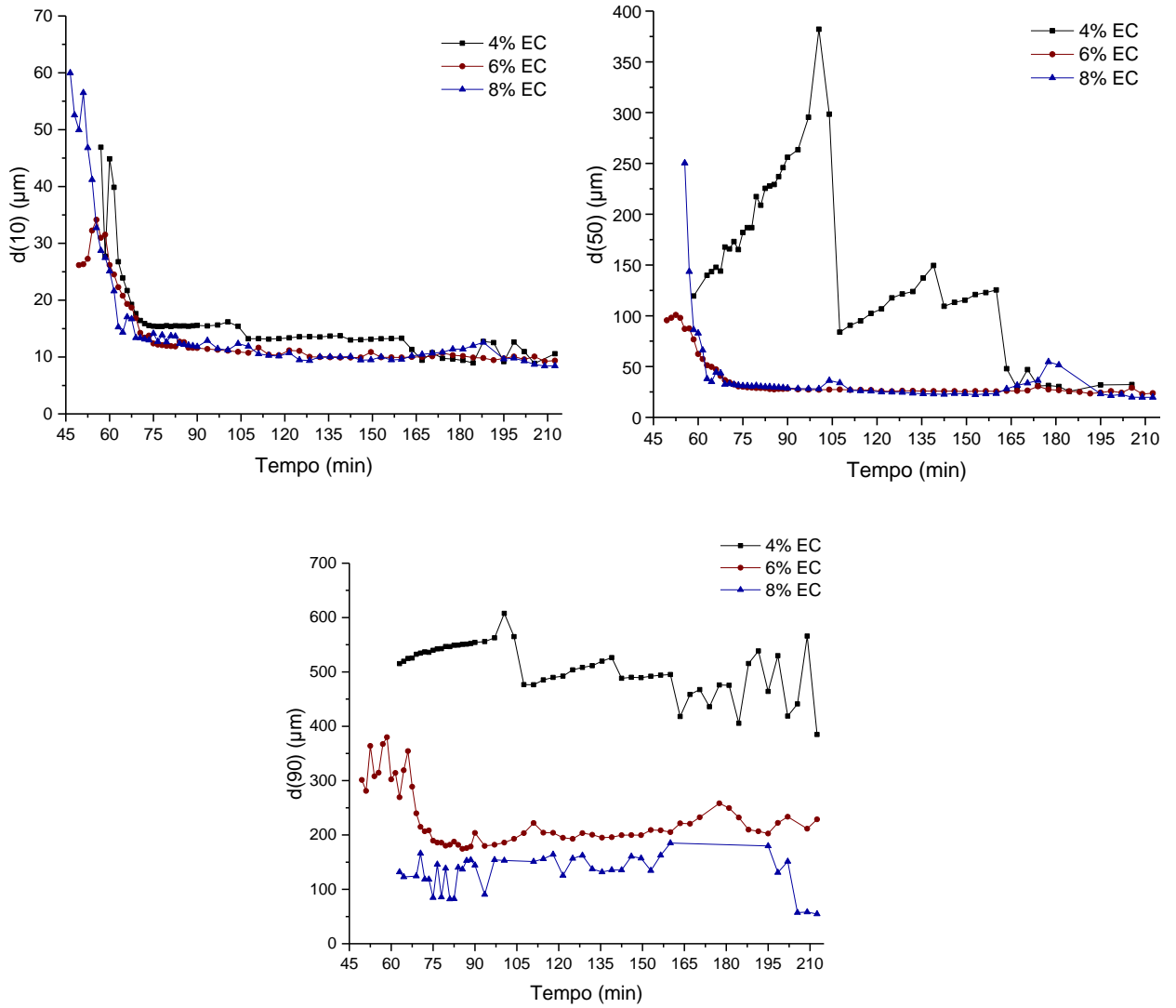


Figura III.2 – Evolução dos diâmetros $d(10)$, $d(50)$ e $d(90)$ dos testes base (4% EC), teste EC + (6% EC) e teste EC ++ (8% EC) ao longo da emulsificação.

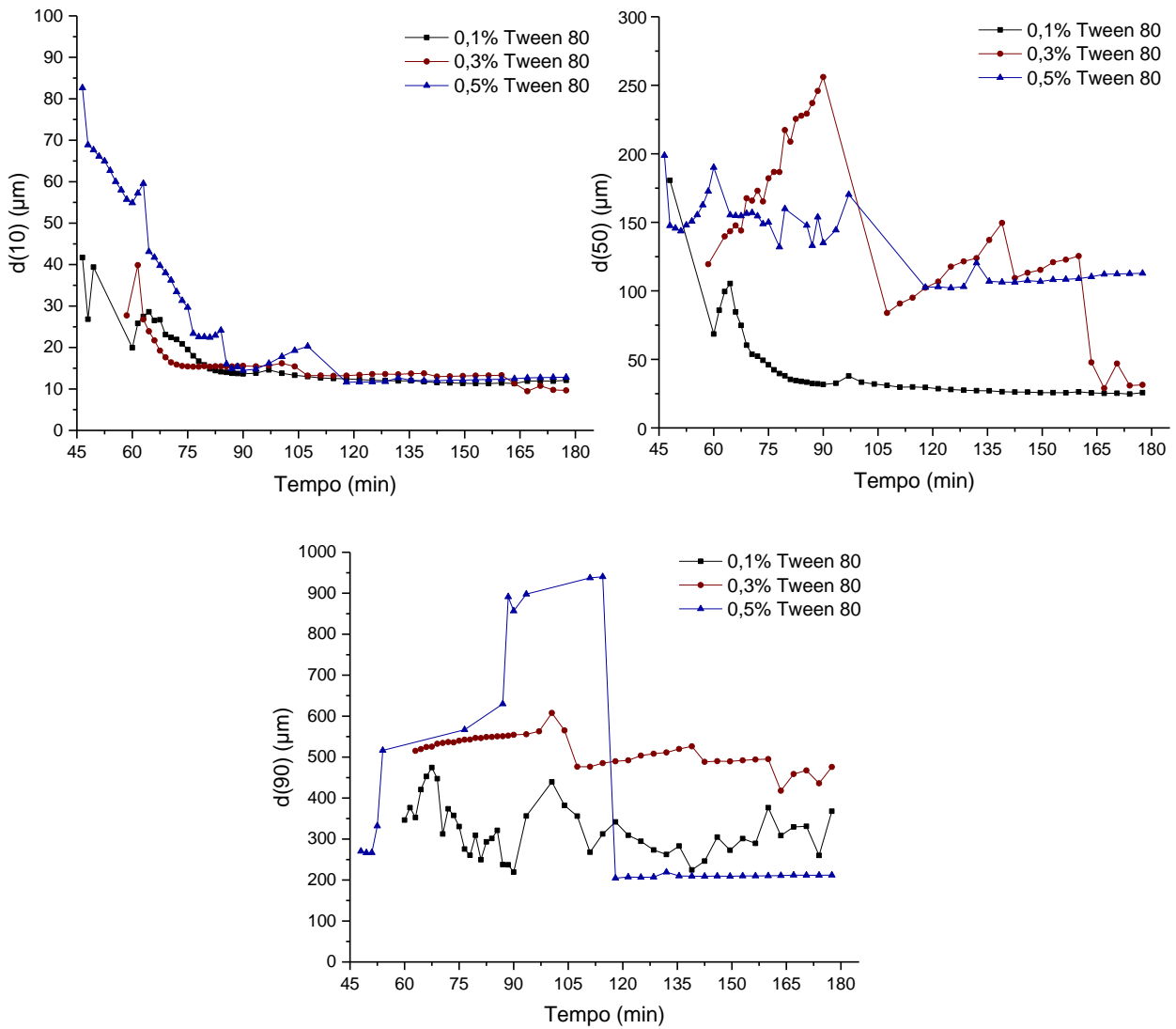


Figura III.3 – Evolução dos diâmetros $d(10)$, $d(50)$ e $d(90)$ dos testes tween – (0,1% Tween 80), teste base (0,3% Tween 80) e teste tween + (0,5% Tween 80) ao longo da emulsificação.

Anexo IV

As Tabela IV.1, IV.2 e IV.3 apresentam as valores da obscuração ao longo da emulsificação dos testes com ϕ iguais a 4% (teste $\phi +$), 3% (teste base) e 2% (teste $\phi -$).

Tabela IV.1 – Valores da obscuração ao longo do tempo de emulsificação do teste $\phi +$.

Ciclo	Tempo de emulsificação (min)	Obscuração (%)
1	46,5	25,35
2	48	27,69
3	49,5	29,35
4	51	30,79
5	52,5	32,11
6	54	33,05
7	55,5	33,91
8	57	34,65
9	58,5	35,37
10	60	35,79
11	61,5	36,29
12	63	36,68
13	64,5	37,06
14	66	37,43
15	67,5	37,78
16	69	38,03
17	70,5	38,17
18	72	38,15
19	73,5	38,02
20	75	37,7
21	76,5	37,31
22	78	36,91
23	79,5	36,56
24	81	36,25
25	82,5	35,92
26	84	35,63
27	85,5	35,32
28	87	35,02
29	88,5	34,72
30	90	34,45
31	93,5	34,16

32	97	33,46
33	100,5	32,87
34	104	32,28
35	107,5	31,69
36	111	31,14
37	114,5	30,62
38	118	30,12
39	121,5	30,17
40	125	29,68
41	128,5	29,22
42	132	28,31
43	135,5	28,47
44	139	27,66
45	142,5	27,88
46	146	27,07
47	149,5	26,77
48	153	26,88
49	156,5	26,74
50	160	26,44
51	163,5	25,68
52	167	25,39
53	170,5	25,66
54	174	25,4
55	177,5	24,67
56	181	24,83
57	184,5	24,75
58	188	24,88
59	191,5	24,49
60	195	23,56
61	198,5	23,14
62	202	23,21
63	205,5	23,33
64	209	22,4
65	212,5	22,37

Tabela IV.2 – Valores da obscuração ao longo do tempo de emulsificação do teste base.

Ciclo	Tempo de emulsificação (min)	Obscuração (%)
1	46,5	19,44
2	48	18,94
3	49,5	19,36
4	51	20,55
5	52,5	22,34
6	54	23,13
7	55,5	25,19
8	57	25,02
9	58,5	26,03
10	60	26,31
11	61,5	26,84
12	63	27,33
13	64,5	28,2
14	66	29,38
15	67,5	31,14
16	69	32,7
17	70,5	33,54
18	72	34,01
19	73,5	33,86
20	75	33,98
21	76,5	33,97
22	78	33,78
23	79,5	33,83
24	81	33,38
25	82,5	33,39
26	84	33,11
27	85,5	32,93
28	87	32,78
29	88,5	32,55
30	90	32,54
31	93,5	31,83
32	97	31,32
33	100,5	30,55
34	104	30,75
35	107,5	29
36	111	28,4
37	114,5	27,42

38	118	26,63
39	121,5	25,89
40	125	25,23
41	128,5	24,73
42	132	24,08
43	135,5	23,85
44	139	23,34
45	142,5	22,93
46	146	22,55
47	149,5	22,15
48	153	21,89
49	156,5	21,77
50	160	21,58
51	163,5	20,59
52	167	19,15
53	170,5	19,89
54	174	19,04
55	177,5	18,56
56	181	18,04
57	184,5	16,74
58	188	21,19
59	191,5	21,1
60	195	16,82
61	198,5	21,18
62	202	19,85
63	205,5	18,31
64	209	23,84
65	212,5	20,53

Tabela IV.3 – Valores da obscuração ao longo do tempo de emulsificação do teste ϕ +.

Ciclo	Tempo de emulsificação (min)	Obscuração (%)
1	46,5	21,44
2	48	22,73
3	49,5	21,14
4	51	20,14
5	52,5	33,17
6	54	33,86
7	55,5	33,79
8	57	32,11
9	58,5	31,67
10	60	31,35
11	61,5	30,88
12	63	31,22
13	64,5	32,93
14	66	32,94
15	67,5	33,13
16	69	32
17	70,5	31,28
18	72	31,07
19	73,5	33,13
20	75	29,96
21	76,5	30,76
22	78	30,42
23	79,5	31,14
24	81	27,29
25	82,5	28,65
26	84	25,3
27	85,5	29,79
28	87	27,26
29	88,5	21,08
30	90	20,52
31	93,5	18,04
32	97	21,23
33	100,5	10,18
34	104	11,97
35	107,5	5,86
36	111	4,16
37	114,5	2,59

38	118	1,21
39	121,5	1,87
40	125	1,57
41	128,5	2,41
42	132	0,72
43	135,5	0
44	139	0,99
45	142,5	0
46	146	0
47	149,5	0
48	153	0
49	156,5	0
50	160	0
51	163,5	2,52
52	167	9,6
53	170,5	21,51
54	174	28,13
55	177,5	43,15
56	181	10,71
57	184,5	9,78
58	188	6,88
59	191,5	25,43
60	195	37,66
61	198,5	44,04
62	202	44,69
63	205,5	42,85
64	209	27,81
65	212,5	6,71

Anexo V

As Tabelas V.1, V.2, V.3 apresentam a média dos resultados da tensão de cisalhamento (τ), velocidade de corte ($\dot{\gamma}$) e viscosidade (μ) ao longo da aquisição, obtidas nos ensaios realizados em triplicado das amostras com 4, 6 e 8% de etilcelulose na fase dispersa.

Tabela V.1 – Resultados obtidos na medição da viscosidade da amostra com 4% de EC.

τ (Pa)	$\dot{\gamma}$ (s ⁻¹)	μ (Pa.s)
0,08	1,01	0,081
0,16	2,02	0,082
0,23	3,02	0,079
0,30	4,01	0,077
0,37	5,02	0,076
0,44	6,02	0,075
0,51	7,02	0,075
0,58	8,02	0,075
0,65	9,02	0,075
0,72	10,02	0,075
0,79	11,02	0,075
0,87	12,03	0,075
0,93	13,01	0,075
1,01	14,02	0,075
1,07	15,02	0,075
1,15	16,02	0,075
1,22	17,02	0,075
1,30	18,02	0,075
1,36	19,02	0,075
1,45	20,02	0,076
1,51	21,02	0,075
1,58	22,03	0,075
1,66	23,02	0,076
1,73	24,01	0,075
1,79	25,02	0,075
1,86	26,03	0,075
1,95	27,02	0,075
2,03	28,02	0,076
2,11	29,02	0,076
2,18	30,02	0,076
2,24	31,02	0,075
2,32	32,03	0,075
2,39	33,02	0,076
2,47	34,02	0,076
2,55	35,02	0,076
2,61	36,02	0,076
2,68	37,02	0,076
2,73	38,02	0,075

2,80	39,02	0,075
2,90	40,03	0,076
2,98	41,03	0,076
3,02	42,03	0,075
3,10	43,02	0,075
3,20	44,02	0,076
3,24	45,03	0,075
3,34	46,03	0,076
3,40	47,03	0,076
3,48	48,02	0,076
3,55	49,01	0,076
3,64	50,03	0,076
3,69	51,03	0,076
3,79	52,04	0,076
3,84	53,03	0,076
3,91	54,03	0,076
4,01	55,03	0,076
4,08	56,05	0,076
4,13	57,05	0,076
4,21	58,04	0,076
4,30	59,04	0,076
4,38	60,06	0,076
4,45	61,05	0,076
4,52	62,06	0,076
4,59	63,05	0,076
4,66	64,06	0,076
4,74	65,06	0,076
4,81	66,07	0,076
4,89	67,08	0,076
4,96	68,08	0,076
5,03	69,06	0,076
5,10	70,08	0,076
5,17	71,09	0,076
5,25	72,08	0,076
5,33	73,08	0,076
5,39	74,09	0,076
5,47	75,10	0,076
5,55	76,10	0,076
5,62	77,11	0,076
5,70	78,10	0,076
5,76	79,11	0,076
5,84	80,11	0,076
5,91	81,11	0,076
5,99	82,11	0,076
6,06	83,11	0,076
6,14	84,12	0,076
6,21	85,12	0,076
6,28	86,13	0,076
6,35	87,14	0,076
6,43	88,13	0,076
6,50	89,13	0,075

6,57	90,14	0,075
6,64	91,14	0,075
6,71	92,14	0,075
6,79	93,15	0,075
6,86	94,14	0,075
6,94	95,15	0,075
7,00	96,16	0,075
7,08	97,15	0,075
7,15	98,16	0,075
7,22	99,16	0,075
7,27	100,00	0,075

Tabela V.2 – Resultados obtidos na medição da viscosidade da amostra com 6% de EC.

τ (Pa)	$\dot{\gamma}$ (s ⁻¹)	μ (Pa.s)
0,25	1,01	0,244
0,50	2,00	0,251
0,75	3,01	0,250
1,00	4,00	0,250
1,25	5,01	0,250
1,50	6,01	0,250
1,75	7,02	0,250
1,99	8,02	0,248
2,23	9,01	0,248
2,48	10,01	0,248
2,74	11,01	0,249
2,98	12,02	0,248
3,24	13,02	0,249
3,48	14,01	0,249
3,72	15,01	0,248
3,99	16,02	0,249
4,23	17,02	0,248
4,49	18,01	0,249
4,73	19,02	0,249
4,98	20,01	0,249
5,25	21,01	0,250
5,47	22,01	0,249
5,74	23,02	0,250
6,01	24,02	0,251
6,25	25,01	0,250
6,47	26,01	0,249
6,74	27,02	0,250
7,02	28,02	0,251
7,28	29,02	0,251
7,53	30,01	0,251
7,79	31,02	0,251
8,04	32,01	0,251
8,29	33,02	0,251
8,54	34,01	0,251
8,80	35,02	0,251

9,03	36,01	0,251
9,26	37,02	0,250
9,49	38,02	0,250
9,75	39,02	0,250
10,04	40,02	0,251
10,27	41,02	0,251
10,48	42,01	0,250
10,78	43,01	0,251
11,01	44,02	0,250
11,24	45,02	0,250
11,55	46,01	0,251
11,75	47,02	0,250
12,03	48,02	0,251
12,27	49,01	0,250
12,54	50,01	0,251
12,76	51,03	0,250
13,06	52,03	0,251
13,29	53,02	0,251
13,54	54,03	0,251
13,82	55,03	0,251
14,07	56,03	0,251
14,30	57,04	0,251
14,56	58,05	0,251
14,84	59,04	0,251
15,10	60,04	0,252
15,36	61,05	0,251
15,61	62,05	0,251
15,85	63,05	0,251
16,12	64,06	0,252
16,37	65,06	0,252
16,63	66,06	0,252
16,89	67,07	0,252
17,14	68,06	0,252
17,39	69,07	0,252
17,63	70,08	0,252
17,89	71,08	0,252
18,16	72,09	0,252
18,41	73,07	0,252
18,66	74,08	0,252
18,92	75,08	0,252
19,19	76,10	0,252
19,43	77,10	0,252
19,70	78,09	0,252
19,94	79,10	0,252
20,21	80,11	0,252
20,45	81,10	0,252
20,73	82,11	0,253
20,97	83,12	0,252
21,23	84,11	0,252
21,49	85,11	0,253
21,73	86,12	0,253

22,00	87,12	0,253
22,26	88,12	0,253
22,52	89,12	0,253
22,76	90,13	0,253
23,02	91,13	0,253
23,28	92,13	0,253
23,54	93,13	0,253
23,81	94,13	0,253
24,06	95,15	0,253
24,32	96,14	0,253
24,58	97,16	0,253
24,83	98,15	0,253
25,10	99,15	0,253
25,28	100,00	0,253

Tabela V.3 – Resultados obtidos na medição da viscosidade da amostra com 8% de EC.

τ (Pa)	$\dot{\gamma}$ (s ⁻¹)	μ (Pa.s)
0,28	1,01	0,277
0,62	2,01	0,309
0,98	3,02	0,324
1,31	4,01	0,325
1,84	5,01	0,366
2,20	6,01	0,366
2,49	7,01	0,356
2,54	8,02	0,317
2,84	9,02	0,315
3,09	10,02	0,308
3,66	11,01	0,332
4,64	12,01	0,386
4,74	13,02	0,364
4,45	14,01	0,318
4,94	15,02	0,329
5,24	16,01	0,327
5,73	17,02	0,337
6,21	18,02	0,345
6,96	19,02	0,366
7,32	20,02	0,366
7,77	21,02	0,370
8,28	22,02	0,376
8,60	23,02	0,374
9,14	24,01	0,381
9,83	25,01	0,393
10,15	26,02	0,390
10,44	27,01	0,386
10,90	28,02	0,389
11,36	29,02	0,391
12,08	30,03	0,402
12,52	31,02	0,404
13,17	32,03	0,411

13,60	33,03	0,412
14,14	34,03	0,415
14,50	35,03	0,414
14,93	36,03	0,414
15,38	37,02	0,416
16,04	38,01	0,422
16,66	39,00	0,427
17,34	40,02	0,433
17,32	41,03	0,422
17,79	42,01	0,423
18,63	43,00	0,433
18,75	44,03	0,426
19,47	45,00	0,433
20,00	46,03	0,435
20,20	47,02	0,429
21,17	48,01	0,441
21,03	49,01	0,429
22,03	50,02	0,441
22,41	51,01	0,439
22,72	52,04	0,437
23,40	53,02	0,442
23,76	54,01	0,440
24,24	55,04	0,440
24,90	56,03	0,444
25,28	57,03	0,444
25,69	58,04	0,443
26,15	59,06	0,443
26,68	60,05	0,444
27,20	61,05	0,445
27,74	62,07	0,447
28,48	63,06	0,452
29,07	64,05	0,454
29,38	65,06	0,452
29,70	66,07	0,449
30,13	67,07	0,449
30,47	68,08	0,448
30,80	69,08	0,446
31,29	70,07	0,446
31,98	71,07	0,450
32,49	72,09	0,451
32,90	73,10	0,450
33,37	74,09	0,450
33,95	75,09	0,452
34,41	76,10	0,452
34,80	77,09	0,451
35,37	78,10	0,453
35,69	79,10	0,451
36,20	80,11	0,452
36,58	81,10	0,451
36,96	82,13	0,450
37,49	83,11	0,451

37,71	84,12	0,448
38,24	85,13	0,449
38,67	86,10	0,449
39,07	87,12	0,448
39,44	88,14	0,448
40,10	89,14	0,450
40,59	90,12	0,450
40,78	91,11	0,448
41,27	92,12	0,448
41,60	93,13	0,447
42,22	94,15	0,448
42,84	95,17	0,450
43,20	96,16	0,449
43,83	97,17	0,451
43,88	98,17	0,447
44,38	99,16	0,447
44,32	99,98	0,443