

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**CRISTALIZAÇÃO DO PRINCÍPIO ATIVO FARMACÊUTICO GLIBENCLAMIDA
POR PROCESSO DE PRECIPITAÇÃO COM ANTISSOLVENTE LÍQUIDO**

CAMILA STEFANNE DIAS COSTA

Fevereiro, 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

DISSERTAÇÃO

**CRISTALIZAÇÃO DO PRINCÍPIO ATIVO FARMACÊUTICO GLIBENCLAMIDA
POR PROCESSO DE PRECIPITAÇÃO COM ANTISSOLVENTE LÍQUIDO**

CAMILA STEFANNE DIAS COSTA

Sob a orientação do Professor

Dr. Gerson Luiz Vieira Coelho

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau em **Mestre em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Área de Concentração em Tecnologia Química.

Seropédica, RJ

Fevereiro, 2015

615.19

C837c

T

Costa, Camila Stefanne Dias, 1990-
Cristalização do princípio ativo
farmacêutico glibenclamida por processo de
precipitação com antissolvente líquido /
Camila Stefanne Dias Costa. - 2015.
70 f. : il.

Orientador: Gerson Luiz Vieira Coelho.
Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Engenharia Química, 2015.
Bibliografia: f. 46-55.

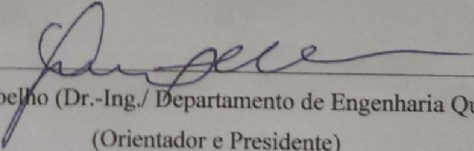
1. Química farmacêutica - Teses. 2.
Glibenclamida - Teses. 3. Precipitação
(Química) - Teses. 4. Cristalização - Teses.
5. Diabetes - Tratamento - Teses. 6.
Tecnologia química - Teses. I. Coelho,
Gerson Luiz Vieira, 1952- II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de
Pós-Graduação em Engenharia Química. III.
Título.

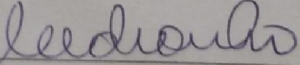
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

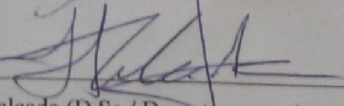
CAMILA STEFANNE DIAS COSTA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Área de Concentração Tecnologia Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 23 / 02 / 2015.


Gerson Luiz Vieira Coelho (Dr.-Ing./ Departamento de Engenharia Química/IT/UFRRJ)
(Orientador e Presidente)


Ricardo de Andrade Medronho (Ph.D./ Departamento de Engenharia Química/EQ/UFRRJ)


Luis Américo Calçada (D.Sc./ Departamento de Engenharia Química/IT/UFRRJ)

A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação, primeiramente, aos meus amados pais Matias e Elizabete por todo o amor e carinho incondicionais e por sempre destacarem a importância do estudo em minha vida, sempre prezando pela minha felicidade.

Aos meus queridos irmãos Raycan e Mathias Júnior por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu amado avô paterno Claudemiro, pois sei que mesmo não estando mais entre nós, sempre esteve ao meu lado guiando meus passos e contribuindo para o meu sucesso. Á todos os meus primos, tios e demais familiares que sempre me apoiaram e torceram por mim.

Em especial à minha tia Maria da Conceição que usou de todo o seu amor, carinho e paciência para me guiar e me ajudar a manter o foco e a força de vontade.

Ao meu amado namorado Bruno pelo apoio, paciência e por acreditar na minha capacidade, além de todo o carinho e cuidado oferecidos para me ajudar a superar os momentos difíceis.

Por fim, dedico a todos os amigos conquistados durante esses dois anos, que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse concluir esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela conquista e por todos os bons acontecimentos em minha vida.

Aos meus pais e irmãos por estarem sempre ao meu lado, zelando pela minha felicidade.

Ao meu querido namorado por todo o apoio, paciência e compreensão durante esses dois anos.

Ao meu orientador Dr. Gerson L. V. Coelho, que mesmo sabendo das minhas dificuldades confiou a mim a realização desse trabalho.

Aos amigos Andrew e Diego por sempre me ajudarem a solucionar os problemas encontrados durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Processos de Separação pelo companheirismo e ajuda quando preciso. Também agradeço aos demais amigos conquistados durante o curso e pelos momentos de alegria.

Com muito carinho, agradeço à minha amiga Ana Souza pelas conversas, confidências e momentos de dificuldade superados com a ajuda uma da outra. Levarei comigo cada lembrança boa e engraçada vividas e que contribuíram para que hoje eu possa dizer que sim, foi o maior presente recebido durante esses dois anos de mestrado.

Ao amigo Sérgio Magalhães, pesquisador no Laboratório de Escoamento de Fluidos Giulio Massarani, por sempre me ajudar nos momentos de dificuldade.

À CAPES e à FAPERJ pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para que fosse possível concluir esse trabalho.

BIOGRAFIA

Nascida em 03 de outubro de 1990, em Ipatinga, Minas Gerais, filha de Matias Rodrigues da Costa e Elizabete Marta Dias Costa, estudou durante os primeiros sete anos do Ensino Fundamental na Escola Estadual Gerson Gomes de Almeida, onde foi homenageada pelo bom desempenho estudantil, sempre atingindo ótimas notas em todas as disciplinas. Concluiu o Ensino Médio no Colégio John Wesley, onde sempre mostrou maior interesse pela Química e se preparou para o vestibular.

No ano de 2008, ingressou na Faculdade Presidente Antônio Carlos em Ipatinga, Minas Gerais, onde obteve o grau de bacharel em Engenharia Química no segundo semestre de 2012. Sempre esteve envolvida nas atividades oferecidas pela Faculdade. Em 2010, participou como bolsista de um projeto de Iniciação Científica apoiado pela Pró-reitoria de Pesquisa, Extensão, Pós-Graduação e Cultura. Em 2011 e 2012 participou da comissão organizadora do 1º e 2º Simpósio dos Profissionais e Estudantes da Química. Em 2014, voltou a participar do evento ao ministrar um curso de quatro horas para discentes em Engenharia Química na instituição. No primeiro semestre de 2013, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde conduziu uma pesquisa no Laboratório de Processos de Separação (LPS) voltada para a cristalização de princípios ativos farmacêuticos a fim de melhorar sua taxa de dissolução e biodisponibilidade oral, cujo trabalho resultou em tal dissertação. Participou de eventos, como VIII e IX Fórum da Pós-Graduação da UFRRJ, além do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química.

RESUMO

COSTA, Camila Stefanne Dias. **Cristalização do princípio ativo farmacêutico glibenclamida por processo de precipitação com antissolvente líquido**. 2015. 70p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2015.

Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crônica caracterizada pela constante hiperglicemia sanguínea resultante da resistência e/ou deficiência na ação da insulina. É uma desordem metabólica de grande impacto na saúde mundial devido à suas complicações crônicas e alta taxa de mortalidade. Pacientes diagnosticados com o diabetes do tipo II podem controlar o nível glicêmico com o uso de hipoglicemiantes. A Glibenclamida é um potente hipoglicemiante oral que tem sido utilizado no tratamento do DM-II, entretanto, possui baixa solubilidade aquosa e lenta taxa de dissolução. Neste estudo, micropartículas de glibenclamida foram produzidas por processo de precipitação com antissolvente líquido usando água como antissolvente. O design ortogonal $OA_9(3)^4$ proposto por Genichi Taguchi foi utilizado para investigar o efeito dos seguintes quatro fatores no tamanho e morfologia das partículas: concentração da solução [mg.mL^{-1}], razão de volume antissolvente/solvente [A/S], intensidade de agitação [rpm] e concentração de aditivo [% m/m]. As partículas de glibenclamida cristalizadas foram caracterizadas por microscopia ótica, difração de raios-X e espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier; a taxa de dissolução foi caracterizada por cromatografia líquida de alta eficiência. A concentração de aditivo teve um significativo efeito no diâmetro médio das partículas cristalizadas, seguida pela concentração da solução, razão de volume antissolvente/solvente e intensidade de agitação, sendo que os menores diâmetros foram obtidos quando os seguintes níveis foram utilizados: $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, A/S 10, 1500 rpm e 0,002 % m/m. Os resultados neste estudo mostram que o processo de precipitação com antissolvente é efetivo na preparação de micropartículas de drogas insuficientemente solúveis em água. Estas contribuições poderiam expandir o potencial terapêutico de outras drogas de baixa solubilidade aquosa.

Palavras-chave: glibenclamida, precipitação com antissolvente, caracterização, taxa de dissolução.

ABSTRACT

COSTA, Camila Stefanne Dias. **Crystallization of the pharmaceutically active agent glibenclamide by the aqueous antisolvent precipitation process.** 2015. 70p. Dissertation (Master Science in Chemical Engineering). Institute of Technology, Department of Chemical Engineering, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropedica, Rio de Janeiro, 2015.

Diabetes mellitus (DM) is a chronic disease characterized by persistent hyperglycemia resulting from insulin resistance and/or deficiency. It is a metabolic disorder with high healthcare impact worldwide because of its chronic complications and high mortality rate. Type II diabetic patients can control their glycemic levels with the use of hypoglycemic drugs. Glibenclamide is a potent oral hypoglycemic drug that has been used in the treatment of DM-II, however, it has low water solubility and slow dissolution rate. In this study, glibenclamide microparticles were produced by the antisolvent precipitation process using water as the antisolvent. The four-factor three-level orthogonal array design $OA_9(3)^4$ proposed by Genichi Taguchi was used to investigate the effect of the following four factors on particle size and morphology: glibenclamide solution concentration [$\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$], antisolvent/solvent volume ratio [A/S], stirring intensity [rpm], and surfactant concentration [% wt/wt]. Crystallized glibenclamide particles were characterized by optical microscopy, X-ray diffraction, and Fourier Transform Infrared Spectroscopy; the dissolution rate was characterized by HPLC. The surfactant concentration had a significant effect on the mean particle diameters of crystallized glibenclamide, followed by drug solution concentration, antisolvent/solvent volume ratio and stirring intensity, and the smaller sizes were observed with $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, A/S 10, 1500 rpm and 0,002 % wt/wt. The results indicate that crystallinity and chemical structure were not changed, however, the morphology and dissolution rate were affected by the factors. The results in this study show that the antisolvent precipitation process is effective in the preparation of microparticles of poorly water-soluble drugs. These contributions could expand the potential for new therapeutic drugs with low dissolution rates.

Keywords: glibenclamide, antisolvent precipitation, characterization, dissolution rate.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura básica das sulfonilureias, sendo R ₁ e R ₂ os radicais a serem substituídos (ASMAL e MARBLE, 1984).....	3
Figura 2: Estrutura química da glibenclamida, onde R ₁ e R ₂ foram substituídos (adaptado da ANVISA, 2010b).....	5
Figura 3: Tensão interfacial <i>versus</i> concentração da molécula anfipática [MA] na solução aquosa (HIEMENZ e RAJAGOPALAN, 1997).....	9
Figura 4: Ponto crítico da mistura binária <i>versus</i> adição do soluto a uma dada concentração (REVERCHON, MARCO e TORINO, 2007).	11
Figura 5: Diagrama da Rápida Expansão de Soluções Supercríticas.	12
Figura 6: Diagrama da unidade experimental da precipitação com antissolvente líquido.....	16
Figura 7: Distribuição de tamanho de partículas em base de número e volume para uma mesma amostra (Fonte: adaptada de Malvern, 2014).	20
Figura 8: Analisador de tamanho de partículas Mastersizer 2000 (Fonte: www.malvern.com.br).	21
Figura 9: Analisador de tamanho de partícula Cilas 1190 acoplado ao microscópio (Fonte: www.cilas.com).	22
Figura 10: Analisador de tamanho de partículas ParticleTrack E25 (Fonte: http://us.mt.com/us/en/home.html).	22
Figura 11: Microscópio ótico (Zeiss) equipado com a câmera AxioCam MRc.....	23
Figura 12: Difratômetro de raios-X MiniFlex II.	24
Figura 13: Espectrômetro VERTEX 70.	24
Figura 14: Haste (homemade) em aço inoxidável com extremidade na forma de pá.....	25
Figura 15: Diâmetro médio de Brouckere [DMB] <i>versus</i> concentração de aditivo [% massa de aditivo/massa de GLIB].	30
Figura 16: Diâmetro médio de partícula de GLIB <i>versus</i> concentração do aditivo TWEEN® 80 [% m/m].....	31
Figura 17: Curva de distribuição de tamanho da GLIB obtida nas condições experimentais 1, 2 e 3.....	31
Figura 18: Variação das porcentagens d ₅₀ e d ₉₀ <i>versus</i> concentração de aditivo [% massa de aditivo/massa de GLIB] nas condições 1, 2 e 3.....	32
Figura 19: Diâmetro médio de Brouckere [DMB] <i>versus</i> concentração da solução de GLIB [mg.mL ⁻¹].	33
Figura 20: Diâmetro médio de Brouckere [DMB] <i>versus</i> razão de volume antissolvente/solvente [A/S].....	33
Figura 21: Diâmetro médio de Brouckere [DMB] <i>versus</i> intensidade de agitação [rpm].	34
Figura 22: Efeito do ultrassom na dispersão de partes aglomeradas da amostra: (a e b): sem ultrassom; (c e d) com ultrassom.	35
Figura 23: Curva de distribuição de tamanho da GLIB original: sem ultrassom [4,333 µm]; com ultrassom [1,969 µm].	35
Figura 24: Número de partículas de GLIB <i>versus</i> tempo.	36
Figura 25: Curva de distribuição de tamanho de partícula da glibenclamida obtida nas condições experimentais 5, 7 e 8.	37

Figura 26: Microfotografias da GLIB: (a) inicial; condições experimentais: (b) 1, (c) 3, (d) 5, (e) 8, (f) 9.	37
Figura 27: Difratoogramas de raios-X da GLIB: (a) inicial; condições experimentais: (b) 3; (c) 9.	38
Figura 28: Espectro de infravermelho da GLIB: (a) inicial; condições experimentais: (b) 3; (c) 9.	39
Figura 29: Curva-padrão da GLIB obtida em CLAE.	39
Figura 30: Cromatograma da GLIB obtido em CLAE.	41
Figura 31: Dissolução de GLIB [%] <i>versus</i> tempo [min] das condições experimentais 1, 3 e 7.	41
Figura 32: Porcentagem de partículas de GLIB com granulometria entre 0,01 e 0,955 μm observados nas condições experimentais 1, 3 e 7.	42

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-químicas da glibenclamida.....	4
Tabela 2: Principais arranjos ortogonais propostos por Genichi Taguchi	14
Tabela 3: Arranjo Ortogonal $OA_8(2)^7$	14
Tabela 4: Arranjo ortogonal $OA_9(3)^4$	17
Tabela 5: Arranjo ortogonal $OA_9(3)^4$	17
Tabela 6: Solubilidade da GLIB.....	28
Tabela 7: Combinações do $OA_9(3)^4$, diâmetro médio de Brouckere $D[4,3]$ e diâmetro médio de Sauter $D[3,2]$	28
Tabela 8: Análise de variância do $OA_9(3)^4$	34
Tabela 9: Resultados das injeções em CLAE.....	40

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Equação de Noyes-Whitney e Nernst.....	5
Equação 2: expressão de Arrhenius adaptada	7
Equação 3: Energia livre de Gibbs (G).....	7
Equação 4: Forma geral do arranjo ortogonal.....	13
Equação 5: Média dos valores medidos para a variável resposta no nível 1 da variável A.....	18
Equação 6: Média dos valores medidos para a variável resposta no nível 2 da variável A.....	18
Equação 7: Média dos valores medidos para a variável resposta no nível 3 da variável A.....	18
Equação 8: Efeito da concentração da solução [mg.mL ⁻¹].....	18
Equação 9: Média dos valores medidos para a variável resposta no nível 1 da variável B.....	18
Equação 10: Média dos valores medidos para a variável resposta no nível 2 da variável B...	18
Equação 11: Média dos valores medidos para a variável resposta no nível 3 da variável B...	18
Equação 12: Efeito da razão de volume antissolvente/solvente.....	19
Equação 13: Média dos valores medidos para a variável resposta no nível 1 da variável C...	19
Equação 14: Média dos valores medidos para a variável resposta no nível 2 da variável C...	19
Equação 15: Média dos valores medidos para a variável resposta no nível 3 da variável C...	19
Equação 16: Efeito da intensidade de agitação [rpm].....	19
Equação 17: Média dos valores medidos para a variável resposta no nível 1 da variável D...	19
Equação 18: Média dos valores medidos para a variável resposta no nível 2 da variável D...	19
Equação 19: Média dos valores medidos para a variável resposta para o nível 3 da variável D	19
Equação 20: Efeito da concentração de TWEEN [®] 90 [% m/m]	19
Equação 21: Equação para o cálculo da taxa de dissolução.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATP: Trifosfato de adenosina;
- CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência;
- DM: Diabetes *mellitus*;
- DM-1: Diabetes *mellitus* do tipo I (insulino-dependente);
- DMB: Diâmetro médio de Brouckere;
- DMG: Diabetes *mellitus* gestacional;
- DM-II: Diabetes *mellitus* do tipo II (não-insulino-dependente);
- DMS: Diâmetro médio de Sauter;
- DRX: Difração de raios-X;
- DTP: Distribuição de tamanho de partículas;
- FSC: Fluido supercrítico;
- GAS: Em inglês, “gas anti-solvent”;
- GLIB: Glibenclamida;
- HAP: Homogeneização de alta pressão;
- HPC: Hidroxipropilcelulose;
- HPLC: Em inglês, “high performance liquid chromatography”;
- HPMC: Hidroxipropilmetilcelulose;
- MA: Molécula anfipática;
- MO: Microscopia ótica;
- OMS: Organização Mundial da Saúde;
- PAL: Precipitação com antissolvente líquido;
- PAS: Precipitação com antissolvente supercrítico;
- PCM: Ponto crítico da mistura;
- RESS: Rápida expansão de soluções supercríticas;
- SAS: Em inglês, “supercritical anti-solvent”;
- SCB: Sistema de Classificação Biofarmacêutico;

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Pâncreas	2
2.2 Diabetes <i>Mellitus</i> (DM).....	2
2.2.1 Tipos de diabetes <i>mellitus</i>	2
2.3 Hipoglicemiantes Orais	3
2.3.1 Sulfonilureias	3
2.3.2 Biguanidas	4
2.4 Absorção.....	4
2.5 Glibenclamida (GLIB)	4
2.6 Taxa de dissolução	5
2.7 Produção de micro e/ou nanopartículas	6
2.7.1 Cristalização.....	6
2.7.1.1 Surfactantes.....	8
2.7.2 Tecnologias “top down”	9
2.7.2.1 Moagem	9
2.7.2.2 Homogeneização de Alta Pressão (HAP)	9
2.7.3 Tecnologias “bottom up”	9
2.7.3.1 Precipitação com Antissolvente Líquido (PAL)	10
2.7.3.2 Precipitação com Antissolvente Supercrítico (PAS).....	10
2.7.3.3 Rápida Expansão de Soluções Supercríticas (RESS).....	12
2.8 Planejamento Experimental.....	12
2.8.1 Método Taguchi.....	13
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1 Materiais	15
3.2 Determinação da Solubilidade.....	15
3.3 Procedimento experimental	16
3.3.1 Precipitação com Antissolvente Líquido (PAL).....	16
3.3.1.1 Planejamento Experimental	17
3.4 Caracterização.....	20
3.4.1 Análise Granulométrica.....	20
3.4.1.1 Efeito do ultrassom.....	21
3.4.1.2 Tempo de exposição ao ultrassom	22
3.4.2 Microscopia Ótica (MO)	23
3.4.3 Difração de raios-X (DRX)	23
3.4.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier.....	24
3.4.5 Teste de dissolução	25
3.4.5.1 Fase móvel	25
3.4.5.2 Tampão fosfato 3,0.....	25
3.4.5.3 Aparelhagem.....	25
3.4.5.4 Tampão fosfato pH 7,3	26
3.4.5.5 Desaeração	26
3.4.5.6 Procedimento	26
3.4.5.7 Curva-padrão.....	27
4.1 Determinação da Solubilidade.....	28
4.2 Precipitação com Antissolvente Líquido (PAL).....	28

4.2.1 Planejamento Experimental	29
4.2.2 Caracterização	35
4.2.2.1 Análise Granulométrica	35
4.2.2.2 Microscopia Ótica	37
4.2.2.3 Difração de raios-X	38
5 – CONCLUSÕES	44
5.1 Sugestões	45
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXO I	56
ANEXO II	66
ANEXO III	68

1 – INTRODUÇÃO

A glibenclamida (GLIB) é um potente hipoglicemiante oral que tem sido utilizado no tratamento do diabetes não-insulino-dependente (ALBU *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2013; PANAGOPOULOU-KAPLANI e MALAMATARIS, 2000; SHAH *et al.*, 2013), se caracteriza por ser um pó branco e inodoro, mas como resultado da sua baixa solubilidade aquosa e alta permeabilidade, está contido na classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutico (REHDER *et al.*, 2012).

A taxa de dissolução é a etapa limitante da absorção de drogas da classe II, tendo em vista que, devido à baixa solubilidade, apenas uma pequena parte da droga se torna disponível para permear a membrana gastrointestinal (SIEPMANN e SIEPMANN, 2013). Então, a solubilidade é uma das principais dificuldades relacionadas ao uso da GLIB (NETO, 2012; PUIGJANER e PROHENS, 2007; REHDER *et al.*, 2012; SHAH *et al.*, 2013; WEI *et al.*, 2008).

Tendo em vista que partículas de tamanho reduzido apresentam maior taxa de dissolução e, conseqüentemente, maior biodisponibilidade oral (ZHAO *et al.*, 2013) e que não foram encontrados estudos anteriores sobre a cristalização da GLIB através da precipitação com antissolvente líquido utilizando etanol como solvente orgânico, as micropartículas de GLIB foram produzidas por meio de tal processo utilizando etanol como solvente e água como antissolvente, tendo como principal objetivo avaliar o efeito dos fatores passíveis de significativa influência no diâmetro médio das partículas cristalizadas, bem como determinar a ordem de influência destes na variável resposta.

Para tal, foi utilizado o design ortogonal proposto por Genichi Taguchi $OA_9(3)^4$ que permite avaliar até quatro fatores com três níveis cada, em apenas nove condições experimentais. As variáveis estudadas foram: concentração da solução [mg.mL^{-1}], razão de volume antissolvente/solvente [A/S], intensidade de agitação [rpm] e concentração de aditivo [% massa de aditivo/massa de GLIB].

Além disso, a solubilidade da glibenclamida em diferentes solventes orgânicos foi determinada e as partículas cristalizadas foram caracterizadas por microscopia ótica, difração de raios-X e espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier.

Também foi determinada a taxa de dissolução das partículas através de cromatografia líquida de alta eficiência, possibilitando verificar em qual condição experimental foram obtidas partículas de maior taxa de dissolução.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pâncreas

O pâncreas é responsável por secretar principalmente insulina e glucagon, os quais atuam em conjunto a fim de manter a concentração glicêmica no sangue em níveis desejados (GUYTON e HALL, 2006).

Basicamente, quando um indivíduo ingere uma refeição rica em carboidratos, o pâncreas secreta insulina a fim de estimular o armazenamento de aproximadamente 60 % da glicose na forma de glicogênio hepático no fígado. Em contrapartida, quando o nível de glicose no sangue cai, o pâncreas secreta o glucagon para estimular a liberação do glicogênio hepático na corrente sanguínea na forma de glicose e, assim, manter o nível glicêmico na faixa desejada (GUYTON e HALL, 2006; NELSON e COX, 2006).

2.2 Diabetes Mellitus (DM)

O diabetes *mellitus*, que significa excreção excessiva de urina doce, é uma doença crônica caracterizada pela constante hiperglicemia sanguínea devido à deficiência na secreção da insulina ou à resistência à ação da mesma e pode estar associada, em longo prazo, a complicações, disfunções e falhas de órgãos, como olhos, rins, cérebro, coração e vasos sanguíneos, já que a glicose não é eficientemente aproveitada pelos tecidos (CHIEN *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2006; YI *et al.*, 2014).

Seu grande impacto na saúde da população deve-se à crescente incidência e altas taxas de mortalidade (LINDNER *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2011).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, os diabéticos são mais de 347 milhões, sendo que mais de 80% destes vivem em países em desenvolvimento. Diante disso, estima-se que até 2030 o número de mortes causadas pelo distúrbio metabólico será duas vezes maior, podendo se tornar a sétima causa de morte em todo o mundo (WHO, 2013a).

Este significativo aumento deve-se ao crescimento e envelhecimento da população, além do sedentarismo e equivocados hábitos alimentares que podem levar ao acúmulo de peso (ARRIETA *et al.*, 2014).

2.2.1 Tipos de diabetes *mellitus*

O DM pode ser classificado em quatro tipos diferentes (NAKATA *et al.*, 2013):

- Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM-1) ou diabetes *mellitus* insulino-dependente;
- Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM-2) ou diabetes *mellitus* não-insulino-dependente;
- Tipos específicos de diabetes *mellitus*;
- Diabetes *mellitus* gestacional (DMG);

Entretanto, as principais incidências da doença ocorrem nas formas DM-1 e DM-2 (BAPTISTA, 2005).

O DM-1 que também é conhecido como DM insulino-dependente é mais comum entre crianças e adolescentes, mas pode ocorrer em qualquer faixa etária, representando de 5 a 10% de todos os casos de DM (ADA, 2004; SANTOS, 2006); o tratamento é feito, principalmente, por injeções diárias de insulina por toda a vida, juntamente a um controle cuidadoso do equilíbrio entre a ingestão de glicose e a dose diária de hormônio (NELSON e COX, 2006; WHO, 2013a).

O DM-2 ou DM não-insulino-dependente representa cerca de 90 a 95% dos indivíduos com diabetes; o tratamento é feito através de mudanças no estilo de vida, incluindo uma alimentação saudável acoplada a exercícios físicos, podendo estar associados ao uso de hipoglicemiantes orais (ARAÚJO, BRITTO e CRUZ, 2000; BAPTISTA, 2005; LAUTATZIS, GOULIS e VRONTAKIS, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2006; SANTOS, 2007).

2.3 Hipoglicemiantes Oraís

Desde que o DM se tornou uma das maiores preocupações relacionadas à saúde pública mundial, as pesquisas voltadas aos medicamentos hipoglicêmicos tem sido realizadas com o intuito de desenvolver medicamentos mais seguros e eficazes (YU *et al.*, 2011), já que os antidiabéticos orais são drogas utilizadas no tratamento do diabetes não-insulino-dependente em casos onde a dieta e atividades físicas não são suficientes para controlar o nível glicêmico (LAUTATZIS, GOULIS e VRONTAKIS, 2013; MARTINS *et al.*, 2007; WHO, 2013a).

Os principais grupos são compostos pelas biguanidas e sulfonilureias, sendo que estas agem estimulando a liberação de insulina pelas células β (JIANG, WU e WANG, 2007; YAMATO *et al.*, 1993) e as biguanidas, que possuem menor atividade hipoglicemiante, agem estimulando a sensibilidade das células-alvos (ZACARELLI, 1987).

2.3.1 Sulfonilureias

Estas são medicamentos amplamente utilizados no tratamento do DM-2, pois estimulam a secreção de insulina (KIMMEL e INZUCCHI, 2005), reduzem os níveis sanguíneos de glucagon e aumentam a sensibilidade das células-alvos à ação do hormônio. Entretanto, estimular a liberação de insulina pelas células β é o principal objetivo da utilização de tais hipoglicemiantes orais (SAGREIRA, 1989; SARKAR *et al.*, 2011).

A estrutura destes antidiabéticos é essencial para definir sua atividade hipoglicemiante, sendo que todos eles são formados por uma estrutura básica (Figura 1), na qual dois radicais são substituídos a fim de se obter diferentes compostos, assim como suas respectivas características, tais como potência, metabolismo, excreção, entre outras (ASMAL e MARBLE, 1984).

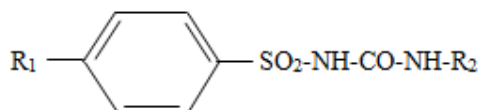


Figura 1: Estrutura básica das sulfonilureias, sendo R_1 e R_2 os radicais a serem substituídos (ASMAL e MARBLE, 1984).

De acordo com a estrutura química, esta classe de fármacos pode ser dividida em dois grupos ou duas gerações (BAPTISTA, 2005). As drogas da primeira geração, como a tolbutamida e a clorpropamida, por serem menos potentes, são administradas em maiores doses. Já os antidiabéticos de segunda geração, como a glibenclamida e glipizida, os quais são consideravelmente mais potentes, são utilizados em menores doses (GALDOS, 2012; ZACARELLI, 1987). Entretanto, a idade do paciente, assim como a tolerabilidade e resposta à medicação são relevantes para a definição do hipoglicemiante correto (ARAÚJO, BRITTO e CRUZ, 2000; SARKAR *et al.*, 2011).

As sulfonilureias agem estimulando a secreção de insulina e, portanto, não são eficientes para pacientes diagnosticados com DM-1 e diabéticos não-insulino-dependentes

que não possuem o pâncreas, uma vez que é necessária certa capacidade excretora de insulina para que estes agentes sejam eficazes (DICKMAN e LEVITSKY, 2005).

De acordo com Filho (2011), as sulfonilureias são bem toleradas apresentando alguns efeitos colaterais, como aumento de peso e distúrbios gastrointestinais, porém são rapidamente absorvidas pelo trato intestinal.

2.3.2 Biguanidas

Estes antidiabéticos possuem efeito hipoglicemiante bem menos intenso do que as sulfonilureias, sendo que sua ação não está diretamente ligada à presença das células β , tendo em vista que atuam reduzindo a produção de glicose hepática e aumentando a sensibilidade à insulina das células-alvos presentes nos tecidos muscular e adiposo (GALDOS, 2012; KIMMEL e INZUCCHI, 2005).

2.4 Absorção

Dentre as diversas formas utilizadas para administrar medicamentos, a dosagem oral é a mais simples e comum (CHILLISTONE e HARDMAN, 2011). Entretanto, a absorção de medicamentos administrados oralmente ocorre em duas etapas: a dissolução seguida pela permeação da mesma na membrana gastrointestinal (SETHIA e SQUILLANTE, 2003; YUKSEL, KANIK e BAYKARA, 2000).

Assim, tais características podem fazer com que a droga apresente baixa ou alta biodisponibilidade oral, sendo esta definida como a proporção do medicamento ministrado que entra na circulação sistêmica comparada com a mesma dose ministrada intravenosamente, já que esta não necessita de absorção (CHILLISTONE e HARDMAN, 2011).

2.5 Glibenclamida (GLIB)

A GLIB ou gliburida, como é conhecida na América do Norte, é um potente hipoglicemiante oral que tem sido amplamente utilizado no tratamento do diabetes *mellitus* não insulino-dependente (ALBU *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2013; PANAGOPOULOU-KAPLANI e MALAMATARIS, 2000; SHAH *et al.*, 2013; TILLER *et al.*, 1998), cujas propriedades físico-químicas estão descritas na Tabela 1, abaixo:

Tabela 1: Propriedades físico-químicas da glibenclamida

Propriedades	
Nome químico	5-cloro-N-[2-[4-[[[(cicloexilamino)carbonil]amino]sulfonil]fenil]etil]-2-metoxibenzamida
Fórmula molecular	C ₂₃ H ₂₈ ClN ₃ O ₅ S
Peso molecular	494 g/mol
Características físicas	Pó cristalino, branco ou quase branco, inodoro ou quase inodoro.
Faixa de fusão	169°C a 174°C

Fonte: ANVISA, 2010b.

Como dito anteriormente, a estrutura química deste antidiabético é formada a partir de uma estrutura básica e dois radicais substituíveis. Diante disso, pode-se obter a seguinte estrutura química (Figura 2):

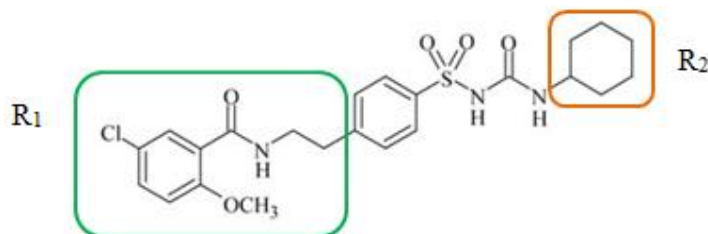


Figura 2: Estrutura química da glibenclamida, onde R₁ e R₂ foram substituídos (adaptado da ANVISA, 2010b).

Tal fármaco, que está presente na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde (LINDENBERG, KOPP e DRESSMAN, 2004; WHO, 2013b), é administrado por via oral, geralmente por dose única, sendo que diferentes doses podem ser necessárias de acordo com a forma com que o antidiabético é comercializado. Os picos de concentração plasmática também sofrem alteração, podendo ocorrer dentro de 2 a 4 horas (BAPTISTA, 2005).

Entretanto, a solubilidade é um dos principais obstáculos relacionados ao uso da GLIB, já que ela está contida na classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutico (NETO, 2012; PUIGJANER e PROHENS, 2007; REHDER *et al.*, 2012; SHAH *et al.*, 2013; WEI *et al.*, 2008), na qual estão contidas as drogas de baixa solubilidade e alta permeabilidade (AMIDON *et al.*, 1995).

O Sistema de Classificação Biofarmacêutico é uma importante ferramenta no desenvolvimento de medicamentos, tendo em vista que classifica as substâncias baseando-se nos critérios de solubilidade e permeabilidade intestinal, os quais são a chave para controlar a absorção dos fármacos (AMIDON *et al.*, 1995; BREDA *et al.*, 2009; DRESSMAN *et al.*, 2001; PAPADOPOULOU *et al.*, 2008; PARAISO, 2012).

2.6 Taxa de dissolução

De acordo com Hattori, Haruna e Otsuka (2013), a taxa de dissolução de uma substância é definida como a variação na concentração da droga dissolvida em um intervalo de tempo e pode ser expressa pela equação de Noyes-Whitney e Nernst (Equação 1):

$$\frac{dC}{dt} = \frac{AD(C_s - C)}{hV}, \quad (1)$$

onde,

dC/dt: taxa de dissolução;

A: área superficial;

h: espessura da camada de difusão;

D: coeficiente de difusão da droga nesta camada;

C_s: solubilidade de saturação da droga no meio de dissolução;

C: concentração da droga no meio de dissolução no tempo t;

V: volume do meio de dissolução;

Diante disso, pode-se observar que a taxa de dissolução é proporcional à área superficial e pode ser melhorada através do aumento da mesma que está disponível para dissolução (KESISOGLOU, PANMAI e WU, 2007; LI *et al.*, 2007; SALAZAR *et al.*, 2012).

Além disso, de acordo com Abd Elbary, Salem e Maher (2011), modificações na morfologia e na cristalinidade das partículas também contribuem para a melhoria da solubilidade de fármacos.

Sabendo que partículas de tamanho reduzido tem maior A e, conseqüentemente, maior taxa de dissolução, diversas técnicas tem sido comumente utilizadas na indústria farmacêutica a fim de atingir tal objetivo (CHATTOPADHYAY e GUPTA, 2001; RASENACK, STECKEL e MÜLLER, 2004; TÜRK *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2013).

2.7 Produção de micro e/ou nanopartículas

A administração de drogas na faixa micro e/ou nanométrica é uma opção efetiva para melhorar a taxa de dissolução e a biodisponibilidade de substâncias insuficientemente solúveis em água (RASENACK, HARTENHAUER e MÜLLER, 2003; VANDANA *et al.*, 2013).

Na indústria farmacêutica, a produção de micro e/ou nanopartículas pode ser feita por meio de tecnologias conhecidas como “top down” e “bottom up” (EERDENBRUGH, MOOTER e AUGUSTIJNS, 2008; KECK e MÜLLER, 2006; VERMA, GOKHALE e BURGESS, 2009).

Dentre as primeiras, pode-se destacar a moagem (MÜLLER, JACOBS e KAYSER, 2001) e homogeneização de alta pressão (KRAUSER e MÜLLER, 2001). Enquanto precipitação com antissolvente, rápida expansão de soluções supercríticas, entre outras, constituem as “bottom up” e baseiam-se na precipitação controlada de partículas previamente dissolvidas (DONG *et al.*, 2010; KECK e MÜLLER, 2006).

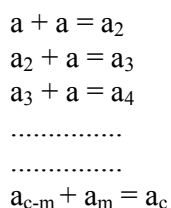
2.7.1 Cristalização

A cristalização é o processo de formação de cristais, que envolve as etapas de nucleação e crescimento, sendo necessária uma solução supersaturada para que o processo ocorra (LIFSHITZ e SLYOZON, 1961).

Sabe-se que o tamanho e a distribuição de tamanho dos cristais formados são controlados pela relação entre o grau de nucleação e o crescimento dos cristais, portanto este é um aspecto crucial para o processo (MYERSON e GINDE, 1993).

Na primeira etapa, as moléculas do soluto que estão dispersas no solvente começam a se unir, formando pequenos núcleos (“clusters”) em escala nanométrica. Entretanto, estes só se tornam estáveis ao atingirem um tamanho crítico, ou seja, os menores “clusters” dissolvem, enquanto os maiores crescem até atingirem o tamanho crítico (SAIFEE *et al.*, 2009).

De acordo com a Teoria Clássica da Nucleação, um “cluster” estável é obtido pelo mecanismo de adição que está representado a seguir (MULLIN, 2001).



Vale ressaltar que o processo permanece contínuo até o tamanho crítico (a_c) ser atingido.

Além disso, “clusters” maiores que o tamanho crítico possuem menor energia livre na superfície, sendo que esta tende a zero com o crescimento do raio da partícula.

A taxa de nucleação (B_0) é o número de núcleos formados por unidade de tempo por unidade de volume. A formação de uma suspensão com partículas pequenas requer uma alta taxa de nucleação com uma menor taxa de crescimento, sendo que ambas dependem do nível de saturação descrito pela expressão de Arrhenius (Equação 2) adaptada (MYERSON e GINDE, 1993; RABINOW, 2004).

$$B_0 = A \exp \left[- \frac{16 \pi \gamma^3 V_m^2}{3K^3 T^3 (\ln S)^2} \right], \quad (2)$$

onde,

B_0 : taxa de nucleação;

A: fator pré-exponencial e tem valor teórico de 10^{30} núcleo/cm³s;

γ : tensão interfacial;

V_m : volume molecular;

S – supersaturação;

T – temperatura;

Fica claro que B_0 aumenta com o aumento da saturação e reduz com o aumento da energia de superfície (MYERSON e GINDE, 1993), sendo este um termo frequentemente utilizado para se referir à tensão interfacial (MULLIN, 2001).

Outro fator importante é a presença de impurezas, pois estas agem como catalisadores, promovendo a nucleação com menor grau de saturação e, conseqüentemente, menor B_0 . Além disso, a forma dos cristais também pode ser fortemente influenciada pelas mesmas (MEENAN, ANDERSON e KLUG, 2001).

A estrutura interna da partícula também é definida durante a etapa de nucleação, ou seja, partículas cristalinas ou amorfas podem ser formadas dependendo das condições de operação (PETHRICK, 2014).

Já o crescimento dos cristais ocorre quando os “clusters” atingem o tamanho crítico, sendo que esta etapa é, frequentemente, descrita como a variação do tamanho da partícula com o tempo (SAIFEE *et al.*, 2009).

Partículas hidrofóbicas dispersas em um meio hidrofílico formam uma nanosuspensão. Entretanto, uma maior área de superfície acoplada ao tamanho reduzido das partículas aumenta a energia livre, tornando o sistema termodinamicamente instável. Para reduzir a energia livre do sistema, as nanopartículas tendem a reduzir sua interação com o meio através de aglomeração ou crescimento do cristal (EERDENBRUGH *et al.*, 2008; VERMA *et al.*, 2011).

Esta variação na distribuição do tamanho das partículas (DTP) está diretamente relacionada ao efeito de “Ostwald ripening”, uma vez que este ocorre em resposta à tentativa do sistema de reduzir a energia livre de Gibbs (G). O processo pode ser observado na Equação 3 (MYERSON e GINDE, 1993).

$$dG = -SdT - VdP + \sum \mu_i dn_i + \gamma_s dA, \quad (3)$$

onde,

G: energia livre de Gibbs;

S: entropia;

T: temperatura;

V: volume;

μ_i : potencial químico das espécies;

γ_s : tensão interfacial entre a superfície da partícula sólida e o meio;

A: área superficial;

Na prática, partículas de tamanhos diferentes possuem solubilidades diferentes quando estão presentes em uma suspensão, resultando na dissolução das partículas menores e no subsequente depósito nas maiores. Assim, o sistema reduz a área de superfície e atinge um estado de menor energia livre de Gibbs (YAO *et al.*, 1993).

A fim de minimizar este efeito, frequentemente utilizam-se aditivos externos que podem inibir o crescimento dos cristais (KIM, KIM e YEO, 2014; SALAZAR, MÜLLER e MÖSCHWITZER, 2013).

Estes aditivos, também chamados de estabilizadores, podem ser surfactantes, polímeros ou uma mistura dos dois. Tween 80 e Poloxamer 188 são exemplos de surfactantes, enquanto hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e hidroxipropilcelulose (HPC) constituem exemplos de estabilizadores poliméricos (VERMA *et al.*, 2011).

2.7.1.1 Surfactantes

Os surfactantes são moléculas anfipáticas (MA) que possuem uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica. Tais moléculas possuem a fórmula geral RX, onde R representa uma cadeia de átomos de carbono e X, que é um grupo polar, pode ser iônico ou não iônico (CAROLEI, 2005).

Surfactantes adsorvem na superfície de forma a reduzir a energia livre do sistema, promovendo a estabilização eletrostática (iônicos) ou estérica, através dos não iônicos (SOARES, 2009; VERMA, HUEY e BURGESS, 2009).

Grupos não iônicos são amplamente utilizados para obter nanosuspensões termodinamicamente estáveis e possuem grupos polioxetilênicos – $(C_2H_4O)_n$ –, onde n pode variar de 3 ou 4 para 20 ou mais (KUNDU *et al.*, 2013; HIEMENZ e RAJAGOPALAN, 1997).

Na estabilização estérica, as moléculas anfipáticas neutras adsorvem na superfície das partículas hidrofóbicas, formando uma barreira capaz de evitar a aproximação e subsequente aglomeração (EERDENBRUGH, MOOTER e AUGUSTIJNS, 2008; RABINOW, 2004).

Entretanto, a concentração de surfactante na solução aquosa reduz a tensão interfacial somente até certo ponto (Figura 3).

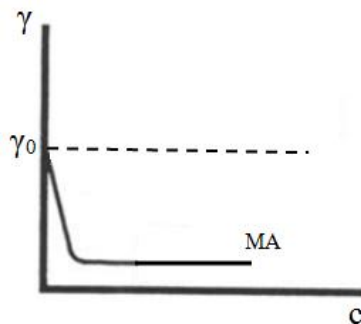


Figura 3: Tensão interfacial *versus* concentração da molécula anfipática [MA] na solução aquosa (HIEMENZ e RAJAGOPALAN, 1997).

Nota-se que a curva da tensão interfacial se torna constante a partir de determinada concentração, ou seja, não exerce mais influência no controle de crescimento do cristal (SCHRAMM, STAIUK e MARANGONI, 2003).

2.7.2 Tecnologias “top down”

Estas são assim chamadas, pois constituem processos onde os cristais iniciais sofrem uma redução de tamanho por ruptura, ou seja, as partículas chocam-se umas com as outras ou até mesmo com outro material e se “quebram” em cristais menores (KECK e MÜLLER, 2006).

Recomenda-se a utilização de drogas previamente micronizadas a fim de reduzir o tempo do processo e evitar o entupimento do equipamento (SALAZAR *et al.*, 2012).

2.7.2.1 Moagem

Nesta técnica, basicamente, a macrossuspensão da droga é colocada na câmara de moagem já preenchida por esferas de vidro ou polímeros especiais, tais como poliestireno e derivados. As esferas são movidas por um misturador e a droga, que está entre as esferas, é moída (HEZAVE, AFTAB e ESMAEILZADEH, 2010; KECK e MÜLLER, 2006).

A moagem é amplamente utilizada na indústria farmacêutica, mas apresenta algumas desvantagens, como ampla distribuição de tamanho (ZHANG *et al.*, 2006; MIDOUX *et al.*, 1999). Outra desvantagem é a possível contaminação da droga pela degradação do material das esferas (KECK e MÜLLER, 2006).

2.7.2.2 Homogeneização de Alta Pressão (HAP)

Nesta tecnologia, a droga é dispersa em uma solução aquosa com ou sem surfactante e a macrossuspensão resultante é acelerada e conduzida a passar por uma câmara de homogeneização a alta pressão onde as partículas se chocam e reduzem seu tamanho (KECK e MÜLLER, 2006; MÜLLER, JACOBS e KAYSER, 2001).

2.7.3 Tecnologias “bottom up”

Estes processos partem de partículas previamente dissolvidas e promovem a precipitação das mesmas através da adição de um antissolvente ou expandindo rapidamente a solução (KECK e MÜLLER, 2006; VERMA, GOKHALE e BURGESS, 2009).

2.7.3.1 Precipitação com Antissolvente Líquido (PAL)

É uma tecnologia amplamente utilizada para produzir micropartículas quando a substância é moderadamente solúvel em um solvente orgânico em particular. O método apresenta algumas vantagens, como ser de baixo custo, rápido, direto e de fácil implementação industrial, além de não envolver etapas de aquecimento ou resfriamento (BOUTIN, PETIT-GAS e BADENS, 2009; KIM, KIM e YEO, 2014; ZHAO *et al.*, 2013).

Na precipitação com antissolvente líquido, a droga é dissolvida no solvente orgânico e a solução formada entra em contato com o antissolvente, geralmente em condições ambientes, fazendo com que a precipitação ocorra imediatamente (LI *et al.*, 2007).

O antissolvente reduz a solubilidade do soluto no solvente, podendo causar uma rápida supersaturação, que funciona como força motriz da cristalização (DONG *et al.*, 2010; ROSSMANN *et al.*, 2013).

Diversos fatores podem interferir na eficiência do processo, sendo eles a concentração da solução da droga, a razão antissolvente/solvente, a intensidade de agitação, tempo de precipitação e a concentração de aditivo (WEY e KARPINSKI, 2001; ZHAO *et al.*, 2013).

Além disso, o processo possui limitações e dificuldades no controle do crescimento e na retirada de solvente da superfície das partículas formadas (CHATTOPADHYAY e GUPTA, 2001).

Vale ressaltar que uma mistura rápida e homogênea entre o solvente e o antissolvente é crucial para produzir micro e/ou nanopartículas, uma vez que promove maior contato entre as partes, favorecendo a supersaturação (DONG *et al.*, 2010).

2.7.3.2 Precipitação com Antissolvente Supercrítico (PAS)

A Precipitação com Antissolvente Supercrítico utiliza o mesmo princípio da PAL, tendo em vista que a droga precipita devido à supersaturação da solução causada pelo antissolvente. Entretanto, na PAS se utiliza o antissolvente nas condições supercríticas, tendo em vista a baixa solubilidade de farmacêuticos no mesmo (PARK *et al.*, 2014; REVERCHON, MARCO e TORINO, 2007).

A PAS tem sido utilizada com várias siglas, entretanto, o processo é substancialmente o mesmo, diferindo-se apenas no modo de operação: batelada (GAS, em inglês “gas anti-solvent”) e semicontínuo (SAS, em inglês “supercritical anti-solvent”). (REVERCHON e ADAMI, 2006)

No GAS, a solução contendo a droga é previamente colocada na câmara de precipitação e a adição do fluido supercrítico (FSC) é feita gradualmente até atingir a pressão desejada (DEHGHANI e FOSTER, 2003).

Já no SAS, a solução da droga e o fluido supercrítico são injetados simultaneamente na câmara de precipitação, onde pressão e temperatura são controlados (MORIBE, TOZUKA e YAMAMOTO, 2008).

Em ambos os casos, depois de certo tempo, as partículas precipitadas são “lavadas” pela passagem de FSC em condições isobáricas para retirada de solvente da superfície das mesmas. Assim, a PAS dispensa etapas adicionais para retirada de solvente residual (CHATTOPADHYAY e GUPTA, 2001; DEHGHANI e FOSTER, 2003; KIM, KIM e YEO, 2014).

Sabe-se que as características do FSC são extremamente sensíveis às alterações na pressão e temperatura, portanto é de suma importância que a etapa de “lavagem” seja feita isobaricamente para evitar alterações na densidade do fluido (SOARES, 2010).

Ao final do processo, restam apenas as partículas produzidas na câmara de precipitação, podendo ser amorfas ou cristalinas (PARK e YEO, 2008; REVERCHON, MARCO e TORINO, 2007).

A alta difusividade e densidade do FSC promovem uma supersaturação extremamente rápida e, conseqüentemente, a produção de partículas em escala nanométrica. Diante disso, é possível controlar o tamanho, a distribuição do tamanho e morfologia das partículas formadas (DEHGHANI e FOSTER, 2003).

Vale ressaltar que a supersaturação ocorre em resposta à redução da solubilidade da substância na solução causada pela expansão volumétrica da fase líquida (PARK e YEO, 2008).

A expansão volumétrica da fase líquida provocada pela difusão do FSC na solução causa a redução do poder de solvatação do solvente orgânico, proporcionando a precipitação do soluto em questão (FUENTE BADILLA, PETERS e SWAAN ARONS, 2000).

Tal alteração na solubilidade está diretamente relacionada à miscibilidade do solvente e do antissolvente e das condições operacionais. Portanto, em ambos os casos, o solvente orgânico e o FSC devem ser totalmente miscíveis nas condições de operação (REVERCHON e ADAMI, 2006).

Diante disso, a injeção é feita pelo fundo do precipitador, a fim de promover uma maior e mais eficiente mistura entre o solvente e o antissolvente (JUNG e PERRUT, 2001).

De acordo com Reverchon, Marco e Torino (2007), a total miscibilidade entre o solvente e o fluido supercrítico é alcançada acima do ponto crítico da mistura (PCM) binária (solvente + FSC), entretanto, a presença do soluto altera PCM da mistura. Tal alteração pode ser vista na Figura 4:

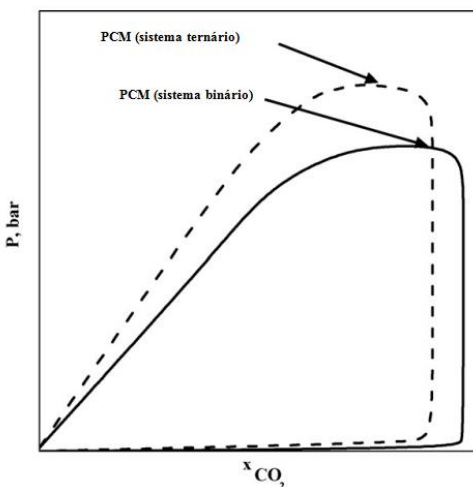


Figura 4: Ponto crítico da mistura binária *versus* adição do soluto a uma dada concentração (REVERCHON, MARCO e TORINO, 2007).

Dados de equilíbrio líquido-vapor de sistemas deste tipo são dificilmente encontrados. Diante disso, é aconselhável selecionar pressões relativamente maiores que o ponto crítico do sistema binário (solvente + FSC) para evitar que o processo ocorra sob condições subcríticas (REVERCHON e ADAMI, 2006).

Assim, aconselha-se a trabalhar com pressões entre 120 e 180 bar e temperaturas entre 35 e 60°C (REVERCHON, MARCO e TORINO, 2007).

Entretanto, a grande quantidade de parâmetros passíveis de significativa influência no processo, como concentração da solução, pressão, temperatura, taxa de injeção do FSC, concentração de aditivo, miscibilidade do solvente e do FSC, tornam difícil a otimização do sistema (ERRIGUIBLE, FADLI e SUBRA-PATERNAULT, 2013).

2.7.3.3 Rápida Expansão de Soluções Supercríticas (RESS)

Nesta técnica, a precipitação da droga é resultado de uma rápida despressurização do fluido supercrítico que ocorre quando o mesmo passa por uma região de estrangulamento da linha antes de entrar na região de menor pressão, reduzindo, repentinamente, a solubilidade da substância (SANE e LIMTRAKUL, 2009; THAKUR e GUPTA, 2006; WEBER e THIES, 2007). Uma visão geral do processo está apresentada pela Figura 5, a seguir:

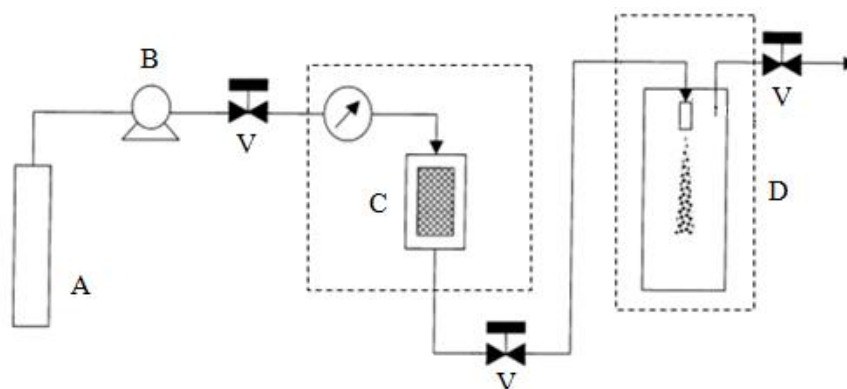


Figura 5: Diagrama da Rápida Expansão de Soluções Supercríticas: (A) cilindro de CO₂; (B) bomba de alta pressão; (C) extrator; (D) precipitador; (V) válvulas (Fonte: adaptado de JUNG e PERRUT, 2001).

Basicamente, o dióxido de carbono é bombeado e aquecido até atingir a pressão e temperatura desejadas e, em seguida, o FSC é bombeado para a unidade de extração onde se encontra a droga a ser solubilizada. Na unidade de precipitação, a solução formada (FSC + droga) é expandida ao passar por um estrangulamento reduzindo a densidade e, conseqüentemente, o poder de solvatação do FSC, resultando na rápida precipitação da droga (JUNG e PERRUT, 2001; WEBER e THIES, 2007).

A ausência de solvente residual torna o método atrativo, já que não é necessário dissolver a droga em solventes orgânicos. Diante disso, a tecnologia de RESS é muito utilizada para produzir partículas micro e/ou nanométricas, entretanto é amplamente limitada devido à baixa solubilidade de muitos sólidos no CO₂ supercrítico (GUAN *et al.*, 2013; WANG e LIN, 2014).

2.8 Planejamento Experimental

O tamanho, a distribuição do tamanho e a morfologia das partículas formadas dependem de muitos parâmetros e, para que se possa identificar e quantificar o efeito destas variáveis, a utilização do planejamento experimental é de suma importância para o controle e otimização de processos (RODRIGUES e LEMMA, 2009).

A primeira etapa do planejamento experimental é definir quais são os fatores a serem estudados, a variável resposta e o objetivo a ser alcançado para que a escolha do planejamento

seja feita adequadamente, tendo em vista que diferentes objetivos demandam diferentes planejamentos (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2001).

A técnica (do inglês, “one-factor-at-a-time”) que varia um fator por vez, mantendo-se os demais constantes é extremamente utilizada, sendo que ao final de todos os experimentos é possível visualizar como a variável resposta é afetada. Entretanto, o fato de demandar muito tempo e recursos consistem suas principais desvantagens (MONTGOMERY, 2001).

Planejamentos fatoriais são muito utilizados quando se deseja avaliar o efeito de um ou mais fatores na variável resposta, sendo que nestes, os parâmetros e os respectivos níveis nos quais serão estudados variam simultaneamente (CATEN, 1995).

Vale ressaltar que os planejamentos fatoriais são ditos completos quando todas as combinações possíveis entre fatores e níveis são executadas durante a fase experimental. Geralmente, se existem k fatores, são necessárias 2^k combinações, podendo aumentar com o aumento do número de fatores. (MONTGOMERY, 2001).

Quando o número de parâmetros é igual ou superior a quatro, pode ser conveniente iniciar por um planejamento fatorial fracionado, no qual apenas uma fração do fatorial completo é utilizada, reduzindo tempo e custo final e possibilitando detectar a melhor condição experimental, sem redução da acurácia dos experimentos (RODRIGUES e LEMMA, 2009).

Entretanto, pode exigir que o pesquisador colete informações na literatura, a fim de entender melhor o comportamento das variáveis envolvidas e definir os melhores níveis a serem utilizados nos experimentos (BONDUELLE, 2000).

2.8.1 Método Taguchi

Envolvido com problemas no controle de qualidade da indústria japonesa, o engenheiro e estatístico Genichi Taguchi propôs um novo método comumente conhecido como Método Taguchi, sendo este um planejamento fatorial fracionado (NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2001; ROY, 2010).

Taguchi observou que 85% da perda de qualidade podem ser atribuídos ao processo de produção, enquanto apenas 15% estão relacionados a fatores externos ou incontroláveis (ROY, 2010).

Assim, Taguchi desenvolveu sistemas de produção que fossem robustos ou insensíveis a estas variações, ou seja, a ideia principal do planejamento se concentra em reduzir ao máximo o efeito destes parâmetros sobre a variável resposta (HEDAYAT, SLOANE e STUFKEN, 1999).

Para tal, o engenheiro desenvolveu tabelas especiais conhecidas como arranjos ortogonais, que possuem forma geral representada pela Equação 4 (ROY, 2010):

$$OA_a(b)^c, \quad (4)$$

onde,

OA: arranjo ortogonal;

a: número de experimentos;

b: número de níveis de cada fator;

c: número máximo de variáveis que podem ser avaliadas;

Taguchi fornece diversas matrizes ortogonais, sendo que a escolha adequada deve ser feita baseando-se na quantidade de níveis e fatores a serem avaliados (MOITA, 2007). As principais matrizes podem ser observadas na Tabela 2:

Tabela 2: Principais arranjos ortogonais propostos por Genichi Taguchi

Arranjo Ortogonal	Número de experimentos	Número máximo de fatores	Máximo número de variáveis			
			2 níveis	3 níveis	4 níveis	5 níveis
OA ₄	4	3	3	-	-	-
OA ₈	8	7	7	-	-	-
OA ₉	9	4	-	4	-	-
OA ₁₂	12	11	11	-	-	-
OA ₁₆	16	15	15	-	-	-
OA' ₁₆	16	5	-	-	5	-
OA ₁₈	18	8	1	7	-	-
OA ₂₅	25	6	-	-	-	6
OA ₂₇	27	13	-	13	-	-
OA ₃₂	32	31	31	-	-	-
OA' ₃₂	32	10	1	-	9	-

Um arranjo para sete fatores com dois níveis cada está disposto na Tabela 3:

Tabela 3: Arranjo Ortogonal OA₈(2)⁷

Fator/Nível	A	B	C	D	E	F	G
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	2	2	2	2
3	1	2	2	1	1	2	2
4	1	2	2	2	2	1	1
5	2	1	2	1	2	1	2
6	2	1	2	2	1	2	1
7	2	2	1	1	2	2	1
8	2	2	1	2	1	1	2

O arranjo possui oito linhas e sete colunas. Cada linha representa uma condição experimental com os níveis dos fatores sendo indicados pelos números (1 e 2), enquanto as colunas correspondem aos parâmetros (MOITA, 2007).

Pode-se observar que todas as colunas possuem igual número de níveis e, ao comparar duas colunas quaisquer, percebe-se igual número das combinações (1,1), (1,2), (2,1) e (2,2). Assim, quando duas colunas de um arranjo formam essas combinações o mesmo número de vezes, as colunas são ditas ortogonais (ROY, 2010).

Uma vez definido o arranjo, bem como os fatores e seus respectivos níveis, o próximo passo consiste na realização dos experimentos conforme estabelecidos pela matriz, podendo ser realizadas algumas repetições (HEDAYAT, SLOANE e STUFKEN, 1999).

A análise dos resultados é feita com o intuito de determinar os fatores significantes e sua influência na variabilidade dos resultados (RODRIGUES e LEMMA, 2009).

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Primeiramente, foi feita a determinação da solubilidade da glibenclamida nos diferentes solventes orgânicos etanol, metanol, acetona e isopropanol.

A cristalização da GLIB foi feita por meio da precipitação com antissolvente líquido, utilizando etanol como solvente e água como antissolvente. A malha experimental foi determinada de acordo com o arranjo ortogonal $OA_9(3)^4$ que possibilita avaliar até quatro fatores com três níveis cada em apenas nove experimentos.

As variáveis estudadas foram concentração da solução, razão de volume antissolvente/solvente, intensidade de agitação e concentração de TWEEN[®] 80.

Posteriormente, foi feita a caracterização das partículas obtidas através de análise granulométrica, microscopia ótica, difração de raios-X, espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier, além da determinação da taxa de dissolução por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

O princípio ativo utilizado foi doado pela Fundação para o Remédio Popular (FURP), situada em Guarulhos, São Paulo.

Assim, os materiais e a metodologia utilizados estão dispostos abaixo:

3.1 Materiais

- Glibenclamida (CAS 10238-21-8): doada pela Fundação para o Remédio Popular (FURP) localizada na cidade de Guarulhos, São Paulo;
- Etanol (VETEC, 99,8%);
- Metanol (VETEC, 99,8%);
- Isopropanol (VETEC, 99,5%);
- Acetona (VETEC, 99,8%);
- TWEEN[®] 80 (CAS 9005-65-6): adquirido pela Sigma-Aldrich;
- Acetonitrila UV/HPLC (VETEC, 99,9%);
- Fosfato de potássio monobásico P.A (VETEC);
- Fosfato de sódio dibásico hepta-hidratado P.A (VETEC);
- Fosfato de sódio monobásico mono-hidratado P.A (VETEC);
- Ácido fosfórico P.A (VETEC);

3.2 Determinação da Solubilidade

O processo tem início com a seleção do solvente adequado, tendo em vista que solventes orgânicos são utilizados para dissolver drogas insolúveis em água. Entretanto, propriedades como toxicidade e custo devem ser avaliadas, a fim de obter medicamentos mais seguros e economicamente viáveis (CHENG *et al.*, 2010).

A solubilidade da GLIB ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi determinada nos solventes orgânicos etanol, metanol, acetona e isopropanol. Para tal, cerca de 10 mg da droga foram cuidadosamente pesados em uma balança eletrônica (HR-120, A&D Company) e colocados em um béquer, no qual uma alíquota de 1 ml do solvente foi adicionada com o auxílio de uma pipeta até a completa dissolução da droga. Todo o procedimento foi feito utilizando-se um agitador magnético (Modelo 753A, Fisatom) e repetido no mínimo três vezes (SALAZAR, MÜLLER e MÖSCHWITZER, 2013).

3.3 Procedimento experimental

A partículas de glibenclamida foram cristalizadas por processo de precipitação com antissolvente líquido utilizando nove condições experimentais diferentes.

3.3.1 Precipitação com Antissolvente Líquido (PAL)

O diagrama do processo de precipitação com antissolvente líquido utilizado em laboratório pode ser observado na Figura 6, disposta a seguir:

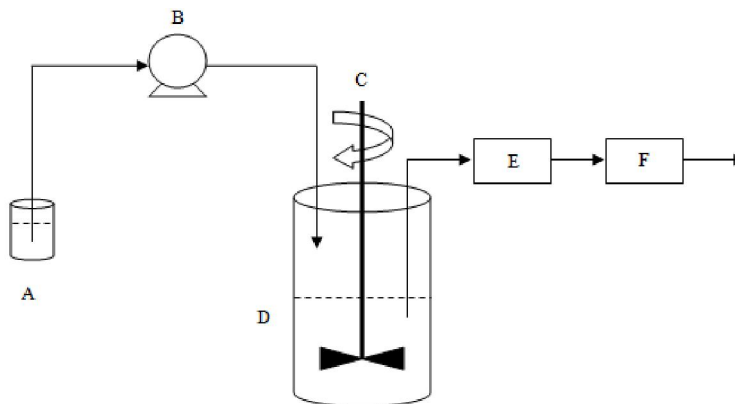


Figura 6: Diagrama da unidade experimental da precipitação com antissolvente líquido: (A) solução da droga; (B) bomba peristáltica; (C) agitador; (D) precipitador; (E) centrífuga; (F) estufa (Fonte: adaptado de ZHAO et al., 2013).

Primeiramente, a droga foi dissolvida no solvente orgânico e a solução resultante foi filtrada através de uma membrana 0,22 μm (Millipore[®]) para retirada de possíveis impurezas. Utilizando uma bomba peristáltica (Mini-S 420, Ismatec) com fluxo de 15 mL.min⁻¹, a solução foi injetada no antissolvente sob agitação (RW 16 basic, IKA[®]), sendo que o mesmo já continha uma quantidade de aditivo TWEEN[®] 80 previamente determinada. Assim, a precipitação ocorreu imediatamente. Passados cinco minutos, a suspensão esbranquiçada foi centrifugada (EBA 12, Hettich Zentrifugen) a 5000 rpm por dez minutos e filtrada logo em seguida. Posteriormente, as partículas obtidas foram secas à 50°C por oito horas (EDG 3P-S 1800) e deixadas no dessecador. A metodologia utilizada foi descrita em Shah *et al.*, (2013).

Devido ao grande número de fatores e experimentos, optou-se por realizar em triplicata apenas as condições experimentais que exibiram maior e menor diâmetro médio de Brouckere.

O tempo de precipitação foi definido com base nos resultados obtidos por Wang *et al.*, (2007), Zhao *et al.*, (2013) e Zhang *et al.*, (2009).

De acordo com Zhao *et al.*, (2013), os menores diâmetros de partículas (5,727 μm) foram obtidos utilizando-se 8 minutos de agitação.

Wang *et al.*, (2007) avaliaram a variação no tamanho das partículas nos tempos de 10 segundos, 1, 2 e 4 minutos e verificaram que quando o tempo de precipitação foi aumentado de 10 segundos para 2 minutos, houve uma drástica redução no tamanho de 4,91 para 1,5 μm , respectivamente. Entretanto, o aumento para 4 minutos não alterou o diâmetro médio das partículas (1,5 μm).

Zhang *et al.*, (2009) utilizaram os tempos de 30 segundos, 10, 30 e 60 minutos e verificaram que as menores partículas foram obtidas com 30 segundos (410nm). Entretanto,

quando o tempo de precipitação foi aumentado para 10 minutos, não houve variação significativa no tamanho (420 nm). Já para os tempos de 30 e 60 minutos, houve um drástico aumento do diâmetro médio de 800 nm para 1200 nm, respectivamente.

Tal fenômeno pode ser explicado pelo crescimento do cristal durante a agitação, ou seja, durante o processo as pequenas partículas formadas colidem e se agregam, causando o crescimento do cristal (ZHANG *et al.*, 2009). Diante disso, optou-se por utilizar o tempo de 5 minutos.

3.3.1.1 Planejamento Experimental

Tendo em vista que o planejamento experimental é utilizado com o intuito de reduzir a malha experimental, Rodrigues e Lemma (2009) afirmam que quando se utiliza um planejamento fatorial fracionado, o número mínimo de experimentos pode ser igual ao número de variáveis mais quatro ensaios.

Sabendo-se que os fatores estudados são concentração da solução da droga [mg.mL^{-1}], razão de volume antissolvente/solvente [A/S], intensidade de agitação [rpm] e concentração de aditivo [% massa de aditivo/massa de GLIB], optou-se pelo arranjo $\text{OA}_9(3)^4$ proposto por Taguchi que permite avaliar até quatro parâmetros com três níveis cada em nove experimentos (Tabela 4) gerados pelo “software” Statistica[®] 10 (USA).

Tabela 4: Arranjo ortogonal $\text{OA}_9(3)^4$

Fator/Nível	A	B	C	D
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

Os níveis de cada fator foram definidos tendo como base a literatura e a realização de alguns experimentos preliminares. Sendo assim, as variáveis estudadas, bem como seus respectivos níveis, estão dispostas na Tabela 5, abaixo:

Tabela 5: Arranjo ortogonal $\text{OA}_9(3)^4$

Fator/Nível	A [mg.mL^{-1}]	B [A/S]	C [rpm]	D [%m/m]
1	0,5	5	300	0,000
2	1,0	10	600	0,001
3	2,0	20	1500	0,002

A – concentração da solução [mg.mL^{-1}];

B – razão de volume antissolvente/solvente;

C – intensidade de agitação;

D – concentração de aditivo [% massa de aditivo/massa de GLIB];

Vale ressaltar que o diâmetro médio de Brouckere ou diâmetro médio D[4,3], como é definido pelo equipamento de análise, foi definido como a variável dependente ou variável resposta e medido em cada experimento. Diante disso, estes valores foram utilizados para determinar o efeito dos fatores na variável resposta e, conseqüentemente, seus respectivos níveis de influência.

O efeito principal de cada fator sobre a variável resposta pode ser definido como a variação observada na mesma pela variação no nível do parâmetro (MONTGOMERY, 2001).

Ainda segundo Montgomery (2001), tal efeito pode ser obtido pela diferença entre a maior e menor média dos valores medidos para a variável resposta nos diferentes níveis de cada fator. Na prática, o cálculo do efeito dos quatro fatores com três níveis cada pode ser observado nas Equações 5 a 20, a seguir:

Efeito (E_A) de A

$$A_1 = \frac{\sum(\text{diâmetro médio das partículas em } A_1)}{3}, \quad (5)$$

$$A_2 = \frac{\sum(\text{diâmetro médio das partículas em } A_2)}{3}, \quad (6)$$

$$A_3 = \frac{\sum(\text{diâmetro médio das partículas em } A_3)}{3}, \quad (7)$$

onde,

A₁ = média dos valores medidos para a variável resposta no nível 1;

A₂ = média dos valores medidos para a variável resposta no nível 2;

A₃ = média dos valores medidos para a variável resposta no nível 3;

Assim, o efeito (E_A) de A pode ser obtido através da Equação 8:

$$E_A = A_{\text{maior}} - A_{\text{menor}} \quad (8)$$

Efeito (E_B) de B

$$B_1 = \frac{\sum(\text{diâmetro médio das partículas em } B_1)}{3}, \quad (9)$$

$$B_2 = \frac{\sum(\text{diâmetro médio das partículas em } B_2)}{3}, \quad (10)$$

$$B_3 = \frac{\sum(\text{diâmetro médio das partículas em } B_3)}{3}, \quad (11)$$

onde,

B₁ = média dos valores medidos para a variável resposta no nível 1;

B₂ = média dos valores medidos para a variável resposta no nível 2;

B₃ = média dos valores medidos para a variável resposta no nível 3;

Assim, o efeito (E_B) de B pode ser obtido através da Equação 12:

$$E_B = B_{\text{maior}} - B_{\text{menor}} \quad (12)$$

Efeito (E_C) de C

$$C_1 = \frac{\sum(\text{diâmetro médio das partículas em } C_1)}{3}, \quad (13)$$

$$C_2 = \frac{\sum(\text{diâmetro médio das partículas em } C_2)}{3}, \quad (14)$$

$$C_3 = \frac{\sum(\text{diâmetro médio das partículas em } C_3)}{3}, \quad (15)$$

onde,

C_1 = média dos valores medidos para a variável resposta no nível 1;
 C_2 = média dos valores medidos para a variável resposta no nível 2;
 C_3 = média dos valores medidos para a variável resposta no nível 3;

Assim, o efeito (E_C) de C pode ser obtido através da Equação 16:

$$E_C = C_{\text{maior}} - C_{\text{menor}} \quad (16)$$

Efeito (E_D) de D

$$D_1 = \frac{\sum(\text{diâmetro médio das partículas em } D_1)}{3}, \quad (17)$$

$$D_2 = \frac{\sum(\text{diâmetro médio das partículas em } D_2)}{3}, \quad (18)$$

$$D_3 = \frac{\sum(\text{diâmetro médio das partículas em } D_3)}{3}, \quad (19)$$

onde,

D_1 = média dos valores medidos para a variável resposta no nível 1;
 D_2 = média dos valores medidos para a variável resposta no nível 2;
 D_3 = média dos valores medidos para a variável resposta no nível 3;

Assim, o efeito (E_D) de D pode ser obtido através da Equação 20:

$$E_D = D_{\text{maior}} - D_{\text{menor}} \quad (20)$$

Diante disso, observa-se que o fator que apresentar o maior valor de E, destaca-se como o parâmetro de maior influência, bem como os níveis que causarem menor alteração na variável resposta constituem a condição mais robusta.

Sobre o conjunto de dados, aplicou-se a análise de variância (ANOVA) para verificar o nível de significância de cada fator na variável resposta, permitindo classificá-lo como mais ou menos significativo, sendo que tal análise estatística foi feita através do “software” Statistica® 10 (USA).

3.4 Caracterização

3.4.1 Análise Granulométrica

A análise granulométrica foi feita com as partículas de GLIB de tamanho inicial, bem como das partículas obtidas pelas nove condições experimentais.

A distribuição de tamanho de partícula (DTP) pode ser representada de diversas maneiras dependendo do princípio de medição utilizado, dentre as quais pode-se citar as distribuições em base de número e volume. A primeira é baseada na análise de imagens e é indicada quando conhecer o número de partículas presentes na amostra é importante. Já na DTP baseada em volume, a intensidade de luz espalhada é proporcional ao volume da partícula, ou seja, partículas de maior volume apresentam maior intensidade na curva de frequência (MALVERN, 2014).

Na Figura 7, é possível visualizar as diferentes distribuições de tamanho de partícula de uma amostra composta por igual número de partículas de diâmetros de 5 e 50 nm (MALVERN, 2014).

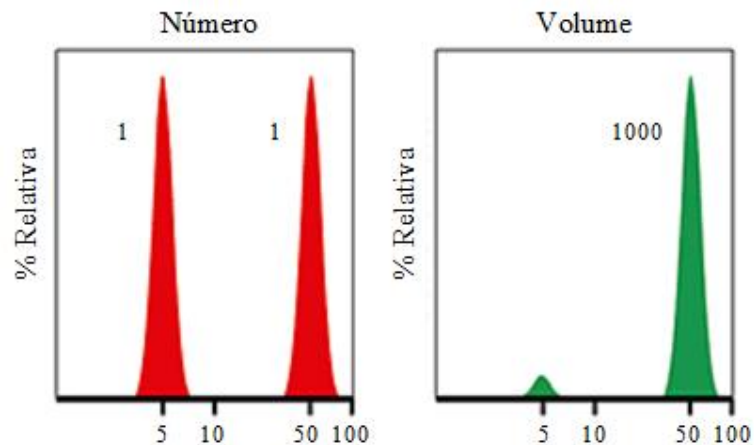


Figura 7: Distribuição de tamanho de partículas em base de número e volume para uma mesma amostra (Fonte: adaptada de Malvern, 2014).

É possível observar que na primeira distribuição as partículas relatam igual contribuição, enquanto na DTP baseada em volume as partículas de maior diâmetro exibem um sinal significativamente maior.

A fim de simplificar a interpretação dos resultados, diversos parâmetros estatísticos podem ser utilizados. Dentre estes, pode-se citar o diâmetro médio da população e as porcentagens d_{10} , d_{50} e d_{90} , as quais representam o diâmetro médio abaixo do qual 10, 50 e 90 % da amostra se encontram, respectivamente. Vale ressaltar que tais porcentagens são frequentemente relatadas para distribuições baseadas em volume (MALVERN, 2014).

O diâmetro médio das partículas presentes na amostra pode ser definido de diferentes maneiras, sendo mais comumente utilizados o diâmetro médio de Brouckere $\{D [4,3]\}$ e o diâmetro médio de Sauter $\{D [3,2]\}$ (MALVERN, 2014).

Em tal estudo, foi utilizada a técnica de espalhamento de luz estático conhecida como difração a laser para determinar a distribuição do tamanho das partículas, sendo esta uma técnica amplamente utilizada em amostras secas ou dispersas em um meio, cuja curva de frequência é baseada em volume (MALVERN, 2014).

A técnica de difração a laser utiliza um feixe de luz que, ao incidir na superfície da partícula sólida, difrata a um ângulo inversamente proporcional ao seu tamanho, permitindo determinar a DTP medindo-se a variação angular na intensidade da luz difratada pela amostra. Esta variação angular é comparada a um valor teórico de difração imposto pela Teoria de Mie, a fim de calcular o diâmetro médio das partículas (FILHO, 2011).

Esta teoria parte do princípio de que todas as partículas são esféricas e indica o tamanho como diâmetro de uma esfera de volume equivalente $\{D [4,3]\}$ (MALVERN, 2014).

O analisador de tamanho de partículas Mastersizer 2000 da Malvern Instruments foi utilizado (Figura 8), sendo que sua faixa granulométrica varia de 0,02 a 2000 μm (MALVERN, 2014).



Figura 8: Analisador de tamanho de partículas Mastersizer 2000 (Fonte: www.malvern.com.br).

Tendo em vista que as análises foram feitas com a amostra dispersa, foi utilizada água como meio dispersante. Seguindo as orientações contidas no manual do equipamento, a amostra foi cuidadosamente adicionada ao meio até a concentração adequada, aguardou-se o tempo de dez minutos para garantir que a amostra pudesse se dispersar completamente e, posteriormente, foram realizadas as medições.

O equipamento se encontra no Laboratório de Escoamento de Fluidos Giulio Massarani, Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (IT/DEQ/UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro, onde as análises foram realizadas.

3.4.1.1 Efeito do ultrassom

O ultrassom foi utilizado em todas as análises, tendo em vista que auxilia na dispersão das partículas, principalmente em partes aglomeradas da amostra e tal efeito foi investigado através do analisador de tamanho de partículas Cilas 1190 (Figura 9), o qual possui uma faixa granulométrica que varia de 0,04 a 2500 μm . Este possui o mesmo princípio de funcionamento do Mastersizer 2000, porém é acoplado a um microscópio (ExpertShape, Cilas) equipado com uma câmera que possibilita obter imagens da amostra em suspensão, em uma faixa granulométrica que varia de 0,5 a 2500 μm (CILAS, 2009).



Figura 9: Analisador de tamanho de partícula Cilas 1190 acoplado ao microscópio (Fonte: www.cilas.com).

As análises foram feitas seguindo as mesmas especificações da análise anterior, entretanto a distribuição granulométrica e as imagens foram obtidas tanto para a amostra que foi exposta ao ultrassom, quanto para a que foi dispersa apenas pela agitação.

As análises foram realizadas no Laboratório de Análises Químicas, Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello (Cenpes).

3.4.1.2 Tempo de exposição ao ultrassom

Para definir o tempo de exposição ao ultrassom, foi utilizado o analisador de tamanho de partículas ParticleTrack E25 da Mettler Toledo (Figura 10), o qual possui uma faixa granulométrica que varia de 0,5 a 2000 μm e é diretamente inserido no processo sem a necessidade de preparação adicional da amostra.



Figura 10: Analisador de tamanho de partículas ParticleTrack E25 (Fonte: <http://us.mt.com/us/en/home.html>).

Tal equipamento faz a contagem de partículas presentes na amostra e fornece o tamanho das mesmas, possibilitando verificar a quantidade e a variação do tamanho das partículas com o tempo.

Estas análises também foram realizadas no Laboratório de Escoamento de Fluidos Giulio Massarani (IT/DEQ/UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro.

3.4.2 Microscopia Ótica (MO)

As análises de microscopia ótica foram realizadas com o intuito de avaliar a morfologia dos cristais. Foi utilizado um microscópio (Figura 11) equipado com a câmera AxioCam MRc (Zeiss).



Figura 11: Microscópio ótico (Zeiss) equipado com a câmera AxioCam MRc.

De acordo com Filho (2011), a microscopia ótica ou de luz permite o aumento de imagens através da luz que, ao incidir sobre a amostra, passa por um conjunto de lentes.

Cerca de 2 mg de GLIB foram misturadas a uma gota de água deionizada e a lamínula foi colocada sobre a amostra, que foi analisada utilizando aumento de 1000 vezes.

As análises foram feitas no Laboratório de Microscopia Ótica, Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

3.4.3 Difração de raios-X (DRX)

A transformação de partículas cristalinas para o estado amorfo é uma das técnicas utilizadas para melhorar a taxa de dissolução do medicamento (ZHANG *et al.*, 2009).

Diante disso, a caracterização das partículas quanto á sua cristalinidade foi realizada pelo difratômetro de raios-X MiniFlex II da Rigaku (Figura 12), localizado no Laboratório de Catálise Heterogênea (IT/DEQ/UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro.



Figura 12: Difratorômetro de raios-X MiniFlex II.

Os difratogramas foram obtidos com o intuito de verificar uma possível alteração na cristalinidade das partículas produzidas, tendo em vista as diferentes condições de operação utilizadas.

O equipamento utilizou uma radiação $\text{CuK}\alpha$, tensão de 30 kV e corrente de 15 mA, no intervalo de $0,05^\circ/\text{segundo}$, com varredura de $1-60^\circ$.

3.4.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

Tendo em vista que a espectroscopia no infravermelho fornece evidências da presença de diferentes grupos funcionais na estrutura do material, tal análise foi feita com o intuito de verificar possíveis alterações na estrutura química das partículas de glibenclamida.

Os espectros foram obtidos pelo espectrômetro com Transformada de Fourier VERTEX 70 da Bruker (Figura 13), localizado no Departamento de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (DEQUIM/UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro.



Figura 13: Espectrômetro VERTEX 70.

Cerca de 5 mg da droga foram previamente dessecados e misturados a uma quantidade de brometo de potássio (KBr). Posteriormente, a mistura foi triturada, pesada, prensada e introduzida no equipamento para análise em uma faixa de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$.

3.4.5 Teste de dissolução

O teste de dissolução possibilita determinar a quantidade de GLIB dissolvida no meio de dissolução em determinado tempo (ANVISA, 2010a; FILHO, 2011).

A análise foi realizada em um cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência (CLAE) (Modelo LC-20AT, Shimadzu) provido de detector UV-Visível (Modelo SPD-M20A, Shimadzu), localizado no Laboratório de Processos de Separação (IT/DEQ/UFRRJ), Seropédica, Rio de Janeiro.

Foi utilizada uma coluna C18 de fase reversa Shimadzu (Shim-pack CLC-ODS, de 6 mm de diâmetro interno e 150 mm de comprimento) empacotada com sílica ligada ao grupo octadecilsilano, mantida à temperatura ambiente.

3.4.5.1 Fase móvel

A fase móvel utilizada é constituída por uma mistura de tampão fosfato pH 3,0 e acetonitrila (30:70) e o fluxo utilizado foi de 1,0 mL.min⁻¹.

3.4.5.2 Tampão fosfato 3,0

Foram dissolvidos 1,36 g de fosfato de potássio monobásico em 900 ml de água, ajustou-se o pH em 3,0 ± 0,1 com ácido fosfórico e diluiu-se para 1000 ml com água.

3.4.5.3 Aparelhagem

O sistema para dissolução é composto por três componentes: as cubas, recipientes abertos de forma cilíndrica e fundo hemiesférico, feitas em vidro boro silicato que podem apresentar diferentes dimensões e capacidades; hastes em aço inoxidável para prover agitação do meio, que podem estar apresentados na forma de cesta (método 1) ou pá (método 2); e um motor que possibilita alterar a intensidade de agitação (ANVISA, 2010a). As figuras referentes aos dois métodos estão dispostas no Anexo II.

Neste estudo, foi feita uma adaptação do sistema proposto pela Farmacopeia Brasileira de 2010, utilizando um banho termostático (ALPHA RA 8, Lauda) para manter a temperatura adequada, um agitador (RW 16 basic, IKA[®]) e uma haste (homemade) com extremidade na forma de pá (Figura 14) e uma velocidade de agitação de 75 rpm.



Figura 14: Haste (homemade) em aço inoxidável com extremidade na forma de pá.

3.4.5.4 Tampão fosfato pH 7,3

Sendo tampão fosfato pH 7,3 o meio de dissolução adequado, a análise teve início com o preparo do mesmo. Dissolveu-se 20,8 g de fosfato de sódio dibásico hepta-hidratado e 3,08 g de fosfato de sódio monobásico mono-hidratado em 900 ml de água, ajustou-se o pH em $7,3 \pm 0,1$ com ácido fosfórico, diluiu-se para 1000 ml com água e seguiu-se para a etapa de desaeração.

3.4.5.5 Desaeração

A etapa de desaeração é de suma importância tendo em vista que a presença de gases dissolvidos no meio de dissolução pode gerar problemas como impedir o fluxo adequado no meio dissolução, provocar mudanças no movimento das partículas e diminuir o contato entre o líquido e o sólido (MARCOLONGO, 2003).

Nesta etapa, o meio de dissolução foi aquecido a 41°C utilizando um banho termostático (MA 120, Marconi) e filtrado a vácuo com uma membrana de $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore[®]), sendo o filtrado mantido sob intensa agitação magnética, durante e por cinco minutos após o término do procedimento, ainda sob vácuo.

3.4.5.6 Procedimento

Posteriormente, 900 ml do meio de dissolução foram colocados na cuba, ainda sem agitação, mantendo-se a temperatura de $37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ com o auxílio de um banho termostático (ALPHA RA 8, Lauda). A amostra (5 mg) foi então adicionada e iniciou-se a agitação, dando início ao procedimento.

Vale ressaltar que, de acordo com Filho (2011), a solubilidade de um fármaco é muito suscetível a alterações na temperatura. Portanto, tal variável foi cuidadosamente controlada durante todo o processo.

Amostras de 5 mL foram retiradas em diferentes intervalos de tempo, filtradas com o auxílio de membranas de $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore[®]) de porosidade e analisadas por CLAE. Foram utilizados intervalos de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 e 120 minutos, com o intuito de traçar o perfil de dissolução das partículas. O meio foi repostado após cada amostragem e cada ensaio foi repetido em duplicata, tendo em vista a quantidade reduzida de amostra e o tempo necessário para realizar as análises.

Foram injetados, separadamente, $20 \mu\text{l}$ da solução padrão e da solução amostra, os cromatogramas foram registrados e mediu-se a área dos picos. Assim, a quantidade de GLIB dissolvida foi calculada a partir das respostas obtidas.

O cálculo foi feito utilizando-se o programa Excel[®] (Microsoft, 2010), através do qual foi feita uma planilha onde os dados obtidos na análise da GLIB foram inseridos. Para cada amostra, foram relacionados os valores de área obtidos com a curva-padrão para calcular a concentração de GLIB nas alíquotas. Além disso, foram utilizados o volume do meio de dissolução empregado nos testes e a quantidade de GLIB inicial adicionada ao meio, conforme mostrado na Equação 21:

$$\text{GLIB}_{\text{diss}}(\%) = \left[\frac{C_{a(t)} \cdot V_c}{D} \right] \cdot 100, \quad (21)$$

onde,

GLIB_{diss}(%): porcentagem de GLIB dissolvida;

C_{a(t)}: concentração de GLIB nas alíquotas retiradas [mg.mL⁻¹] no tempo t;

V_c: volume do meio de dissolução;

D: quantidade de GLIB adicionada no meio de dissolução;

3.4.5.7 Curva-padrão

A curva-padrão foi preparada a partir de uma solução padrão. Foram pesados 11 mg de GLIB e transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, adicionou-se 40 ml de acetonitrila e deixou-se em ultrassom até a completa dissolução.

Completo-se o volume com o mesmo solvente, homogeneizou-se a solução e uma alíquota de 2,5 mL da mesma foi diluída em 50 mL de tampão fosfato pH 7,3. Com o intuito de obter as concentrações determinadas na curva de calibração, uma segunda diluição foi feita retirando-se alíquotas da solução preparada durante a primeira diluição, colocadas em um balão volumétrico de 10 mL e diluídas com tampão fosfato pH 7,3, obtendo as concentrações de 0,14 a 8,8 µg.mL⁻¹.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da Solubilidade

A solubilidade da GLIB foi verificada em etanol, metanol, acetona e isopropanol, sendo estas dispostas na Tabela 6, abaixo:

Tabela 6: Solubilidade da GLIB

Solvente Orgânico	Solubilidade [mg.mL ⁻¹]
Etanol	2,01
Metanol	2,20
Acetona	5,02
Isopropanol	1,00

O isopropanol foi descartado por apresentar a menor solubilidade. O metanol apresentou uma solubilidade próxima à do etanol, mas de acordo com o Guia de Solventes Residuais disponibilizado pela “International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use” (ICH, 2011) está contido na classe de solventes que devem ser limitados (classe 2) a fim de evitar possíveis doenças e efeitos colaterais. Os solventes da classe 3, como etanol e acetona, possuem menor toxicidade, em relação ao citado anteriormente e devem ser utilizados sempre que possível. A acetona apresentou maior solubilidade, mas, por ser de baixo custo, de fácil obtenção e por ser bastante citado na literatura, o etanol foi escolhido como solvente.

Outro fator decisivo foi a maior volatilidade da acetona. Assim, tendo em vista que o sistema é aberto, não foi possível utilizar a acetona como solvente orgânico.

4.2 Precipitação com Antissolvente Líquido (PAL)

Os dados obtidos em todas os experimentos estão dispostos na Tabela 7, a seguir:

Tabela 7: Combinações do OA₉(3)⁴, diâmetro médio de Brouckere D[4,3] e diâmetro médio de Sauter D[3,2]

Cond. experimental	A [mg.mL ⁻¹]	B [A/S]	C [rpm]	D [%m/m]	DMB [µm] ± DP	DMS [µm] ± DP
1	0,5	5	300	0,000	6,671 ± 0,002	3,125 ± 0,001
2	0,5	10	600	0,001	3,032 ± 0,057	2,269 ± 0,046
3	0,5	20	1500	0,002	2,484 ± 0,005	1,856 ± 0,001
4	1,0	5	600	0,002	3,145 ± 0,005	2,389 ± 0,003
5	1,0	10	1500	0,000	4,078 ± 0,002	2,389 ± 0,002
6	1,0	20	300	0,001	3,051 ± 0,009	2,046 ± 0,003
7	2,0	5	1500	0,001	3,738 ± 0,006	2,795 ± 0,003
8	2,0	10	300	0,002	3,452 ± 0,005	2,389 ± 0,003
9	2,0	20	600	0,000	6,868 ± 0,014	3,271 ± 0,005

A – concentração da solução [mg.mL⁻¹];

B – razão de volume antissolvente/solvente;

C – intensidade de agitação;

D – concentração de aditivo [% massa de aditivo/massa de GLIB];

DMB – diâmetro médio de Brouckere {D [4,3]};

DMS – diâmetro médio de Sauter {D [3,2]};

DP – desvio padrão;

Foram realizados nove experimentos gerados pelo “software” Statistica® 10, sendo utilizada uma condição de operação diferente em cada experimento. Posteriormente, foi feita a análise do tamanho, bem como a distribuição de tamanho das partículas cristalizadas. Observa-se que os experimentos 3 e 9 apresentam o menor e maior DMB, bem como menor e maior diâmetros de Sauter, respectivamente, sendo que tais alterações estão diretamente relacionadas às variações nas condições experimentais.

Vale ressaltar que as curvas de frequência, bem como os valores dos diâmetros D[4,3] e D[3,2] contidos na Tabela 12 representam a média das três medições feitas pelo equipamento e estão dispostos no Anexo I.

4.2.1 Planejamento Experimental

A análise do efeito dos parâmetros na variável resposta foi feita com base no diâmetro médio D[4,3] obtido em cada condição experimental e nas Equações 5 a 20, estando os resultados dispostos abaixo:

Efeito (E_A) de A

$$A_1 = 4,062$$

$$A_2 = 3,425$$

$$A_3 = 4,686$$

$$E_A = 1,261$$

Efeito (E_B) de B

$$B_1 = 4,518$$

$$B_2 = 3,521$$

$$B_3 = 4,134$$

$$E_B = 0,997$$

Efeito (E_C) de C

$$C_1 = 4,391$$

$$C_2 = 4,348$$

$$C_3 = 3,433$$

$$E_C = 0,958$$

Efeito (E_D) de D

$$D_1 = 5,872$$

$$D_2 = 3,274$$

$$D_3 = 3,027$$

$$E_D = 2,845$$

Assim, utilizando como base os conceitos de Genichi Taguchi é possível determinar os fatores de maior influência.

Por apresentar o maior valor de E, a concentração de aditivo [% m/m] é o fator de maior influência na variável resposta, ou seja, é a variável que ocasiona maior variabilidade no DMB das partículas, enquanto a intensidade de agitação se mostra como o fator de menor influência. Diante disso, pode-se concluir que a influência dos fatores no diâmetro médio das partículas em ordem decrescente é: D (concentração de aditivo) > A (concentração da solução de GLIB) > B (razão de volume solvente/antissolvente) > C (intensidade de agitação).

O resultado está de acordo com o encontrado no estudo realizado por ZHAO *et al.*, (2013), onde os fatores avaliados na micronização do princípio ativo farmacêutico genipina apresentaram semelhante ordem de influência no DMB das partículas, sendo esta: concentração da solução da droga [$\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$], seguida pela razão de volume antissolvente/solvente [A/S], intensidade de agitação [rpm] e tempo de agitação [min].

A Figura 15 representa o efeito da concentração de aditivo [% massa de aditivo/massa de GLIB] no diâmetro médio de Brouckere das partículas produzidas.

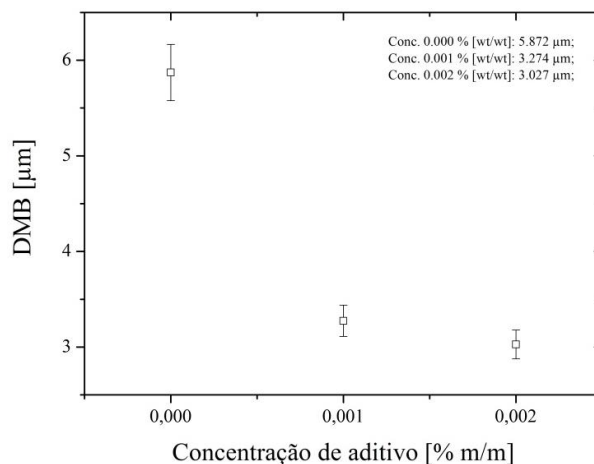


Figura 15: Diâmetro médio de Brouckere [DMB] *versus* concentração de aditivo [% massa de aditivo/massa de GLIB].

Observa-se que sem a presença do aditivo, as partículas apresentaram o diâmetro médio de 5,872 μm . Ao adicionar o aditivo a uma concentração de 0,001 % [m/m], o diâmetro médio das partículas reduziu drasticamente para 3,274 μm , indicando que o TWEEN[®] 80 é adequado para promover a estabilização estérica, evitando o crescimento do cristal. Entretanto, quando a concentração foi aumentada para 0,002 % [m/m], houve uma pequena redução DMB para 3,027 μm . Diante disso, observa-se que o diâmetro médio {D [4,3]} não sofre influência significativa com o aumento da concentração de 0,001 para 0,002 % [m/m], indicando que a superfície das partículas está suficientemente envolvida pelas moléculas do aditivo. Tal comportamento também foi observado por DONG *et al.*, (2009).

Na Figura 16, estão dispostos os valores obtidos para o diâmetro médio de Sauter $\{D [3,2]\}$ e diâmetro médio de Brouckere $\{D [4,3]\}$ nas condições experimentais 1, 2 e 3, onde foram utilizadas as concentrações 0,000, 0,001 e 0,002 % [m/m], respectivamente.

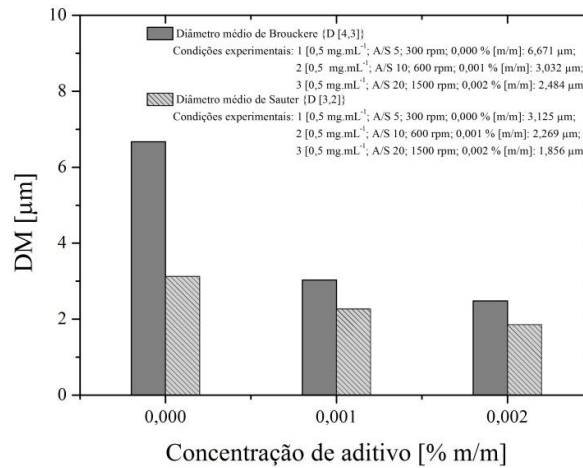


Figura 16: Diâmetro médio de partícula de GLIB *versus* concentração do aditivo TWEEN® 80 [% m/m].

Pode-se observar que o DMS exibe o mesmo comportamento do diâmetro médio de Brouckere quando a concentração do aditivo foi aumentada de 0,000 para 0,002 % [m/m]. Entretanto, o diâmetro médio de Sauter observado na condição experimental 1 é significativamente menor que o DMB. Tendo em vista que o DMS é mais a partículas pequenas e a condição experimental 1 exibiu uma maior fração de finos em relação às condições 2 e 3, há uma redução mais significativa do DMS em relação ao DMB.

Nas demais condições experimentais, tal redução não foi tão significativa, devido à ausência das partículas finas, exibindo uma DTP normal. As curvas de distribuição de tamanho de partículas referentes às três condições experimentais citadas acima, podem ser observadas na Figura 17.

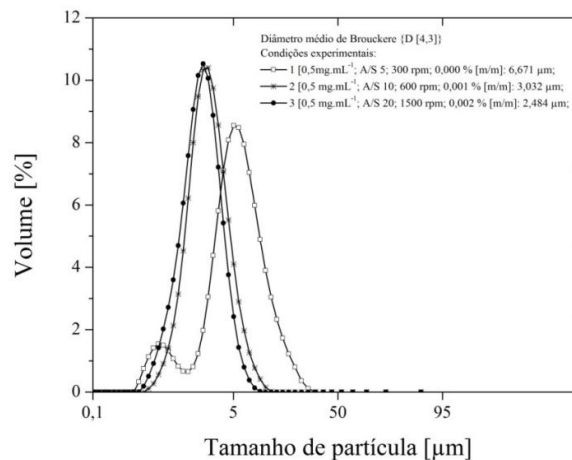


Figura 17: Curva de distribuição de tamanho da GLIB obtida nas condições experimentais 1, 2 e 3.

Conforme dito posteriormente, pode-se observar que o aumento da concentração de aditivo promove a formação de uma DTP normal nas condições experimentais 2 e 3, sendo que o menor DMB foi observado onde a maior concentração de aditivo foi utilizada.

A redução do DMB com o aumento da concentração de aditivo [% massa de aditivo/massa de GLIB] também pode ser observada quando se avalia as porcentagens d_{50} e d_{90} observadas nas condições 1, 2 e 3 (Figura 18).

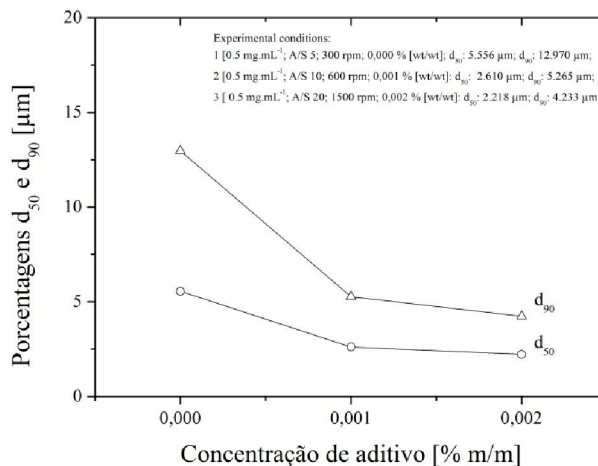


Figura 18: Variação das porcentagens d_{50} e d_{90} versus concentração de aditivo [% massa de aditivo/massa de GLIB] nas condições 1, 2 e 3.

Pode-se observar que há uma significativa redução no diâmetro médio representado pelas porcentagens d_{50} e d_{90} quando se aumenta a concentração de aditivo [% massa de aditivo/massa de GLIB].

Diante disso, foi possível concluir que sua utilização é de suma importância para a produção de partículas de tamanho reduzido, já que atua como uma barreira evitando que o cristal formado apresente o crescimento do raio em resposta à tentativa de redução da energia livre do sistema.

O segundo fator de maior influência é a concentração da solução da droga [$\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$], sendo que seu efeito no diâmetro médio de Brouckere pode ser observado na Figura 19.

Observa-se que dentre as concentrações avaliadas, há uma redução do DMB das partículas produzidas com o aumento da concentração de 0,5 para $1,0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Tal fenômeno pode ser explicado pela maior taxa de nucleação obtida quando a supersaturação é favorecida pelo aumento da concentração da solução da droga (CHEN *et al.*, 2004). Tal resultado também foi obtido por Zhang *et al.*, (2009).

Entretanto, nota-se que maiores partículas são obtidas quando a concentração foi aumentada para $2,0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Tal comportamento pode ser explicado considerando-se o número de núcleos formados na interface solvente/antissolvente e a influência da concentração na viscosidade. O grande número de núcleos formados na interface solvente/antissolvente reduz, simultaneamente, a difusão do solvente para o antissolvente, favorecendo a aglomeração dos núcleos e o subsequente crescimento dos cristais. A viscosidade da solução também é aumentada pelo aumento da concentração, dificultando a difusão entre os solventes e resultando em uma supersaturação lenta e não homogênea (ZHANG *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2009). Tal comportamento também foi observado por Zhao *et al.*, (2013).

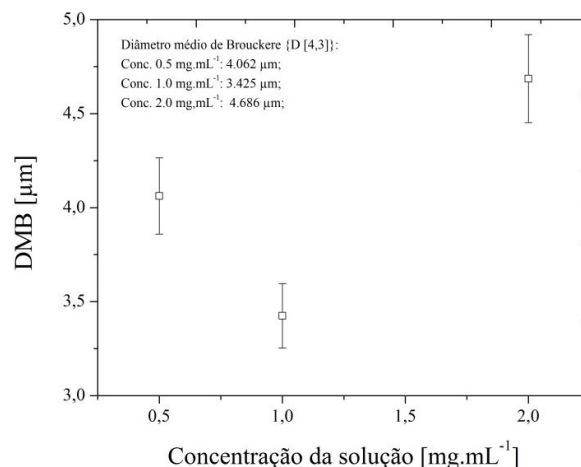


Figura 19: Diâmetro médio de Brouckere [DMB] *versus* concentração da solução de GLIB [mg.mL⁻¹].

A Figura 20 mostra o efeito da razão de volume antissolvente/solvente no diâmetro médio de Brouckere das partículas produzidas.

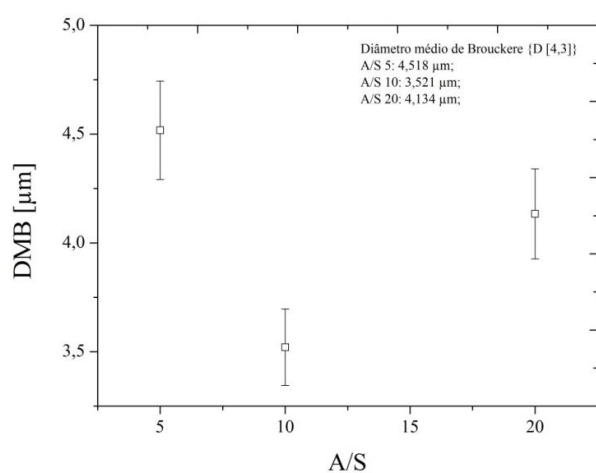


Figura 20: Diâmetro médio de Brouckere [DMB] *versus* razão de volume antissolvente/solvente [A/S].

Observa-se que o DMB reduziu quando a razão A/S foi aumentada de 5 para 10, e apresentou certo aumento quando a razão foi elevada de 10 para 20. Os resultados adquiridos para a variável B estão de acordo com o obtido no estudo realizado por ZHAO *et al.*, (2013), onde os menores valores de DMB foram encontrados quando foi utilizada uma razão A/S intermediária.

A última variável estudada foi intensidade de agitação, cujo efeito está representado na Figura 21.

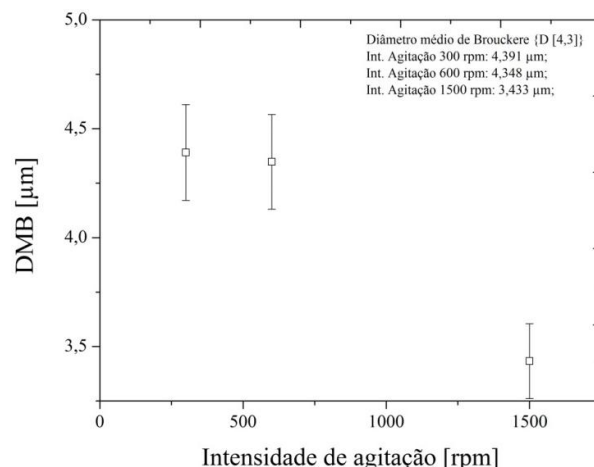


Figura 21: Diâmetro médio de Brouckere [DMB] *versus* intensidade de agitação [rpm].

Observa-se que a intensidade de agitação de 1500 rpm possibilitou produzir partículas com o menor DMB. De acordo com Shah *et al.*, (2013) e Wang *et al.*, (2007), tal comportamento pode ser explicado, tendo em vista que uma maior velocidade de agitação aumenta a transferência de massa e a taxa de difusão entre as duas fases, induzindo uma supersaturação mais homogênea e, conseqüentemente, uma rápida nucleação, promovendo a produção de cristais de tamanho reduzido, além de uma estreita distribuição de tamanho.

A análise de variância (Tabela 8) foi feita através do “software” Statistica[®] 10 com o intuito de verificar o nível de significância de cada fator no DMB das partículas produzidas.

Tabela 8: Análise de variância do OA₉(3)⁴

Fator	SS	GL	F _{razão}	Tipo de Efeito
A, Concentração da Solução	2,3865	2	1,3584	
B, Razão de volume A/S	1,5185	2	0,8643	
D, Concentração de aditivo [% m/m]	14,9098	2	8,4867	Significante
Erro	1,7568	2		

SS – soma dos quadrados;

GL – graus de liberdade;

Observa-se que, dentre os fatores avaliados, a concentração de aditivo [% massa de aditivo/massa de GLIB] se mostra como a variável de maior efeito por apresentar o maior valor para F, seguido pela concentração da solução e razão de volume de solvente/antissolvente. O resultado obtido pela ANOVA está de acordo com o obtido anteriormente, sendo que a intensidade de agitação [rpm] não foi incluída na análise de variância por apresentar a menor influência no diâmetro médio de Brouckere.

4.2.2 Caracterização

4.2.2.1 Análise Granulométrica

O tamanho e a distribuição de tamanho das partículas foram obtidos através de análise granulométrica, as quais foram feitas com a utilização do ultrassom para auxiliar na dispersão de partes aglomeradas da amostra. As partículas de tamanho inicial foram utilizadas para investigar o efeito do mesmo e os resultados estão dispostos na Figura 22:

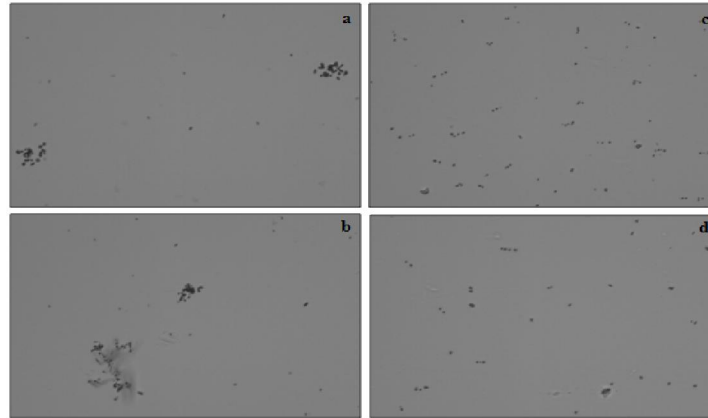


Figura 22: Efeito do ultrassom na dispersão de partes aglomeradas da amostra: (a e b): sem ultrassom; (c e d) com ultrassom.

É possível observar que as partículas presentes nas imagens da esquerda (22.a e 22.b) se mostram bem aglomeradas, ou seja, apenas a agitação do equipamento não é suficiente para dispersar a amostra de maneira adequada. Já nas imagens da direita (22.c e 22.d), situações onde o ultrassom foi utilizado, observa-se que as partículas estão dispersas mais uniformemente. Diante disso, conclui-se que o uso do ultrassom é vantajoso para o sucesso das análises.

Tal diferença também pode ser observada na distribuição de tamanho das partículas (Figura 23).

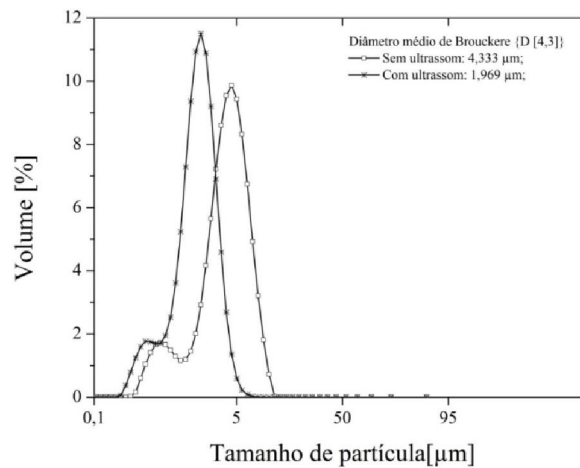


Figura 23: Curva de distribuição de tamanho da GLIB original: sem ultrassom [4,333 µm]; com ultrassom [1,969 µm].

É nítida a diferença na distribuição de tamanho da GLIB inicial, entretanto a curva bimodal (assimétrica) obtida nas duas análises deve-se à heterogeneidade da amostra (MALVERN, 2014).

O tempo de exposição ao mesmo também foi investigado, sendo que em tal análise também foram utilizadas as partículas originais. Os resultados estão dispostos na Figura 24, a seguir:

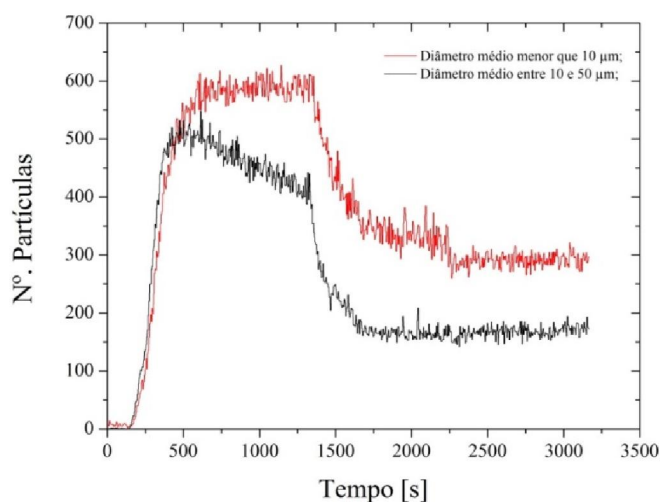


Figura 24: Número de partículas de GLIB *versus* tempo.

Na primeira etapa do experimento, a amostra permaneceu apenas sob agitação durante cerca de 25 minutos e verificou-se um aumento na quantidade de partículas menores que 10 µm e uma redução de partículas de tamanho entre 10 e 50 µm, sendo que tal efeito se deve a dispersão de parte dos aglomerados presentes na amostra.

Posteriormente, o ultrassom foi ligado e uma redução tanto nas partículas menores que 10 µm quanto nas de tamanho entre 10 e 50 µm foi observada, indicando uma maior dispersão da amostra. A redução nas duas faixas granulométricas pode estar relacionada à faixa de leitura do equipamento, ou seja, os aglomerados estão se desfazendo e atingindo tamanhos imperceptíveis à faixa de detecção do mesmo (0,5 a 2000 µm). Observa-se que decorridos 10 minutos as curvas tendem a se estabilizar, indicando que a maior parte dos aglomerados já se dispersou de maneira adequada, possibilitando uma análise correta. Então, o ultrassom foi desligado e verificou-se que as curvas permaneceram estáveis. Diante disso, optou-se por utilizar o ultrassom por 10 minutos e desligá-lo para realizar as medições.

Vale ressaltar que, por apresentar uma técnica diferente da utilizada no Mastersizer 2000, o tamanho das partículas obtido no analisador de tamanho de partículas ParticleTrack E25 não pode ser comparado aos dados disponibilizados pelo anterior (MALVERN, 2014), ou seja, a análise foi feita apenas com o intuito de verificar a variação no tamanho dos cristais com o tempo de exposição ao ultrassom.

Diante disso, a distribuição de tamanho da GLIB inicial, bem como das partículas cristalizadas nas condições 5, 7 e 8 estão dispostas na Figura 25, a seguir:

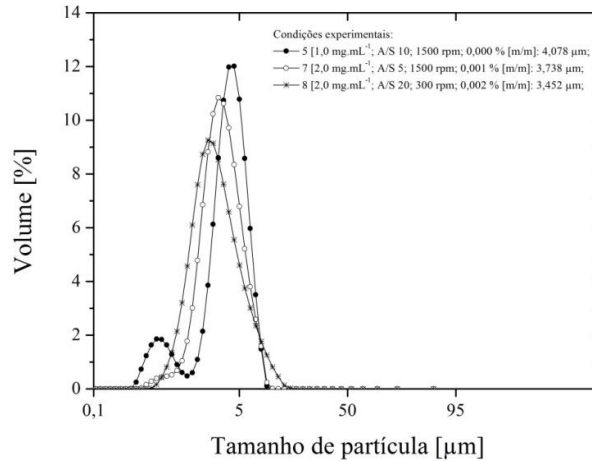


Figura 25: Curva de distribuição de tamanho de partícula da glibenclamida obtida nas condições experimentais 5, 7 e 8.

Dentre as três condições experimentais dispostas na Figura 25, nota-se que a distribuição de tamanho de partículas apresentou ampla variação quando diferentes condições de operação foram utilizadas. As partículas produzidas na condição 5 apresentaram a maior heterogeneidade, sendo devido à menor concentração de aditivo [% m/m] utilizada, enquanto, nas condições 7 e 8 as concentrações de aditivo utilizadas foram 0,001 e 0,002 % [m/m], respectivamente. Devido à maior quantidade de aditivo utilizado, as partículas obtidas na condição experimental 8 apresentaram uma DTP mais homogênea e um menor diâmetro de Brouckere.

4.2.2.2 Microscopia Ótica

A Figura 26 ilustra as microfotografias da GLIB obtida em diferentes condições experimentais.

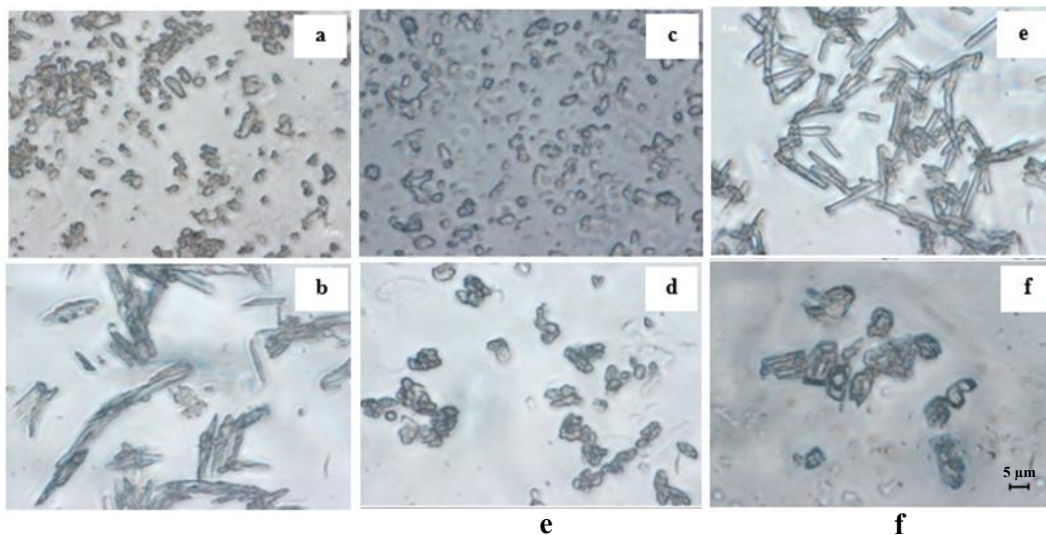


Figura 26: Microfotografias da GLIB: (a) inicial; condições experimentais: (b) 1, (c) 3, (d) 5, (e) 8, (f) 9.

Observa-se que distintas morfologias foram obtidas nas diferentes condições experimentais. As partículas iniciais apresentaram forma irregular com ampla faixa granulométrica, variando entre 0,669 e 3,279 μm (Anexo I). Nas Figuras 29.b e 29.e observaram-se partículas de morfologia uniforme, mas não houve bom controle do tamanho dos cristais.

Nas Figuras 26.c, 26.d e 26.f foram obtidas partículas arredondadas e similares, mas os menores diâmetros foram observados na imagem 26.c.

Os resultados estão de acordo com os dispostos anteriormente, já que as menores partículas, bem como as de morfologia mais esférica e uniforme, foram obtidas quando foram utilizadas uma concentração de aditivo igual a 0,002 % [m/m] e agitação de 1500 rpm.

4.2.2.3 Difração de raios-X

Os difratogramas referentes à GLIB inicial e a cristalizada nos experimentos 3 e 9 estão dispostos na Figura 27, a seguir:

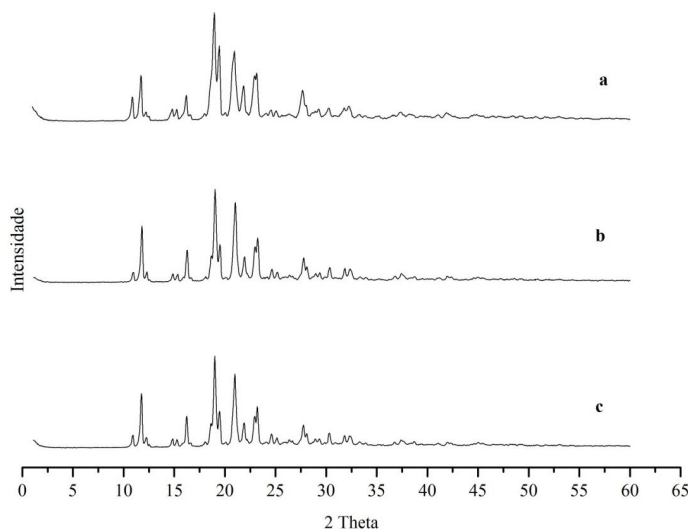


Figura 27: Difratogramas de raios-X da GLIB: (a) inicial; condições experimentais: (b) 3; (c) 9.

O difratograma obtido para a GLIB inicial (Figura 27.a) está similar ao descrito por Hassan, Najib e Suleiman, (1991) e Nery *et al.*, (2008). Entretanto, pode-se observar que não há variação significativa na cristalinidade das partículas produzidas, indicando que as variáveis estudadas não afetam a cristalinidade da GLIB precipitada nas diferentes condições experimentais.

4.2.2.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

Os espectrogramas das partículas iniciais, bem como as obtidas nas condições experimentais 3 e 9 estão dispostos na Figura 28:

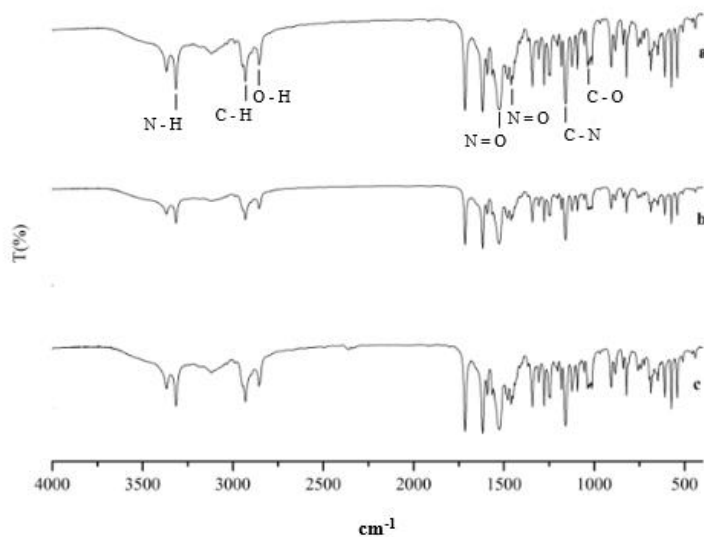


Figura 28: Espectro de infravermelho da GLIB: (a) inicial; condições experimentais: (b) 3; (c) 9.

De acordo com Irisappan, Kumar e Jayaveera (2013), a glibenclamida apresenta bandas características em 3311,19 (N-H), 2929,06 (C-H), 2851,28 (O-H), 1449,29 e 1517,12 (N=O), 1154,22 (C-N) e 1010,89 (C-O) cm^{-1} .

Observa-se que não há diferença significativa nos espectrogramas, ou seja, a estrutura química da glibenclamida não sofre alterações após o processo de cristalização.

4.2.2.5 Teste de dissolução

Com o intuito de verificar a variação no perfil de dissolução das partículas cristalizadas em diferentes condições experimentais, foram realizados testes de dissolução, sendo que para tal, foi utilizada uma curva-padrão composta por 7 concentrações diferentes (Figura 29):

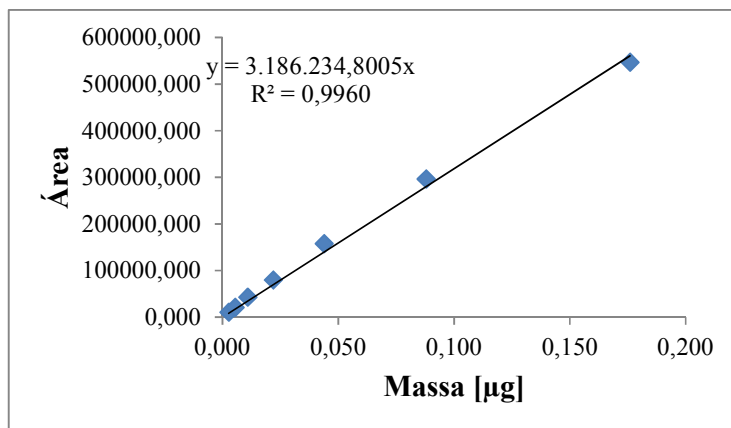


Figura 29: Curva-padrão da GLIB obtida em CLAE.

A linearidade da curva foi comprovada, tendo em vista que o coeficiente de correlação linear foi superior a 0,99, sendo este o limite determinado pela Resolução n°. 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA. Além disso, o desvio padrão relativo está abaixo de 10% para todas as concentrações (Tabela 9).

Para a obtenção da curva-padrão, alíquotas de 20 µL de cada amostra foram injetadas pelo menos cinco vezes e os dados referentes aos três melhores resultados observados para cada concentração estão dispostos na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados das injeções em CLAE.

Concentração [µg.mL ⁻¹]	Massa [µg]	Volume Injetado [µL]	Área do Pico	Média	DP	DPR [%]
0,14	0,003	20	10894 9728 11561	10727,667	927,751	8,648
0,28	0,006	20	21742 20531 21234	21169,000	608,111	2,873
0,55	0,011	20	43188 43497 42246	42977,000	651,645	1,516
1,1	0,022	20	78316 80435 79877	79542,667	1098,351	1,381
2,2	0,044	20	156765 159333 156653	157583,667	1516,002	0,962
4,4	0,088	20	297941 289986 300610	296179,000	5526,828	1,866
8,8	0,176	20	519814 534631 583714	546053,000	33446,211	6,125

DP – desvio padrão;

DPR – desvio padrão relativo;

Com o intuito de comprovar a seletividade do método, optou-se por apresentar o cromatograma referente ao sétimo ponto da curva-padrão da glibenclamida, estando disposto na Figura 30:

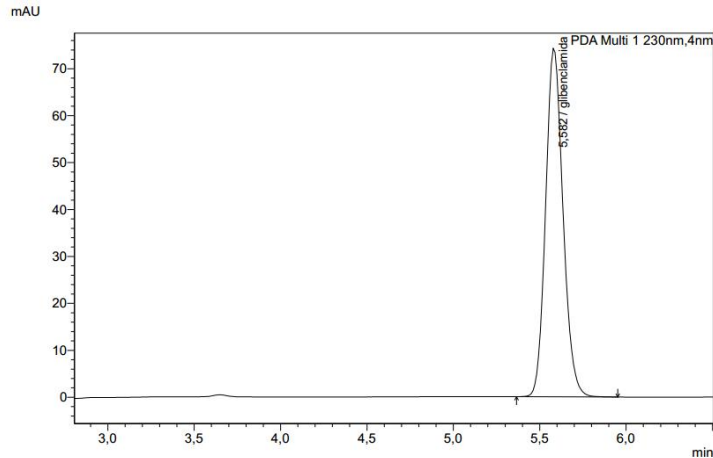


Figura 30: Cromatograma da GLIB obtido em CLAE.

Na Figura 30 pode-se observar que o método se mostrou efetivo, uma vez que não houve picos interferentes no tempo de retenção do princípio ativo.

Na determinação do perfil de dissolução, foram analisadas as partículas presentes nas condições experimentais 1, 3 e 7, cujos resultados estão dispostos abaixo (Figura 31). Os experimentos foram feitos em duplicata e os dados detalhados referentes a todas as injeções estão contidos no Anexo III.

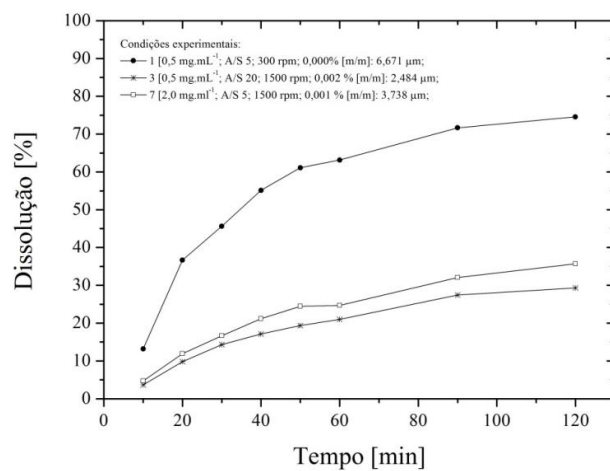


Figura 31: Dissolução de GLIB [%] *versus* tempo [min] das condições experimentais 1, 3 e 7.

Conforme ilustrado na Figura 31, pode-se observar que, mesmo exibindo o maior diâmetro de Brouckere (6,671 μm), as partículas obtidas na condição experimental 1 apresentaram a maior taxa de dissolução, seguida pelas condições experimentais 3 e 7, respectivamente. Vale ressaltar que a primeira se mostrou mais efetiva, uma vez que mais de 60% das partículas se dissolveram nos primeiros 60 minutos de experimento, conforme sugerido pela Farmacopeia Brasileira, enquanto as demais não se adequam à exigência.

Dentre as condições experimentais utilizadas, a GLIB proveniente da condição 3 exibiu o menor DMB (2,484 μm) e, devido à isso, previa-se obter maior taxa de dissolução para tais partículas. Entretanto, a maior quantidade de finos, ou seja, partículas menores que 1

μm , contribuiu para que a GLIB obtida da condição experimental 1, exibisse maior porcentagem de dissolução em menor tempo de análise. As porcentagens em volume das partículas de tamanho entre 0,010 e 0,955 μm presentes nas amostras analisadas podem ser observadas na Figura 32, abaixo:

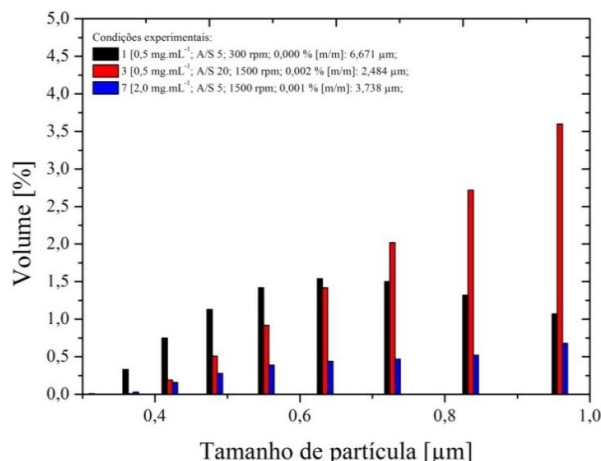


Figura 32: Porcentagem de partículas de GLIB com granulometria entre 0,01 e 0,955 μm observados nas condições experimentais 1, 3 e 7.

Dentre a faixa granulométrica avaliada, observa-se que a condição 1 exibiu a maior porcentagem de partículas menores que 0,7 μm , seguida pelas condições experimentais 3 e 7, respectivamente. Quanto às partículas maiores que 0,7 μm , a GLIB proveniente da condição experimental 3 exibiu a maior porcentagem de partículas, seguida pelas condições 1 e 7, respectivamente.

Tendo em vista que partículas de menor tamanho tendem a se dissolver mais rapidamente, a taxa de dissolução na condição experimental 1 é maior quando comparada à condição 3. Vale ressaltar que a GLIB obtida em 7 apresentou uma taxa de dissolução maior que em 3, tendo vista a menor quantidade de partículas de maior granulometria.

Embora não tenham sido encontrados resultados semelhantes na literatura, tal comportamento pode estar relacionado às etapas de nucleação e crescimento dos cristais, as quais devem ocorrer de forma controlada para que seja possível obter partículas de menor diâmetro médio de Brouckere e uma DTP normal.

Tendo em vista que todos os experimentos foram realizados com mesma taxa de injeção (15 mL.min⁻¹), quando uma solução menos concentrada é introduzida no antissolvente, a quantidade de partículas inseridas, bem como a quantidade que precipita é menor em relação à uma solução saturada. Assim, a taxa de nucleação também é menor, o que acaba prejudicando a formação de uma maior quantidade de núcleos de tamanho crítico. Além disso, a ausência do aditivo prejudica o controle de crescimento dos cristais, ou seja, as etapas de nucleação e crescimento não ocorrem de maneira controlada. Diante disso, tem-se como resultado uma amostra heterogênea e polidispersa, a qual exibe uma curva de distribuição de tamanho ampla e bimodal, com partículas de granulometria variando entre 1,286 e 12,970 μm como observado na condição experimental 1.

Já na condição 3, a taxa de nucleação foi prejudicada pela baixa concentração da solução, mas a presença do aditivo e a maior intensidade de agitação possibilitaram obter uma amostra com partículas de granulometria entre 1,044 e 4,233 μm e uma DTP simétrica. Entretanto, o processo de precipitação com antissolvente líquido possui limitações em conter

o crescimento dos cristais, e, devido a isso, não foi possível obter partículas em escala nanométrica.

Diante disso, pode-se concluir que para se obter maiores porcentagens de dissolução, é preciso produzir partículas que apresentem estreita distribuição granulométrica, porém em escala nanométrica.

5 – CONCLUSÕES

Neste estudo, a glibenclamida foi cristalizada por processo de precipitação com antissolvente líquido utilizando água como antissolvente a fim de determinar a influência das variáveis estudadas no diâmetro médio e na taxa de dissolução das partículas cristalizadas.

O design ortogonal $OA_9(3)^4$ proposto por Genichi Taguchi foi utilizado para investigar o efeito de quatro fatores: concentração da solução [mg.mL^{-1}], razão de volume antissolvente/solvente [A/S], intensidade de agitação [rpm] e concentração de aditivo [% m/m]. A concentração de aditivo se mostrou como a variável de maior influência no diâmetro médio das partículas, seguida pela concentração da solução, razão de volume antissolvente/solvente e intensidade de agitação.

Dentre os três níveis de cada variável, os menores diâmetros foram obtidos quando foi utilizada a concentração da solução de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$; razão de volume antissolvente/solvente de 10; intensidade de agitação de 1500 rpm;

O menor diâmetro médio de Brouckere ($2,484 \mu\text{m}$), bem como a distribuição de tamanho de partículas mais simétrica, com granulometria variando entre $1,044$ e $4,233 \mu\text{m}$ foram observados na condição experimental 3; enquanto a condição experimental 9 exibiu o maior DMB ($6,868 \mu\text{m}$) e uma DTP bimodal, com granulometria variando entre $1,117$ e $11,874 \mu\text{m}$.

Quanto ao diâmetro médio de Sauter, a condição experimental 3 exibiu o menor ($1,856 \mu\text{m}$), enquanto o maior DMS foi exibido pela condição 9 ($3,271 \mu\text{m}$). Observa-se que na condição experimental 1 há uma significativa redução do diâmetro médio, podendo estar relacionada à quantidade de partículas pequenas presentes na amostra, as quais aumentam a área superficial disponível para dissolução e, conseqüentemente, reduzem o DMS. Já na condição 3, tal redução não foi tão significativa, devido à ausência das partículas finas.

De acordo com as análises de difração de raios-X e espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier, foi possível verificar que a GLIB inicial está de acordo com a literatura e que o processo de precipitação com antissolvente líquido não exerceu influência na cristalinidade e na estrutura química do princípio ativo farmacêutico.

Através de microscopia ótica, foi possível verificar que diferentes morfologias foram obtidas em diferentes condições experimentais. Nas condições 1 e 8 as partículas exibiram morfologia uniforme, mas não houve bom controle do crescimento dos cristais; nas condições 3, 5 e 9 foram obtidas partículas arredondadas e similares, mas o menor DMB, bem como os cristais de morfologia mais esférica e uniforme foram observados na condição experimental 3, quando foram utilizadas uma concentração de aditivo igual a $0,002 \%$ [m/m] e agitação de 1500 rpm.

Dentre as condições experimentais 1, 3 e 7, a condição 1 exibiu a maior taxa de dissolução, devido à maior quantidade de partículas menores que $0,7 \mu\text{m}$, seguida pelas condições experimentais 7 e 3, respectivamente. Tal comportamento observado na condição 1 pode estar relacionado às etapas de nucleação e crescimento dos cristais, as quais não ocorreram de forma controlada, tendo como resultado uma amostra heterogênea e polidispersa, a qual exibe uma curva de distribuição de tamanho ampla e bimodal, com partículas de granulometria variando entre $1,286$ e $12,970 \mu\text{m}$.

Já na condição 3, obteve-se uma amostra com partículas de granulometria entre $1,044$ e $4,233 \mu\text{m}$ e uma DTP simétrica, entretanto, o processo de precipitação com antissolvente líquido possui limitações em conter o crescimento dos cristais, e, devido a isso, não foi possível obter partículas em escala nanométrica.

5.1 Sugestões

Tendo em vista que a glibenclamida foi cristalizada sem grandes alterações na cristalinidade e estrutura química, e que também não foram obtidas partículas em escala nanométrica, seguem as sugestões para complemento e extensão do presente estudo:

- Cristalizar a glibenclamida através da precipitação com antissolvente supercrítico, para se obter partículas em escala nanométrica;
- Verificar a influência dos fatores nos diâmetros médios de Brouckere e Sauter;
- Verificar a influência do processo na cristalinidade, estrutura química e morfologia das partículas obtidas;
- Verificar a variação na taxa de dissolução conforme as condições experimentais são alteradas;

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD ELBARY, A. A.; SALEM, H. F.; MAHER, M. E. In vitro and in vivo evaluation of glibenclamide using surface solid dispersion (SSD) approach. **British Journal of Pharmacology and Toxicology**, 2 (1), p. 51-62, 2011.

ADA (American Diabetes Association). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, vol. 27, n. 1, p. 5-10, 2004.

ALBU, F.; GEORGITA, C.; DAVID, V.; MEDVEDOVICI, A. Determination of glibenclamide in human plasma by liquid chromatography and atmospheric pressure chemical ionization/MS-MS detection. **Journal of Chromatography B**, 846, p. 222-229, 2007.

AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of *in Vitro* Drug Product Dissolution and *in Vivo* Bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Farmacopeia Brasileira**, 2010a. v. 1. 5 ed. Brasília. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1.pdf>. Acesso em outubro de 2013.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Farmacopeia Brasileira**, 2010b. v. 2. 5 ed. Brasília. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume2.pdf>. Acesso em outubro de 2013.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução n. 899, de 29 maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003.

ARAÚJO, L. M. B.; BRITTO, M. M. dos S.; CRUZ, T. P. da. Tratamento do Diabetes Mellitus do Tipo 2: Novas Opções. **Arq. Bras. Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, n. 6, p. 509-518, 2000.

ARRIETA, F.; RUBIO-TERRÉS, C.; RUBIO-RODRÍGUEZ, D.; MAGAÑA, A.; PIÑERA, M.; IGLESIAS, P.; NOGALES, P.; CALAÑAS, A.; NOVELLA, B.; BOTELLA-CARRETERO, J. I.; DEBÁN, C.; ZAMARRÓN, I.; MORA, G.; BALSÀ, J. A.; VÁSQUEZ, C. Estimación del impacto económico y sanitario de las complicaciones de la diabetes mellitus tipo 2 en la Comunidad de Madrid. **Endocrinología y Nutrición**, v. 61, n. 4, p. 193-201, 2014.

ASMAL, A. C.; MARBLE, A. Oral Hypoglycaemic Agents: An update. **Drugs**, 28, p. 62-78, 1984.

BAPTISTA, E. B. **Estudo da Correlação in vivo/in vitro empregando comprimidos de glibenclamida não bioequivalentes**. 2005. 140 p. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 20057.

BONDUELLE, G. M. Aplicação do planejamento de experimentos no controle da fabricação de chapas de fibras de madeira. **CERNE**, vol. 6, n. 2, p. 1-10, 2000.

BOUTIN, O.; PETIT-GAS, T.; BADENS, E. Powder Micronization Using a CO₂ Supercritical Antisolvent Type Process: Comparison of Different Introduction Devices. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 48, p. 5671-5678, 2009.

BREDA, S. A. *et al.* Solubility behavior and biopharmaceutical classification of novel high-solubility ciprofloxacin and norfloxacin pharmaceutical derivatives. **International Journal of Pharmaceutics**, 371, p. 106-113, 2009.

CAROLEI, L. **Determinação de surfactantes e água em formulações de sabonetes líquidos e shampoos por infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) utilizando a técnica de reflectância total atenuada (ATR)**. 2005. 102 p. Tese (Doutor em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, So Paulo, 2005.

CATEN, C. S. ten. **Método de otimização de produtos e processos medidos por múltiplas características de qualidade**. 1995. 154 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Produção) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

CHATTOPADHYAY, P.; GUPTA, R. B. Production of griseofulvin nanoparticles using supercritical CO₂ antisolvent with enhanced mass transfer. **International Journal of Pharmaceutics**, 228, p. 19-31, 2001.

CHEN, J.; ZHOU, M.; SHAO, L.; WANG, Y.; YUN, J.; CHEW, N. Y. K.; CHAN, H. Feasibility of preparing nanodrugs by high-gravity reactive precipitation. **International Journal of Pharmaceutics**, 269, p. 267-274, 2004.

CHENG, C.; LIU, S.; MUELLER, B. J.; YAN, Z. A generic static headspace gas chromatography method for determination of residual solvents in drug substance. **Journal of Chromatography A**, 1217, p. 6413-6421, 2010.

CHIEN, H.; CHANG, C.; CHU, N.; HSIEH, S.; HUANG, Y.; LEE, I.; LEE, W.; TANG, Y.; SHEU, W. H. H. Effect of Glyburide–Metformin Combination Tablet in Patients with Type 2 Diabetes. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 70, n. 11, p. 473-480, 2007.

CHILLISTONE, S.; HARDMAN, J. Factors affecting drug absorption and distribution. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 9, p. 167-171, 2011.

DEHGHANI, F.; FOSTER, N. R. Dense gas anti-solvent processes for pharmaceutical formulation. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, 7, p. 363-369, 2003.

DICKMAN, E. J.; LEVITSKY, L. Oral Agents in Managing Diabetes Mellitus in Children and Adolescents. **Pediatric Clinics of North America**, 52, p. 1689-1703, 2005.

DONG, Y.; NG, W. K.; HU, J.; SHEN, S.; TAN, R. B. H. A continuous and highly effective static mixing process for antisolvent precipitation of nanoparticles of poorly water-soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, 386, p. 256-261, 2010.

DONG, Y.; NG, W. K.; SHEN, S.; KIM, S.; TAN, R. B. H. Preparation and characterization of spironolactone nanoparticles by antisolvent precipitation. **International Journal of Pharmaceutics**, 375, p. 84-88, 2009.

DRESSMAN, J.; BUTLER, J.; HEMPENSTALL, J.; REPPAS, C. The BCS: Where do we go from here? **Pharmaceutical Technology**, p. 68-76, 2001.

EERDENBRUGH, B. V.; FROYEN, L.; HUMBEECK, J. V.; MARTENS, J. A.; AUGUSTIJNS, P.; MOOTER, G. V. den. Drying of crystalline drug nanosuspensions – The importance of surface hydrophobicity on dissolution behavior upon redispersion. **European journal of Pharmaceutical Sciences**, 35, p. 127-135, 2008.

EERDENBRUGH, B. V.; MOOTER, G. V. de.; AUGUSTIJNS, P. Top-down production of drugs nanocrystals: Nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solids products. **International Journal of Pharmaceutics**, 364, p.64-75, 2008.

ERRIGUIBLE, A.; FADLI, T.; SUBRA-PATERNAULT, P. A complete 3D simulation of a crystallization process induced by supercritical CO₂ to predict particle size. **Computers and Chemical Engineering**, 52, p. 1-9, 2013.

FILHO, E. Q. da S. **Estudo de propriedades físico-químicas da glibenclamida que influem sobre resultados do ensaio de dissolução para medicamento similar e genérico**. 2011. 91 p. Dissertação (Mestre em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

FUENTE BADILLA, J. C. de la.; PETERS, C. J.; SWAAN ARONS, J. de. Volume expansion in relation to the gas-antisolvent process. **Journal of Supercritical Fluids**, 17, p. 13-23, 2000.

GALDOS, A. A. G. **Desenvolvimento de metodologias indicativas de estabilidade para medicamentos que atuam no diabetes mellitus tipo II**. 2012. 156 p. Tese (Doutor em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

GUAN, J.; HAN, J.; ZHANG, D.; CHU, C.; LIU, H.; SUN, J.; HE, Z.; ZHANG, T. Increased dissolution rate and oral bioavailability of hydrophobic drug glyburide tablets produced using supercritical CO₂ silica dispersion technology. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2013.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HASSAN, M. A.; NAJIB, N. M.; SULEIMAN, M. S. Characterization of glibenclamide glassy state. **International Journal of Pharmaceutics**, 67, p. 131-137, 1991.

HATTORI, Y.; HARUNA, Y.; OTSUKA, M. Dissolution process analysis using model-free Noyes–Whitney integral equation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 102, p. 227-231, 2013.

HEDAYAT, A. S.; SLOANE, N. J. A.; STUFKEN, J. **Orthogonal Arrays: Theory and Applications**. New York: Springer, 1999.

HEZAVE, A. Z.; AFTAB, S.; ESMAELZADEH, F. Micronization of creatine monohydrate via Rapid Expansion of Supercritical Solution. **Journal of Supercritical Fluids**, 55, p. 316-324, 2010.

HIEMENZ, P. C.; RAJAGOPALAN, R. **Principles of Colloid and Surface Chemistry**. 3 ed. New York, Marcel Dekker, 1997.

ICH – INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Impurities: **Guideline for Residual Solvents**. 2011. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3C/Step4/Q3C_R5_Step4.pdf>. Acesso em novembro de 2013.

IRISAPPAN, S. C.; KUMAR, B. P.; JAYAVEERA, K. N. Characterization of Glibenclamide loaded cellulose acetate microparticles prepared by an emulsion solvent evaporation method. **Journal of Pharmacy Research**, 7, p. 766-773, 2013.

JIANG, B.; WU, L.; WANG, R. Sulphonylureas induced vasorelaxation of mouse arteries. **European Journal of Pharmacology**, 577, p. 124-128, 2007.

JUNG, J.; PERRUT, M. Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. **Journal of Supercritical Fluids**, 20, p. 179-219, 2001.

KECK, C. M.; MÜLLER, R. H. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 62, p. 3-16, 2006.

KESISOGLOU, F. PANMAI, S. WU, Y. Nanosizing – Oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 59, p. 631-644, 2007.

KIM, S.; KIM, H. YEO, S. Crystallization of silibinin from organic solutions using supercritical and aqueous antisolvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, 85, p. 102-109, 2014.

KIMMEL, B.; INZUCCHI, S. E. Oral Agents for Type 2 Diabetes: An Update. **Clinical Diabetes**, v. 23, n. 2, p. 64-76, 2005.

KRAUSER, K. P.; MÜLLER, R. H. Production and characterisation of highly concentrated nanosuspensions by high pressure homogenization. **International Journal of Pharmaceutics**, 214, p. 21-24, 2001.

KUNDU, P.; AGRAWAL, A.; MATEEN, H.; MISHRA, I. M. Stability of oil-in-water macro-emulsion with anionic surfactant: Effect of electrolytes and temperature. **Chemical Engineering Science**, 102, p.176-185, 2013.

LAUTATZIS, M.; GOULIS, D. G.; VRONTAKIS, M. Efficacy and safety of Metformin during pregnancy in women with gestational diabetes mellitus or polycystic ovary syndrome: A systematic review. **Metabolism Clinical and Experimental**, 62, p. 1522-1534, 2013.

LI, N.; DENG, Y.; WANG, D.; QIAO, Y.; LI, F. Determination of glibenclamide and puerarin in rat plasma by UPLC-MS/MS: Application to their pharmacokinetic interaction study. **Talanta**, 104, p. 109-115, 2013.

LI, X.; WANG, J.; SHEN, Z.; ZHANG, P.; CHEN, J.; YUN, J. Preparation of uniform prednisolone microcrystals by a controlled microprecipitation method. **International Journal of Pharmaceutics**, 342, p. 26-32, 2007.

LIFSHITZ, I. M.; SLYOZOV, V. V. The Kinetics of Precipitation from Supersaturated Solid Solutions. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, 19, p. 35-50, 1961.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 58, p. 265-278, 2004.

LINDNER, L.; GARCÍA-SÁNCHEZ, R.; ALVAREZ, C.; BETEGÓN, L.; BADIA, X. Hospitalizations due to severe hypoglycemia in patients with diabetes mellitus in Spain. **Revista Clínica Española**, 213 (8), p. 370-376, 2013.

MALVERN. **A Basic Guide to Particle Characterization**. 2014. Disponível em: <<http://www.malvern.com/en/pdf/secure/WP120620BasicGuidePartChar.pdf>>. Acesso em agosto de 2014.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. 2003. 117 p. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARTINS, J.; NERY, C. G. C.; PIANETTI, G. A.; VIANA-JÚNIOR, N. de S.; VIANNA-SOARES, C. D. Determinação da glibenclamida por espectrofotometria derivada no ultravioleta para avaliação do teste ou perfil de dissolução de comprimidos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, p. 63-70, 2007.

MEENAN, P. A.; ANDERSON, S. R.; KLUG, D. L. The influence of impurities and solvents on crystallization. In: Allan S. Myerson. **Handbook of Industrial Crystallization**. 2 ed. 2001. cap. 3, p. 67-100.

MIDOUX, N.; HOSEK, P.; PAILLERES, L.; AUTHELIN, J. R. Micronization of pharmaceutical substances in a spiral jet mill. **Powder Technology**, 104, p. 113-120, 1999.

MOITA, N. F. V. C. **Implementação do método Taguchi e análise de experiências na fase de testes de moldes para injeção de plásticos**. 2007. 108 p. Dissertação (Mestre em Engenharia Mecânica) – Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2007.

- MONTGOMERY, D. C. **Design Analysis of Experiments**. 5 ed. John Wiley & Sons, 2001.
- MORIBE, K.; TOZUKA, Y.; YAMAMOTO, K. Supercritical carbon dioxide processing of active pharmaceutical ingredients for polymorphic control and for complex formation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 60,p. 328-338, 2008.
- MÜLLER, R. H.; JACOBS, C.; KAYSER, O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy Rationale for development and what we can expect for the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 47, p. 3-19, 2001.
- MULLIN, J. W. **Crystallization**. 4 ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2001.
- MYERSON, A. S.; GINDE, R. Crystal, crystal growth, and nucleation. In: MYERSON, Allan S. **Handbook of Industrial Crystallization**. Londres: Butterworth-Heinemann, 1993. cap.2, p. 33-65.
- NAKATA, B.; ISHIKAWA, T.; AMANO, R.; KIMURA, K.; HIRAKAWA, K. Impact of preoperative diabetes mellitus on clinical outcome after pancreatectomy. **International Journal of Surgery**, 11, p. 757-761, 2013.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006.
- NERY, C. G. C.; PIRES, M. A. da S.; PIANETTI, G. A.; VIANNA-SOARES, C. D. Caracterização do fármaco hipoglicemiante glibenclamida. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 44, p. 61-73, 2008.
- NETO, B. de B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2 ed. Campinas: Editora Unicamp, 2001.
- NETO, S. A. de L. **Preparação e caracterização analítica de dispersões sólidas cristalinas de glibenclamida, obtidas através de secagem por aspersão**. 2012. 102 p. Tese (Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.
- PANAGOPOULOU-KAPLANI, A.; MALAMATARIS, S. Preparation and characteriazation of a new insoluble polymorphic form of glibenclamide. **International Journal of Pharmaceuticals**, 195, p. 239-246, 2000.
- PAPADOPOULOU, V.; VALSAMI, G.; DOKOUMETZIDIS, A.; MACHERAS, P. Biopharmaceutics classification systems for new molecular entities (BCS-NMEs) and marketed drugs (BCS-MD): Theoretical basis and practical examples. **International Journal of Pharmaceutics**, 361, p. 70-77, 2008.
- PARAISO, R. L. M. **Determinação da solubilidade e permeabilidade de fármacos conforme o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)**. 2012. 141 p. Dissertação (Mestre em Fármaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

PARK, J.; CHO, W.; KANG, H.; LEE, B. B. J.; KIM, T. S.; HWANG, S. Effect of operating parameters on PVP/tadalafil solid dispersions prepared using supercritical anti-solvent process. **The Journal of Supercritical Fluids**, 90, p. 126-133, 2014.

PARK, S.; YEO, S. Recrystallization of caffeine using gas antisolvent process. **Journal of Supercritical Fluids**, 47, p. 85-92, 2008.

PETHRICK, R. A. **Polymer Structure Characterization: From Nano to Macro Organization in Small Molecules and Polymers**. 2 ed. Cambridge: RSC Publishing, 2014.

PUIGJANER, C.; PROHENS, R. Polimorfismo en la industria farmacêutica. **El Farmacéutico**, n. 373, p. 58-68, 2007.

RABINOW, B. E. Nanosuspensions in drug delivery. **Nature Reviews: Drug Discovery**, 3, p. 785-796, 2004.

RASENACK, N.; HARTENHAUER, H.; MÜLLER, B. W. Microcrystals for dissolution rate enhancement of poorly water-soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, 254, p. 137-145, 2003.

RASENACK, N.; STECKEL, H.; MÜLLER, B. W. Preparation of microcrystals by in situ micronization. **Powder Technology**, 143-144, p. 291-296, 2004.

REHDER, S.; SAKMANN, A.; RADES, T.; LEOPOLD, C. S. Thermal degradation of amorphous glibenclamide. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 80, p. 203-208, 2012.

REVERCHON, E.; ADAMI, R. Nanomaterials and supercritical fluids. **Journal of Supercritical Fluids**, 37, p. 1-22, 2006.

REVERCHON, E.; MARCO, de I.; TORINO, E. Nanoparticles production by supercritical antisolvent precipitation: A general interpretation. **Journal of Supercritical Fluids**, 43, p. 126-138, 2007.

RIBEIRO, A. L. P.; POLANCZYK, C. A.; NASCIMENTO, C. A. L. do.; NOGUEIRA, J. L. dos S.; CARVALHO, R. S. V. N. de. **Cadernos de Atenção Básica: Diabetes Mellitus**. n. 16, p. 56, 2006. Disponível em: <http://189.28.128.100/dab/docs/publicacoes/cadernos_ab/abcad16.pdf>. Acesso em novembro de 2013.

RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos**. 2 ed. Campinas, Cárita, 2009.

ROSSMANN, M.; BRAEUER, A.; LEIPERTZ, A.; SCHLUECKER, E. Manipulating the size, the morphology and the polymorphism of acetaminophen using supercritical antisolvent (SAS) precipitation. **The Journal of Supercritical Fluids**, 82, p. 230-237, 2013.

ROY, R. K. **A Primer on the Taguchi Method**. 2 ed. Michigan: Society of Manufacturing Engineers, 2010.

- SAGREIRA, L. Sulfonilureias. **Acta Médica Portuguesa**, p. 9-13, 1989.
- SAIFEE, M.; INAMDAR, N.; DHAMECHA, D. L.; RATHI, A. A. Drug Polymorphism: A review. **International Journal of Health Research**, 2 (4), p. 291-306, 2009.
- SALAZAR, J.; GHANEM, A.; MÜLLER, R. H.; MÖSCHWITZER, J. P. Nanocrystals: Comparison of the size reduction effectiveness of a novel combinative method with conventional top-down approaches. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 81, p. 82-90, 2012.
- SALAZAR, J.; MÜLLER, R. H.; MÖSCHWITZER, J. P. Application of the combinative particle size reduction technology H 42 to produce fast dissolving glibenclamide tablets. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 49, 0. 565-577, 2013.
- SANE, A.; LIMTRAKUL, J. Formation of retinyl palmitate-loaded poly(l-lactide) nanoparticles using rapid expansion of supercritical solutions into liquid solvents (RESOLV). **The Journal of Supercritical Fluids**, 51, p. 230-237, 2009.
- SANTOS, A. F. O. **Desenvolvimento de métodos analíticos para a associação de metformina + glibenclamida em comprimidos**. 2006. 76 p. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.
- SANTOS, K. R. G. dos. **Estudos farmacométricos da interação da rifampicina e glibenclamida em tratamentos concomitantes de Diabetes Melito e Tuberculose**. 2007. 171 p. Dissertação (Mestre em Clínica Médica) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
- SARKAR, A.; TIWARI, A.; BHASIN, P. S.; MITRA, M. Pharmacological and Pharmaceutical Profile of Gliclazide: A Review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 1 (9), p. 11-19, 2011.
- SCHRAMM, L.; STASIUK, E. N.; MARANGONI, D. G. Surfactants and their applications. **Annu. Rep. Prog. Chem.**, 99, p.3-48, 2003.
- SETHIA, S.; SQUILLANTE, E. Solid Dispersions: Revival with Greater Possibilities and Applications in Oral Drug Delivery. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, 20, p. 215-247, 2003.
- SHAH, S. R.; PARIKH, R. H.; CHAVDA, J. R.; SHETH, N. R. Application of Plackett–Burman screening design for preparing glibenclamide nanoparticles for dissolution enhancement. **Powder Technology**, 235, p. 405–411, 2013.
- SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug dissolution. **International Journal of Pharmaceutics**, 453, p. 12-24, 2013.
- SOARES, V. B. **Análise Crítica das Camadas de Proteção Exigidas pela NR 13 e sua Adequação para Processos de Extração Supercrítica**. 2010. 114 p. Dissertação (Mestre em Ciência) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

SOARES, V. F. **Dispersão e Estabilização de Partículas Submicrométricas de óxido de alumínio em sistemas líquidos destinados à produção de materiais refratários**. 2009. 117 p. Dissertação (Mestre em Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

THAKUR, R.; GUPTA, R. B. Formation of phenytoin nanoparticles using rapid expansion of supercritical solution with solid cosolvent (RESS-SC) process. **International Journal of Pharmaceutics**, 308, p. 190-199, 2006.

TILLER, P. R.; LAND, A. P.; JARDINE, I.; MURPHY, D. M.; SOZIO, R.; AYRTON, A.; SCHAEFER, W. H. Application of liquid chromatography-mass spectrometryⁿ analyses to the characterization of novel glyburide metabolites formed *in vitro*. **Journal of Chromatography A**, 794, p. 15-25, 1998.

TÜRK, M.; HELFGEN, B.; HILS, P.; LIETZOW, R.; SCHABER, K. Formation of nanoscale drugs by Rapid Expansion of Supercritical Solutions (RESS): - Experimental and theoretical investigations. In: BRUNNER, G. **Supercritical Fluids as Solvents and Reaction Media**. 1. ed. Elsevier, 2004. Cap. 3.3, p. 449-462.

VANDANA, K. R.; RAJU, Y. P.; CHOWDARY, V. H.; SUSHMA, M.; KUMAR, N. V. An overview on *in situ* micronization technique – An emerging novel concept in advanced drug delivery. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2013.

VERMA, S.; KUMAR, S.; GOKHALE, R.; BURGESS, D. J. Physical stability of nanosuspensions: Investigation of the role of stabilizers on Ostwald ripening. **International Journal of Pharmaceutics**, 406, p. 145-152, 2011.

VERMA, S.; GOKHALE, R.; BURGESS, D. J. A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of micro/nanosuspensions. **International Journal of Pharmaceutics**, 380, p. 216-222, 2009.

VERMA, S.; HUEY, B. D.; BURGESS, D. J. Scanning Probe Microscopy Method for Nanosuspension Stabilizer Selection. **Langmuir**, 25 (21), p. 12481-12487, 2009.

WANG, L.; LIN, S. A predictive method for the solubility of drug in supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, 85, p. 81-88, 2014.

WANG, Z.; CHEN, J.; LE, Y.; SHEN, Z. Preparation of Ultrafine Beclomethasone Diprionate Drug Powder by Antisolvent Precipitation. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 46, p. 4839-4845, 2007.

WEBER, M.; THIES, M. C. A simplified and generalized model for the rapid expansion of supercritical solutions. **The Journal of Supercritical Fluids**, 40, p. 402-419, 2007.

WEI, H.; DALTON, C.; MASO, M. D.; KANFER, I.; LÖBENBERG, R. Physicochemical characterization of five glyburide powders: A BCS based approach to predict oral absorption. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 69, p. 1046-1056, 2008.

WEY, J. S.; KARPINSKI, P. H. Bath crystallization. In: MYERSON, Allan S. **Handbook of Industrial Crystallization**. Londres: Butterworth-Heinemann, 2001. cap.10, p. 231-248, 2001.

World Health Organization (WHO). **Diabetes**. 2013a. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>>. Acesso em outubro de 2013.

World Health Organization (WHO). **Model List of Essential Medicines**. 18 ed. 2013b. Disponível em: < http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/93142/1/EML_18_eng.pdf?ua=1>. Acesso em setembro de 2013.

YAMATO, E.; IKEGAMI, H.; TAHARA, Y.; FUKUDA, M.; CHA, T.; KAWAGUCHI, Y.; FUJIOKA, Y.; NOMA, Y.; SHIMA, K.; OGIHARA, T. Cellular mechanism of glyburide-induced insulin gene expression in isolated rat islets. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 197, n. 2, p. 957-964, 1993.

YAO, J. H.; ELDER, K. R.; GUO, H.; GRANT, M. Theory and simulation of Ostwald ripening. **Physical Review B**, 47, p. 110-125, 1993.

YI, C.; LEE, J.; KWAK, B. S.; LIN, M. X.; KIM, H. O.; JUNG, H. Diagnosis of diabetes mellitus using sialic acid expression of erythrocyte and a microfluidic resistive temperature detector (micro-RTD). **Sensors and Actuators B**, 191, p. 305-312, 2014.

YU, L.; LI, C.; LE, Y.; CHEN, J.; ZOU, H. Stabilized amorphous glibenclamide nanoparticles by high-gravity technique. **Materials Chemistry and Physics**, 130, p. 361-366, 2011.

YUKSEL, N.; KANIK, A. E.; BAYKARA, T. Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and -independent methods. **International Journal of Pharmaceutics**, 209, p. 57-67, 2000.

ZACARELLI, M. A. Hipoglicemiantes Orais. **CIR. VASC. ANG.**, 3 (2), p. 9-14, 1987.

ZHANG, H.; WANG, J.; ZHANG, Z.; LE, Y.; SHEN, Z.; CHEN, J. Micronization of atorvastatin calcium by antisolvent precipitation process. **International Journal of Pharmaceutics**, 374, p. 106-113, 2009.

ZHANG, J.; SHEN, Z.; ZHONG, J.; HU, T.; CHEN, J.; MA, Z.; YUN, J. Preparation of amorphous cefuroxime axetil nanoparticles by controlled nanoprecipitation method without surfactants. **International Journal of Pharmaceutics**, 323, p. 153-160, 2006.

ZHAO, X.; SONG, K.; WANG, S.; ZU, Y.; LI, N.; YU, X. Micronization of the Pharmaceutically Active Agent Genipin by an Antisolvent Precipitation Process. **Chemical Engineering Technology**, v. 36, n. 1, p. 33-42, 2013.

ANEXO I



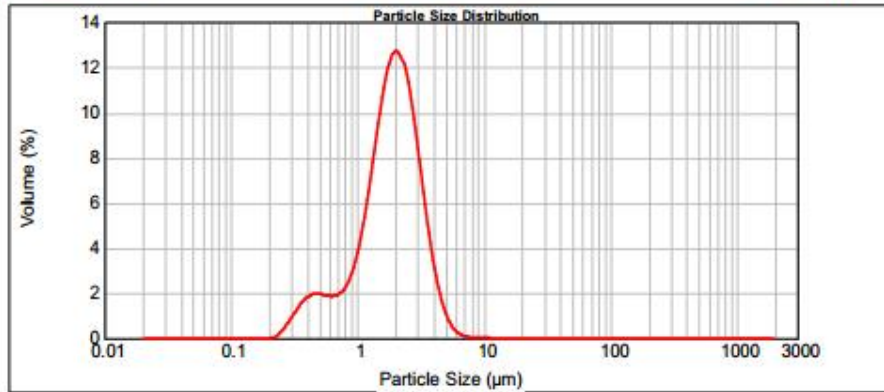
Result Analysis Report

Sample Name: - Average inicial
 Sample Source & type:
 Sample bulk lot ref:
 SOP Name:
 Measured by: Guest
 Result Source: Averaged
 Measured: segunda-feira, 30 de junho de 2014 15:04:33
 Analysed: segunda-feira, 30 de junho de 2014 15:04:34

Particle Name: Default
 Particle RI: 1.520
 Dispersant Name: Water
 Accessory Name: Hydro 2000MU (A)
 Absorption: 0.1
 Dispersant RI: 1.330
 Analysis model: General purpose
 Size range: 0.020 to 2000.000 um
 Weighted Residual: 3.916 %
 Sensitivity: Normal
 Obscuration: 20.71 %
 Result Emulation: Off

Concentration: 0.0052 %Vol
 Specific Surface Area: 4.46 m²/g
 Span: 1.402
 Surface Weighted Mean D[3,2]: 1.346 um
 Uniformity: 0.424
 Vol. Weighted Mean D[4,3]: 1.969 um
 Result units: Volume

d(0.1): 0.669 um d(0.5): 1.862 um d(0.9): 3.279 um



Size (um)	Volume In %	Size (um)	Volume In %	Size (um)	Volume In %	Size (um)	Volume In %	Size (um)	Volume In %	Size (um)	Volume In %
0.010	0.00	0.105	0.00	1.006	5.23	11.482	0.00	120.226	0.00	1258.025	0.00
0.011	0.00	0.120	0.00	1.259	7.29	13.183	0.00	136.038	0.00	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.138	0.00	1.445	9.36	15.136	0.00	156.489	0.00	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.158	0.00	1.660	10.93	17.378	0.00	181.970	0.00	1905.461	0.00
0.017	0.00	0.182	0.00	1.905	11.51	19.963	0.00	208.930	0.00	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.209	0.06	2.188	10.89	22.909	0.00	239.883	0.00	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.240	0.07	2.512	9.20	26.303	0.00	275.423	0.00	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.275	0.37	2.884	6.91	30.200	0.00	316.228	0.00	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.316	0.79	3.311	6.91	34.624	0.00	363.078	0.00	3801.694	0.00
0.035	0.00	0.363	1.25	3.802	4.59	39.611	0.00	416.869	0.00	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.417	1.80	4.365	2.88	45.709	0.00	478.630	0.00	5011.872	0.00
0.046	0.00	0.479	1.77	5.012	1.36	52.481	0.00	549.541	0.00	5754.309	0.00
0.052	0.00	0.550	1.75	5.754	0.80	60.256	0.00	630.957	0.00	6606.934	0.00
0.060	0.00	0.631	1.89	6.607	0.22	69.183	0.00	724.436	0.00	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.724	1.95	7.586	0.03	79.433	0.00	831.764	0.00	8706.636	0.00
0.079	0.00	0.832	2.53	8.710	0.01	91.201	0.00	954.993	0.00	10000.000	0.00
0.091	0.00	0.955	3.61	10.000	0.01	104.713	0.00	1096.478	0.00		
0.105	0.00	1.096	3.61	11.482	0.01	120.226	0.00	1258.025	0.00		

Operator notes:



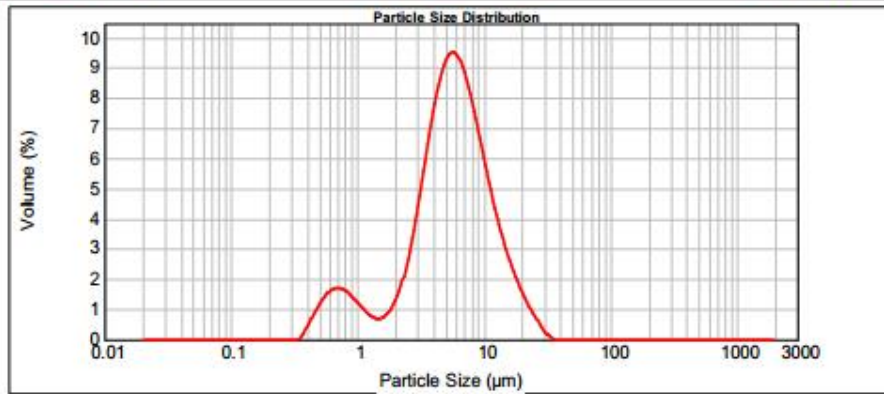
Result Analysis Report

Sample Name: - Average 1
Sample Source & type:
Sample bulk lot ref:
SOP Name:
Measured by: Guest
Result Source: Averaged
Measured: quarta-feira, 30 de julho de 2014
Analysed: quarta-feira, 30 de julho de 2014

Particle Name: Default
Particle RI: 1.520
Dispersant Name: Water
Accessory Name: Hydro 2000MU (A)
Absorption: 0.1
Dispersant RI: 1.330
Analysis model: General purpose
Size range: 0.020 to 2000.000 μm
Weighted Residual: 3.765 %
Sensitivity: Normal
Obscuration: 11.86 %
Result Emulation: Off

Concentration: 0.0063 %Vol
Specific Surface Area: 1.92 m^2/g
Span : 2.103
Surface Weighted Mean D[3,2]: 3.125 μm
Uniformity: 0.623
Vol. Weighted Mean D[4,3]: 6.671 μm
Result units: Volume

d(0.1): 1.286 μm **d(0.5):** 5.556 μm **d(0.9):** 12.970 μm



Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %
0.010	0.00	0.105	0.00	1.096	0.83	11.482	3.90	120.226	0.00	1258.025	0.00
0.011	0.00	0.130	0.00	1.259	0.87	13.183	3.04	138.038	0.00	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.138	0.00	1.445	0.85	15.136	2.33	158.489	0.00	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.155	0.00	1.660	0.81	17.378	1.73	181.970	0.00	1965.461	0.00
0.017	0.00	0.182	0.00	1.905	1.23	19.963	1.22	208.930	0.00	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.209	0.00	2.188	1.97	22.969	0.80	239.883	0.00	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.240	0.00	2.512	3.05	26.303	0.36	275.423	0.00	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.275	0.00	2.884	4.38	30.200	0.11	318.228	0.00	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.316	0.00	3.311	5.81	34.674	0.00	363.078	0.00	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.363	0.01	3.802	7.11	39.811	0.00	418.869	0.00	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.417	0.33	4.365	8.55	45.709	0.00	478.630	0.00	5011.872	0.00
0.046	0.00	0.479	0.75	5.012	10.08	52.481	0.00	540.541	0.00	5754.399	0.00
0.052	0.00	0.550	1.13	5.754	11.85	60.258	0.00	609.957	0.00	6608.504	0.00
0.060	0.00	0.631	1.42	6.607	13.88	69.183	0.00	687.438	0.00	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.724	1.50	7.586	16.14	79.433	0.00	774.784	0.00	8700.636	0.00
0.079	0.00	0.832	1.32	8.710	18.68	91.201	0.00	871.993	0.00	9969.636	0.00
0.091	0.00	0.955	1.07	10.000	21.54	104.713	0.00	986.478	0.00	11410.000	0.00
0.105	0.00	1.096	1.07	11.482	24.89	120.226	0.00	1128.025	0.00	13040.000	0.00

Operator notes:



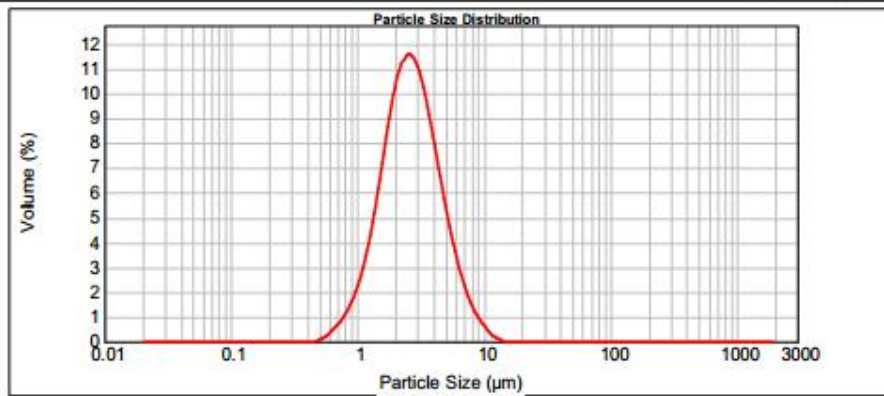
Result Analysis Report

Sample Name: - Average 2
Sample Source & type:
Sample bulk lot ref:
SOP Name:
Measured by: Guest
Result Source: Averaged
Measured: quarta-feira, 30 de julho de 2014
Analysed: quarta-feira, 30 de julho de 2014

Particle Name: Default
Particle RI: 1.520
Dispersant Name: Water
Accessory Name: Hydro 2000MU (A)
Absorption: 0.1
Dispersant RI: 1.330
Analysis model: General purpose
Size range: 0.020 to 2000.000 μm
Weighted Residual: 4.174 %
Sensitivity: Normal
Obscuration: 10.98 %
Result Emulation: Off

Concentration: 0.0034 %Vol
Specific Surface Area: 2.64 m^2/g
Span : 1.510
Surface Weighted Mean D[3,2]: 2.269 μm
Uniformity: 0.476
Vol. Weighted Mean D[4,3]: 3.032 μm
Result units: Volume

d(0.1): 1.324 μm **d(0.5):** 2.610 μm **d(0.9):** 5.265 μm



Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %
0.010	0.00	0.105	0.00	1.096	3.14	11.482	0.15	120.226	0.00	1258.025	0.00
0.011	0.00	0.120	0.00	1.299	4.53	13.183	0.02	138.038	0.00	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.138	0.00	1.445	6.22	15.136	0.00	158.489	0.00	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.158	0.00	1.660	8.00	17.378	0.00	181.970	0.00	1965.461	0.00
0.017	0.00	0.182	0.00	1.905	9.48	19.963	0.00	208.930	0.00	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.209	0.00	2.188	10.33	22.909	0.00	239.883	0.00	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.240	0.00	2.512	10.40	26.303	0.00	275.423	0.00	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.275	0.00	2.884	9.75	30.200	0.00	316.228	0.00	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.316	0.00	3.311	8.56	34.674	0.00	363.078	0.00	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.363	0.00	3.802	7.07	39.811	0.00	416.869	0.00	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.417	0.00	4.365	5.52	45.709	0.00	478.630	0.00	5011.672	0.00
0.046	0.00	0.479	0.00	5.012	4.10	52.481	0.00	549.541	0.00	5754.399	0.00
0.052	0.00	0.550	0.11	5.754	2.90	60.256	0.00	630.957	0.00	6606.504	0.00
0.060	0.00	0.631	0.27	6.607	1.97	69.183	0.00	724.438	0.00	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.724	0.91	7.586	1.27	79.433	0.00	831.764	0.00	8706.636	0.00
0.079	0.00	0.832	1.41	8.710	0.78	91.201	0.00	954.993	0.00	10000.000	0.00
0.091	0.00	0.955	1.41	10.000	0.42	104.713	0.00	1096.478	0.00		
0.105	0.00	1.096	2.13	11.482		120.226	0.00	1258.025	0.00		

Operator notes:



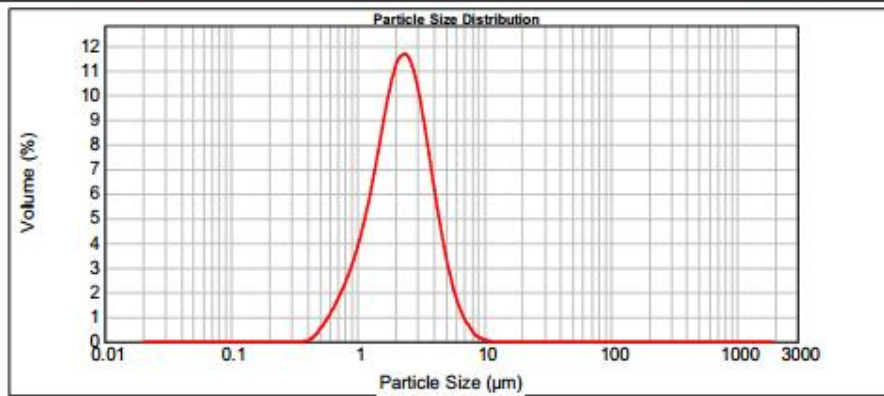
Result Analysis Report

Sample Name: - Average 3
Sample Source & type:
Sample bulk lot ref:
SOP Name:
Measured by: Guest
Result Source: Averaged
Measured: quarta-feira, 30 de julho de 2014
Analysed: quarta-feira, 30 de julho de 2014

Particle Name: Default
Particle RI: 1.520
Dispersant Name: Water
Accessory Name: Hydro 2000MU (A)
Absorption: 0.1
Dispersant RI: 1.330
Analysis model: General purpose
Size range: 0.020 to 2000.000 μm
Weighted Residual: 3.355 %
Sensitivity: Normal
Obscuration: 10.35 %
Result Emulation: Off

Concentration: 0.0028 %Vol
Specific Surface Area: 3.23 m^2/g
Span : 1.438
Surface Weighted Mean D[3,2]: 1.856 μm
Uniformity: 0.452
Vol. Weighted Mean D[4,3]: 2.484 μm
Result units: Volume

d(0.1): 1.044 μm **d(0.5):** 2.218 μm **d(0.9):** 4.233 μm



Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %
0.010	0.00	0.105	0.00	1.096	4.70	11.482	0.00	120.226	0.00	1258.025	0.00
0.011	0.00	0.120	0.00	1.299	4.70	13.183	0.00	138.038	0.00	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.138	0.00	1.445	6.06	15.136	0.00	158.489	0.00	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.158	0.00	1.660	9.06	17.378	0.00	181.970	0.00	1965.461	0.00
0.017	0.00	0.182	0.00	1.905	10.15	19.963	0.00	208.930	0.00	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.209	0.00	2.188	10.53	22.909	0.00	239.883	0.00	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.240	0.00	2.512	10.08	26.303	0.00	275.423	0.00	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.275	0.00	2.884	8.87	30.200	0.00	316.228	0.00	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.316	0.00	3.311	8.87	34.674	0.00	363.078	0.00	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.363	0.00	3.802	7.21	39.811	0.00	416.869	0.00	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.417	0.01	4.365	5.42	45.709	0.00	478.630	0.00	5011.672	0.00
0.046	0.00	0.479	0.19	5.012	3.76	52.481	0.00	549.541	0.00	5754.399	0.00
0.052	0.00	0.550	0.51	5.754	2.42	60.256	0.00	630.957	0.00	6606.504	0.00
0.060	0.00	0.631	0.92	6.607	1.43	69.183	0.00	724.438	0.00	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.724	2.02	7.586	0.98	79.433	0.00	831.764	0.00	8706.636	0.00
0.079	0.00	0.832	2.72	8.710	0.73	91.201	0.00	954.993	0.00	10000.000	0.00
0.091	0.00	0.955	3.60	10.000	0.52	104.713	0.00	1096.478	0.00		
0.105	0.00	1.096	3.60	11.482	0.32	120.226	0.00	1258.025	0.00		

Operator notes:



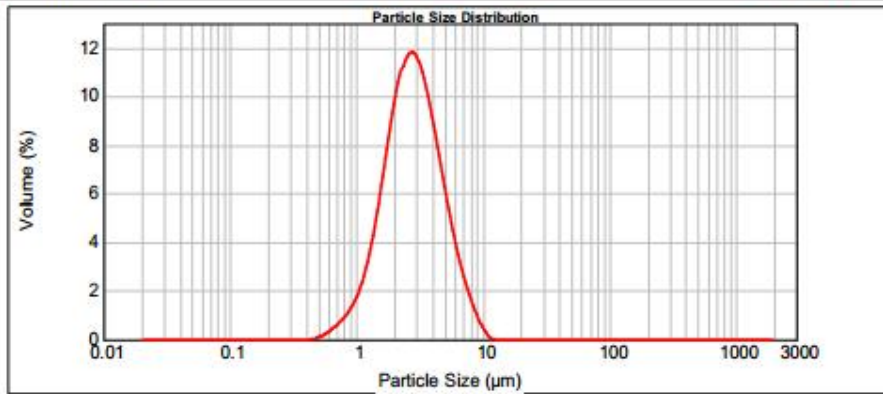
Result Analysis Report

Sample Name: - Average 4
Sample Source & type:
Sample bulk lot ref:
SOP Name:
Measured by: Guest
Result Source: Averaged
Measured: quarta-feira, 30 de julho de 2014
Analysed: quarta-feira, 30 de julho de 2014

Particle Name: Default
Particle RI: 1.520
Dispersant Name: Water
Accessory Name: Hydro 2000MU (A)
Absorption: 0.1
Dispersant RI: 1.330
Analysis model: General purpose
Size range: 0.020 to 2000.000 μm
Weighted Residual: 3.754 %
Sensitivity: Normal
Obscuration: 11.74 %
Result Emulation: Off

Concentration: 0.0039 %Vol
Specific Surface Area: 2.51 m^2/g
Span : 1.448
Surface Weighted Mean D[3,2]: 2.389 μm
Uniformity: 0.447
Vol. Weighted Mean D[4,3]: 3.145 μm
Result units: Volume

d(0.1): 1.413 μm **d(0.5):** 2.762 μm **d(0.9):** 5.413 μm



Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %
0.010	0.00	0.105	0.00	1.096	2.52	11.482	0.00	120.226	0.00	1258.025	0.00
0.011	0.00	0.130	0.00	1.299	2.52	13.183	0.00	138.038	0.00	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.138	0.00	1.445	5.41	15.136	0.00	158.489	0.00	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.155	0.00	1.660	7.28	17.378	0.00	181.970	0.00	1965.461	0.00
0.017	0.00	0.182	0.00	1.905	9.62	19.963	0.00	208.930	0.00	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.209	0.00	2.188	10.34	22.909	0.00	239.883	0.00	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.240	0.00	2.512	10.67	26.303	0.00	275.423	0.00	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.275	0.00	2.884	10.32	30.200	0.00	318.228	0.00	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.316	0.00	3.311	9.31	34.674	0.00	363.078	0.00	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.363	0.00	3.802	7.89	39.811	0.00	418.869	0.00	4385.158	0.00
0.040	0.00	0.417	0.00	4.365	7.89	45.709	0.00	478.630	0.00	5011.672	0.00
0.046	0.00	0.479	0.01	5.012	6.31	52.481	0.00	540.541	0.00	5754.399	0.00
0.052	0.00	0.550	0.13	5.754	4.77	60.256	0.00	609.957	0.00	6606.504	0.00
0.060	0.00	0.631	0.27	6.607	3.40	69.183	0.00	674.438	0.00	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.724	0.49	7.586	2.29	79.433	0.00	731.764	0.00	8706.636	0.00
0.079	0.00	0.832	1.12	8.710	1.42	91.201	0.00	794.993	0.00	10000.000	0.00
0.091	0.00	0.955	1.67	10.000	0.72	104.713	0.00	1066.478	0.00		
0.105	0.00	1.096	1.67	11.482	0.23	120.226	0.00	1258.025	0.00		

Operator notes:



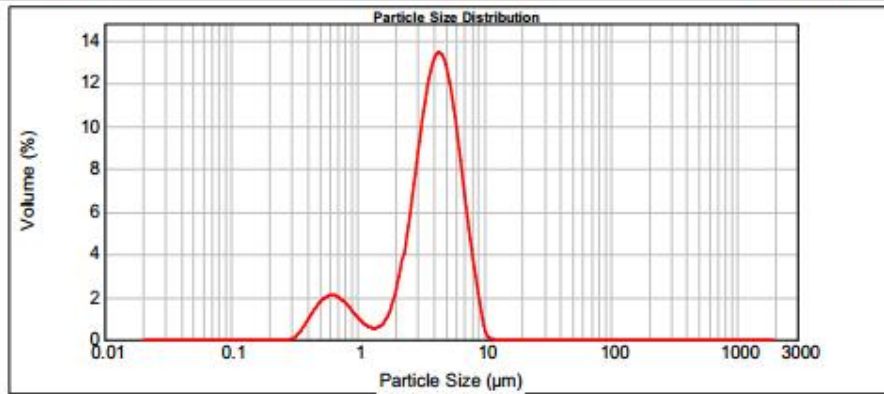
Result Analysis Report

Sample Name: - Average 5
Sample Source & type:
Sample bulk lot ref:
SOP Name:
Measured by: Guest
Result Source: Averaged
Measured: quarta-feira, 30 de julho de 2014
Analysed: quarta-feira, 30 de julho de 2014

Particle Name: Default
Particle RI: 1.520
Dispersant Name: Water
Accessory Name: Hydro 2000MU (A)
Absorption: 0.1
Dispersant RI: 1.330
Analysis model: General purpose
Size range: 0.020 to 2000.000 μm
Weighted Residual: 3.825 %
Sensitivity: Normal
Obscuration: 13.79 %
Result Emulation: Off

Concentration: 0.0058 %Vol
Specific Surface Area: 2.51 m^2/g
Span : 1.458
Surface Weighted Mean D[3,2]: 2.389 μm
Uniformity: 0.402
Vol. Weighted Mean D[4,3]: 4.078 μm
Result units: Volume

d(0.1): 0.906 μm **d(0.5):** 4.004 μm **d(0.9):** 6.745 μm



Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %
0.010	0.00	0.105	0.00	1.006	0.61	11.482	0.00	120.226	0.00	1258.025	0.00
0.011	0.00	0.130	0.00	1.259	0.48	13.183	0.00	138.038	0.00	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.138	0.00	1.445	0.60	15.136	0.00	158.489	0.00	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.155	0.00	1.660	1.09	17.378	0.00	181.970	0.00	1965.461	0.00
0.017	0.00	0.182	0.00	1.905	2.14	19.963	0.00	208.930	0.00	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.209	0.00	2.188	3.85	22.969	0.00	239.883	0.00	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.240	0.00	2.512	6.13	26.303	0.00	275.423	0.00	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.275	0.01	2.884	8.60	30.200	0.00	318.228	0.00	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.316	0.01	3.311	10.74	34.674	0.00	363.078	0.00	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.363	0.25	3.802	11.98	39.811	0.00	418.869	0.00	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.417	0.73	4.365	12.01	45.709	0.00	478.630	0.00	5011.672	0.00
0.046	0.00	0.479	1.23	5.012	10.78	52.481	0.00	549.541	0.00	5754.399	0.00
0.052	0.00	0.550	1.83	5.754	8.58	60.256	0.00	630.957	0.00	6606.504	0.00
0.060	0.00	0.631	1.84	6.607	5.97	69.183	0.00	724.438	0.00	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.724	1.83	7.586	3.50	79.433	0.00	831.764	0.00	8708.636	0.00
0.079	0.00	0.832	1.28	8.710	1.48	91.201	0.00	954.993	0.00	10000.000	0.00
0.091	0.00	0.955	0.90	10.000	0.11	104.713	0.00	1096.478	0.00		
0.105	0.00	1.096	0.00	11.482		120.226	0.00	1258.025	0.00		

Operator notes:



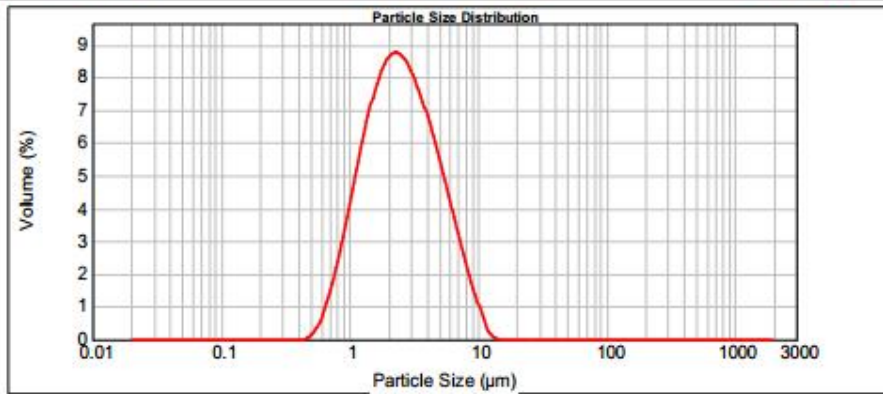
Result Analysis Report

Sample Name: - Average 6
Sample Source & type:
Sample bulk lot ref:
SOP Name:
Measured by: Guest
Result Source: Averaged
Measured: quarta-feira, 30 de julho de 2014
Analysed: quarta-feira, 30 de julho de 2014

Particle Name: Default
Particle RI: 1.520
Dispersant Name: Water
Accessory Name: Hydro 2000MU (A)
Absorption: 0.1
Dispersant RI: 1.330
Analysis model: General purpose
Size range: 0.020 to 2000.000 um
Weighted Residual: 4.049 %
Sensitivity: Normal
Obscuration: 11.58 %
Result Emulation: Off

Concentration: 0.0034 %Vol
Specific Surface Area: 2.93 m²/g
Span : 1.976
Surface Weighted Mean D[3,2]: 2.046 um
Uniformity: 0.607
Vol. Weighted Mean D[4,3]: 3.051 um
Result units: Volume

d(0.1): 1.080 um **d(0.5):** 2.453 um **d(0.9):** 5.928 um



Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %
0.010	0.00	0.105	0.00	1.096	4.92	11.482	0.15	120.228	0.00	1258.025	0.00
0.011	0.00	0.120	0.00	1.259	4.92	13.183	0.01	138.038	0.00	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.138	0.00	1.445	5.94	15.136	0.00	158.489	0.00	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.158	0.00	1.660	7.46	17.378	0.00	181.970	0.00	1965.461	0.00
0.017	0.00	0.182	0.00	1.905	7.83	19.963	0.00	208.930	0.00	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.209	0.00	2.188	7.91	22.909	0.00	239.883	0.00	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.240	0.00	2.512	7.73	26.303	0.00	275.423	0.00	2884.052	0.00
0.026	0.00	0.275	0.00	2.884	7.33	30.200	0.00	316.228	0.00	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.316	0.00	3.311	6.77	34.674	0.00	363.078	0.00	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.363	0.00	3.802	6.10	39.811	0.00	416.869	0.00	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.417	0.00	4.365	5.34	45.709	0.00	478.630	0.00	5011.672	0.00
0.046	0.00	0.479	0.00	5.012	4.53	52.481	0.00	549.541	0.00	5754.399	0.00
0.052	0.00	0.550	0.15	5.754	3.69	60.256	0.00	630.957	0.00	6606.504	0.00
0.060	0.00	0.631	0.52	6.607	2.88	69.183	0.00	724.438	0.00	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.724	1.82	7.596	2.08	79.433	0.00	831.784	0.00	8708.636	0.00
0.079	0.00	0.832	2.85	8.710	1.35	91.201	0.00	954.993	0.00	10000.000	0.00
0.091	0.00	0.955	3.87	10.000	0.70	104.713	0.00	1096.478	0.00		
0.105	0.00	1.096	3.87	11.482	0.70	120.228	0.00	1258.025	0.00		

Operator notes:



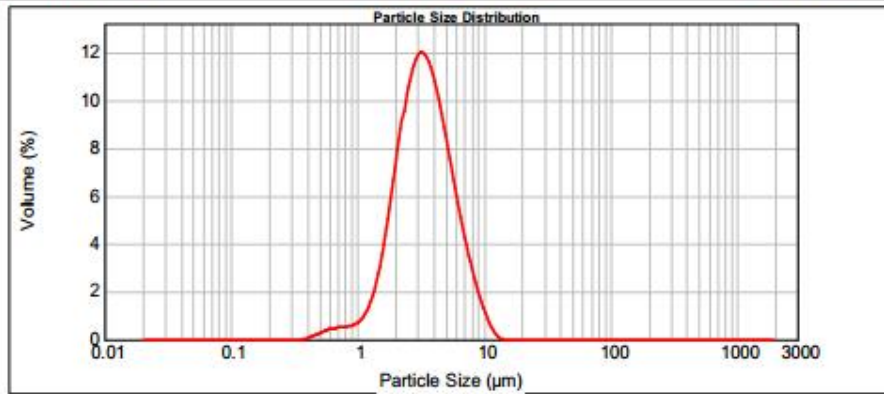
Result Analysis Report

Sample Name: - Average 7
SOP Name:
Measured: quarta-feira, 30 de julho de 2014
Sample Source & type:
Measured by: Guest
Analysed: quarta-feira, 30 de julho de 2014
Sample bulk lot ref:
Result Source: Averaged

Particle Name: Default
Accessory Name: Hydro 2000MU (A)
Analysis model: General purpose
Sensitivity: Normal
Particle RI: 1.520
Absorption: 0.1
Size range: 0.020 to 2000.000 um
Obscuration: 11.50 %
Dispersant Name: Water
Dispersant RI: 1.330
Weighted Residual: 3.602 %
Result Emulation: Off

Concentration: 0.0045 %Vol
Span : 1.419
Uniformity: 0.442
Result units: Volume
Specific Surface Area: 2.15 m²/g
Surface Weighted Mean D[3,2]: 2.795 um
Vol. Weighted Mean D[4,3]: 3.738 um

d(0.1): 1.729 um **d(0.5):** 3.299 um **d(0.9):** 6.411 um



Size (um)	Volume In %	Size (um)	Volume In %	Size (um)	Volume In %	Size (um)	Volume In %	Size (um)	Volume In %	Size (um)	Volume In %
0.010	0.00	0.105	0.00	1.096	1.04	11.482	0.24	120.226	0.00	1258.025	0.00
0.011	0.00	0.130	0.00	1.299	1.04	13.183	0.01	138.038	0.00	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.138	0.00	1.445	1.77	15.136	0.00	158.489	0.00	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.155	0.00	1.660	4.78	17.378	0.00	181.970	0.00	1965.461	0.00
0.017	0.00	0.182	0.00	1.905	6.86	19.963	0.00	208.930	0.00	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.209	0.00	2.188	8.82	22.909	0.00	239.883	0.00	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.240	0.00	2.512	10.23	26.303	0.00	275.423	0.00	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.275	0.00	2.884	10.94	30.200	0.00	318.228	0.00	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.316	0.00	3.311	10.62	34.674	0.00	363.078	0.00	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.363	0.00	3.802	9.72	39.811	0.00	418.869	0.00	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.417	0.03	4.365	8.72	45.709	0.00	478.630	0.00	5011.672	0.00
0.046	0.00	0.479	0.16	5.012	8.35	52.481	0.00	540.541	0.00	5754.399	0.00
0.052	0.00	0.550	0.28	5.754	6.79	60.256	0.00	609.957	0.00	6606.504	0.00
0.060	0.00	0.631	0.39	6.607	5.21	69.183	0.00	674.438	0.00	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.724	0.44	7.586	3.80	79.433	0.00	731.764	0.00	8706.636	0.00
0.079	0.00	0.832	0.47	8.710	2.58	91.201	0.00	794.993	0.00	10000.000	0.00
0.091	0.00	0.955	0.52	10.000	1.58	104.713	0.00	1066.478	0.00		
0.105	0.00	1.096	0.68	11.482	0.78	120.226	0.00	1258.025	0.00		

Operator notes:



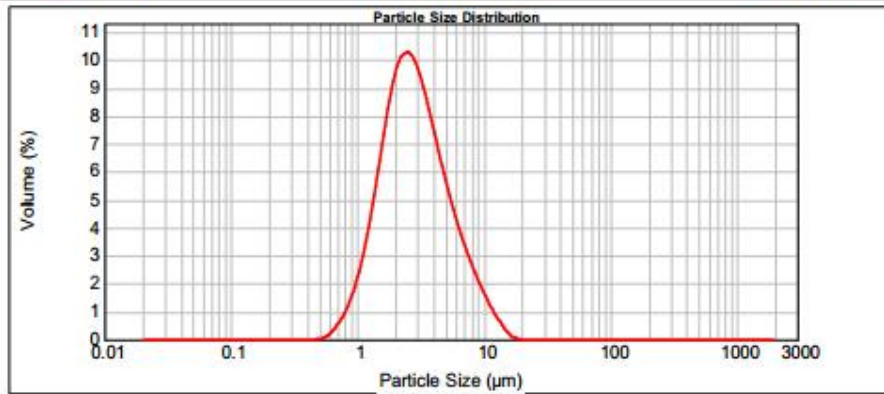
Result Analysis Report

Sample Name: - Average 8
Sample Source & type:
Sample bulk lot ref:
SOP Name:
Measured by: Guest
Result Source: Averaged
Measured: quarta-feira, 30 de julho de 2014
Analysed: quarta-feira, 30 de julho de 2014

Particle Name: Default
Particle RI: 1.520
Dispersant Name: Water
Accessory Name: Hydro 2000MU (A)
Absorption: 0.1
Dispersant RI: 1.330
Analysis model: General purpose
Size range: 0.020 to 2000.000 μm
Weighted Residual: 4.033 %
Sensitivity: Normal
Obscuration: 12.88 %
Result Emulation: Off

Concentration: 0.0043 %Vol
Specific Surface Area: 2.51 m^2/g
Span : 1.910
Surface Weighted Mean D[3,2]: 2.389 μm
Uniformity: 0.59
Vol. Weighted Mean D[4,3]: 3.452 μm
Result units: Volume

d(0.1): 1.341 μm **d(0.5):** 2.733 μm **d(0.9):** 6.561 μm



Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %
0.010	0.00	0.105	0.00	1.006	3.20	11.482	0.82	120.226	0.00	1258.025	0.00
0.011	0.00	0.130	0.00	1.299	4.56	13.183	0.46	138.038	0.00	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.158	0.00	1.645	6.10	15.136	0.14	158.489	0.00	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.192	0.00	1.990	7.80	17.378	0.02	181.970	0.00	1965.461	0.00
0.017	0.00	0.240	0.00	2.512	9.73	19.963	0.00	208.930	0.00	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.316	0.00	2.984	12.15	22.909	0.00	239.883	0.00	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.383	0.00	3.311	14.82	26.303	0.00	275.423	0.00	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.479	0.00	3.802	17.82	30.200	0.00	318.228	0.00	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.599	0.00	4.365	21.15	34.674	0.00	363.078	0.00	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.754	0.00	5.012	24.95	39.811	0.00	418.869	0.00	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.954	0.00	5.754	29.30	45.709	0.00	478.630	0.00	5011.672	0.00
0.046	0.00	1.224	0.00	6.607	34.30	52.481	0.00	540.541	0.00	5754.399	0.00
0.052	0.00	1.585	0.00	7.596	39.95	60.256	0.00	609.957	0.00	6606.504	0.00
0.060	0.00	2.000	0.00	8.710	46.80	69.183	0.00	687.438	0.00	7585.776	0.00
0.069	0.00	2.571	0.00	10.000	54.95	79.433	0.00	774.438	0.00	8706.636	0.00
0.079	0.00	3.344	0.00	11.482	64.60	91.201	0.00	871.764	0.00	9979.636	0.00
0.091	0.00	4.375	0.00			104.713	0.00	984.993	0.00	11414.000	0.00
0.105	0.00	5.754	0.00			120.226	0.00	1096.478	0.00		
								1258.025	0.00		

Operator notes:



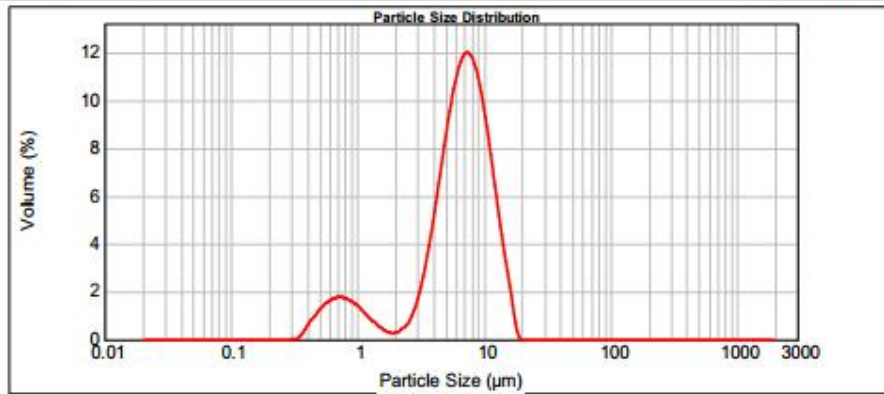
Result Analysis Report

Sample Name: - Average 9
Sample Source & type:
Sample bulk lot ref:
SOP Name:
Measured by: Guest
Result Source: Averaged
Measured: quarta-feira, 30 de julho de 2014
Analysed: quarta-feira, 30 de julho de 2014

Particle Name: Default
Particle RI: 1.520
Dispersant Name: Water
Accessory Name: Hydro 2000MU (A)
Absorption: 0.1
Dispersant RI: 1.330
Analysis model: General purpose
Size range: 0.020 to 2000.000 μm
Weighted Residual: 3.982 %
Sensitivity: Normal
Obscuration: 10.95 %
Result Emulation: Off

Concentration: 0.0064 %Vol
Specific Surface Area: 1.83 m^2/g
Span : 1.621
Surface Weighted Mean D[3,2]: 3.271 μm
Uniformity: 0.445
Vol. Weighted Mean D[4,3]: 6.868 μm
Result units: Volume

d(0.1): 1.117 μm **d(0.5):** 6.636 μm **d(0.9):** 11.874 μm

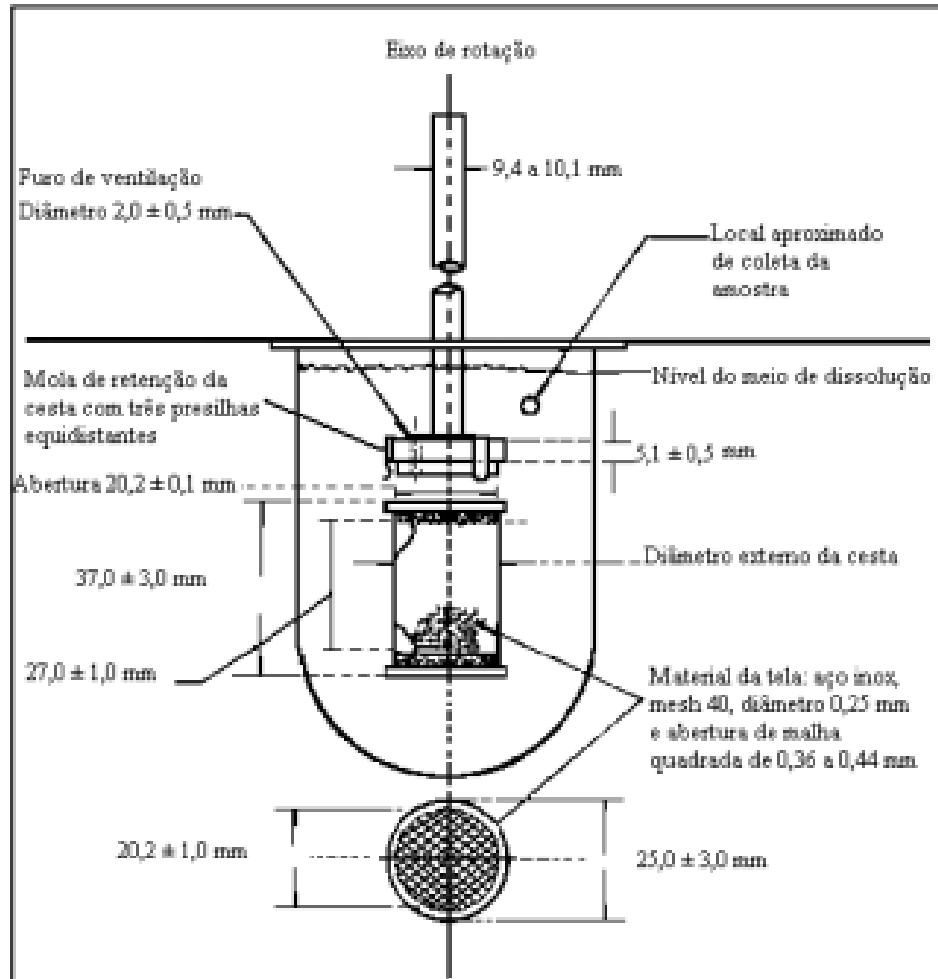


Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %
0.010	0.00	0.105	0.00	1.096	0.97	11.482	5.74	120.226	0.00	1258.025	0.00
0.011	0.00	0.130	0.00	1.299	0.97	13.183	5.74	138.038	0.00	1445.440	0.00
0.013	0.00	0.158	0.00	1.445	0.88	15.136	3.69	158.489	0.00	1659.587	0.00
0.015	0.00	0.192	0.00	1.660	0.29	17.378	0.22	181.970	0.00	1965.461	0.00
0.017	0.00	0.240	0.00	1.905	0.28	19.963	0.00	208.930	0.00	2187.762	0.00
0.020	0.00	0.275	0.00	2.188	0.47	22.909	0.00	239.883	0.00	2511.886	0.00
0.023	0.00	0.316	0.00	2.512	0.98	26.303	0.00	275.423	0.00	2884.032	0.00
0.026	0.00	0.363	0.06	2.884	1.88	30.200	0.00	318.228	0.00	3311.311	0.00
0.030	0.00	0.417	0.46	3.311	3.22	34.674	0.00	363.078	0.00	3801.894	0.00
0.035	0.00	0.479	0.84	3.802	4.95	39.811	0.00	418.869	0.00	4365.158	0.00
0.040	0.00	0.550	1.18	4.365	6.88	45.709	0.00	478.630	0.00	5011.672	0.00
0.046	0.00	0.631	1.44	5.012	8.71	52.481	0.00	540.541	0.00	5754.399	0.00
0.052	0.00	0.724	1.59	5.754	10.80	60.258	0.00	609.957	0.00	6606.504	0.00
0.060	0.00	0.832	1.47	6.607	10.60	69.183	0.00	687.438	0.00	7585.776	0.00
0.069	0.00	0.955	1.25	7.598	10.60	79.433	0.00	774.438	0.00	8706.636	0.00
0.079	0.00	1.096	1.25	8.710	9.54	91.201	0.00	871.764	0.00	9979.636	0.00
0.091	0.00			10.000	7.80	104.713	0.00	984.993	0.00	11424.000	0.00
0.105	0.00			11.482		120.226	0.00	1096.478	0.00	13044.000	0.00
								1258.025	0.00		

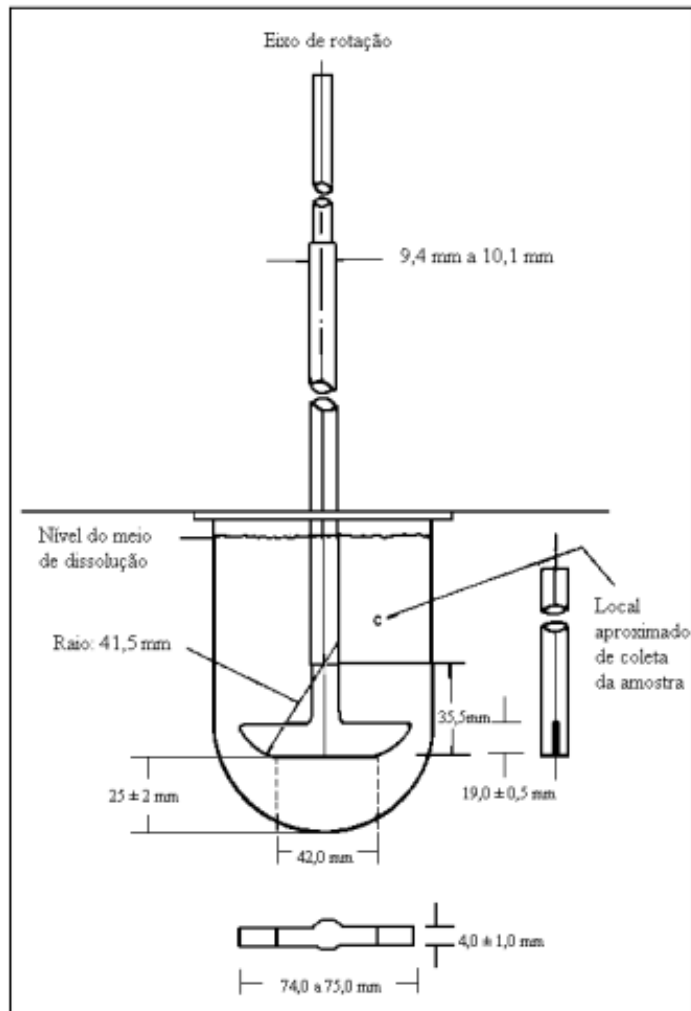
Operator notes:

ANEXO II

Método 1 (cestas). A cesta e a cuba não estão na mesma proporção.



Método 2 (pás). A pá e a cuba não estão na mesma proporção.



ANEXO III

Resultados referentes às injeções da GLIB obtida na condição experimental 1.

Tempo [min]	Vol. Injetado [μL]	Área do Pico	Média	DP	DPR [%]	Massa em 20 μL [μg]	Conc. [mg.mL^{-1}]	GLIB dissolvida [%]	Média [%]
10	20	48833	46,376	3474,7227	7,493	0,0153	0,0008	13,7936	13,1996
		43919				0,0138	0,0007	12,4056	
20	20	135223	129867,5	7573,8207	5,832	0,0424	0,0021	38,1957	36,6830
		124512				0,0391	0,0020	35,1702	
30	20	171121	161585,5	13485,2334	8,346	0,0537	0,0027	48,3356	45,6422
		152050				0,0477	0,0024	42,9488	
40	20	196678	195242	2030,8107	1,040	0,0617	0,0031	55,5546	55,1490
		193806				0,0608	0,0030	54,7434	
50	20	217182	216356,5	1167,4333	0,540	0,0682	0,0034	61,3463	61,1131
		215531				0,0676	0,0034	60,8799	
60	20	226373	223575,5	3956,2624	1,770	0,0710	0,0036	63,9424	63,1522
		220778				0,0693	0,0035	62,3620	
90	20	253842	253773,5	96,8736	0,038	0,0797	0,0040	71,7014	71,6821
		253705				0,0796	0,0040	71,6627	
120	20	262482	263967	2100,1071	0,796	0,0824	0,0041	74,1419	74,5614
		265452				0,0833	0,0042	74,9808	

Resultados referentes às injeções da GLIB obtida na condição 3.

Tempo [min]	Vol. Injetado [μL]	Área do Pico	Média	DP	DPR [%]	Massa em 20 μL [μg]	Conc. [mg.mL ⁻¹]	GLIB dissolvida [%]	Média [%]
10	20	13126	12934,5	270,8219	2,0938	0,0041	0,0002	3,7076	3,6535
		12743				0,0040	0,0002	3,5994	
20	20		34843,5	533,8656	1,5322	0,0111	0,0006	9,9487	9,8421
						0,0108	0,0005	9,7354	
30	20	54127	50715,5	4824,5896	9,5130	0,0170	0,0008	15,2890	14,3253
		47304				0,0148	0,0007	13,3617	
40	20	63066	60678	3377,1420	5,5657	0,0198	0,0010	17,8139	17,1394
		58290				0,0183	0,0009	16,4649	
50	20	71222	68449,5	3920,9071	5,7282	0,0224	0,0011	20,1177	19,3346
		65677				0,0206	0,0010	18,5514	
60	20	77995	74322	5194,4064	6,9891	0,0245	0,0012	22,0308	20,9933
		70649				0,0222	0,0011	19,9559	
90	20	100374	97175	4524,0692	4,6556	0,0315	0,0016	28,3521	27,4485
		93976				0,0295	0,0015	26,5449	
120	20	107883	103691	5928,3833	5,7174	0,0339	0,0017	30,4731	29,2890
		99499				0,0312	0,0016	28,1050	

Resultados referentes às injeções da GLIB obtida na condição 7.

Tempo [min]	Vol. Injetado [μL]	Área do Pico	Média	DP	DPR [%]	Massa em 20 μL [μg]	Conc. [mg.mL^{-1}]	GLIB dissolvida [%]	Média [%]
10	20	17300	16647	923,4815	5,5474	0,0054	0,0003	4,8866	4,7022
		15994				0,0050		4,5177	
20	20	43057	42257	1131,3708	2,6774	0,0135	0,0007	12,1621	11,9361
		41457				0,0130		11,7101	
30	20	59813	58969	1193,5962	2,0241	0,0188	0,0009	16,8951	16,6567
		58125				0,0182		16,4183	
40	20	75424	75006,5	590,4342	0,7872	0,0237	0,0012	21,3046	21,1867
		74589				0,0234		21,0688	
50	20	87873	86602	1797,4654	2,0755	0,0276	0,0014	24,8210	24,4620
		85331				0,0268		24,1030	
60	20	87856	87404	639,2245	0,7313	0,0276	0,0014	24,8162	24,6885
		86952				0,0273		24,5609	
90	20	114232	113477	1067,7312	0,9409	0,0359	0,0018	32,2665	32,0532
		112722				0,0354		31,8400	
120	20	126204	126447,5	344,3610	0,2723	0,0396	0,0020	35,6482	35,7170
		126691				0,0398		35,7857	