



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Câmpus de Araraquara

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PROCESSO ANTISSOLVENTE SUPERCRÍTICO PARA OBTENÇÃO DE**  
**DISPERSÕES SÓLIDAS**

**VALQUÍRIA MIWA HANAI YOSHIDA**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud**

**ARARAQUARA - SP**

**2014**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Câmpus de Araraquara

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PROCESSO ANTISSOLVENTE SUPERCRÍTICO PARA OBTENÇÃO DE**  
**DISPERSÕES SÓLIDAS**

**VALQUÍRIA MIWA HANAI YOSHIDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud**

**ARARAQUARA – SP**

**2014**

**Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**Y65p**

Yoshida, Valquíria Miwa Hanai

Processo antissolvente supercrítico para obtenção de dispersões sólidas / Valquiria Miwa Hanai Yoshida. — Araraquara, 2014  
126 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêutica

Orientador: Maria Palmira Daflon Gremião

Coorientador: Marco Vinícius Chaud

1. Tecnologia de fluido supercrítico. 2. Antissolvente supercrítico. 3. Antirretrovirais. 4. Zidovudina. 5. PLLA . I. Gremião, Maria Palmira Daflon, orient. II. Chaud, Marco Vinícius, coorient. III. Título.

**CAPES: 40300005**

VALQUÍRIA MIWA HANAI YOSHIDA

**PROCESSO ANTISOLVENTE SUPERCRÍTICO PARA  
OBTENÇÃO DE DISPERSÕES SÓLIDAS**

---

A Comissão Julgadora dos Trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 28/03/2014, considerou a candidata

**Valquíria Miwa Hanai Yoshida**

(   ) REPROVADA

( × ) APROVADA

- 1) Examinador (*Prof. Dr. Victor Manuel Cardoso Figueiredo Balcão*)
- 2) Examinador (*Prof. Dr. Clovis Augusto Ribeiro*)
- 3) Examinadora (*Profa. Dra. Beatriz Stringhetti Ferreira Cury*)
- 4) Examinadora (*Profa. Dra. Ana Luiza Rocha Faria Duque*)
- 5) Presidenta (*Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião*)

**Dedicatória**

*Dedico esta tese à minha família, meu esposo Edson Hideaki Yoshida, meus filhos Tárík Hanai Yoshida, Renê Hanai Yoshida e Ian Hanai Yoshida (in memoriam), meus pais Mário Hanai (in memoriam) e Harue Hanai, aos meus irmãos Hayumi, Koji, Lumi e Minoru e a minha avó amada Yae Hanai (in memoriam). É a existência destas pessoas maravilhosas, que me motivou e trouxe até onde estou hoje.*

## Agradecimentos

Sou eternamente grata à orientação da Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião. Mais que orientadora, a Profa. Palmira foi uma verdadeira mentora na minha vida acadêmica e científica. Muito obrigada por acreditar neste projeto e em mim.

Quero agradecer a um grande profissional que contribuiu e continua a contribuir enormemente na minha formação acadêmica e científica. Sua sabedoria sempre me surpreende e encanta. Ao Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud, sábio mestre e amigo, minha eterna gratidão.

Agradeço ao Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista (*in memoriam*) pelo acolhimento e orientação no início deste projeto.

A respeitosa Instituição, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, mais precisamente Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, agradeço a oportunidade de cursar o doutorado. Aos docentes e aos amigos da UNESP fica aqui registrada minha gratidão por belas memórias criadas na convivência durante este período.

Agradeço a respeitosa Universidade de Sorocaba - UNISO que hoje considero “minha casa”, pelo acolhimento, por acreditar no meu trabalho e por permitir meu desenvolvimento acadêmico e científico.

Agradeço aos colaboradores do Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia da UNISO – LaBNUS e ao Laboratório de Saúde da UNISO, representados pela querida Valéria de Campos Orsi, pelo apoio e incentivo no decorrer do desenvolvimento dos nossos trabalhos.

Agradeço às mestrandas, do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Uniso, Márcia de Araújo Rebelo e Thaís Francine Ribeiro Alves, o grande empenho e boa vontade nas atividades que colaboraram com este projeto.

A Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUC-SP) pela contribuição neste projeto, muito obrigada.

O Laboratório de recursos analíticos e de calibração (LRAC) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e sua equipe têm minha gratidão, respeito e admiração.

Agradeço à empresa Cristália, em especial ao Dr. Edson Luiz da Silva Lima, Diretor da Divisão Farmoquímica, pela doação de matéria-prima essencial à nossa pesquisa.

Um agradecimento especial à empresa Waters pelo apoio técnico de excelência prestado por Leonardo Bortolotti Albano e Fábio de Oliveira; e também à Raíssa Fernanda Gentile pelo trabalho de *design* das figuras esquemáticas que elaborei para ilustrar esta tese.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo aporte financeiro desta pesquisa e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de doutorado. Sem estes apoios não teria a oportunidade de tornar concreto um sonho.

O apoio da minha família foi essencial para adentrar, percorrer e finalizar este projeto. Minha eterna gratidão a esta família maravilhosa.

E, por fim, agradeço a Deus por mais esta vivência.

## Epígrafe

*“Sou muito grato às adversidades que apareceram na minha vida, pois elas me ensinaram a tolerância, a simpatia, o autocontrole, a perseverança e outras qualidades que, sem essas adversidades eu jamais conheceria.”*

*Napoleon Hill*



## RESUMO

Neste estudo foi proposta a utilização do processo antissolvente supercrítico (SAS), no qual o gás carbônico foi selecionado como agente antissolvente, para a obtenção de sistema de liberação controlada de fármaco. No delineamento experimental fatorial  $3^2$ , a proporção entre zidovudina e poli(L-ácido láctico) (AZT:PLLA) representou o fator  $X_1$ , e as condições de temperatura e pressão representou o fator  $X_2$ , sendo ambos variáveis independentes; o rendimento do processo e a morfologia macroscópica das partículas representaram as variáveis dependentes. No presente estudo, as variáveis dependentes determinaram os produtos dos lotes que foram selecionados para a caracterização do estado sólido, teor de AZT, tipo e cinética de liberação de AZT e permeação intestinal de AZT. A caracterização do estado sólido utilizou as análises de dispersão de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTR) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). O teor de AZT foi determinado por metodologia analítica validada. O teste de dissolução forneceu dados para as avaliações da liberação e da cinética de liberação de AZT. O modelo de saco intestinal invertido de rato foi adotado para o estudo *ex vivo* de permeação intestinal do AZT. Os lotes L3 (91,54 % de rendimento e amostra com aspecto uniforme), L5 e L9 (59,06 % e 51,50 % de rendimento, respectivamente; ambos resultaram em amostra com aspecto não uniforme e sólido filamentosos) resultantes do planejamento fatorial  $3^2$  foram selecionados para os estudos analíticos. O lote L3 de proporção AZT:PLLA (1:2, m/m) resultou em rendimento de 91,54 % e teor de AZT 58,76 % elevados em comparação aos lotes produzidos e foi selecionado para o estudo de permeação intestinal. A permeabilidade do AZT a partir do lote L3 ( $9,87 \pm 0,47$  %) foi maior em relação ao AZT puro ( $3,84 \pm 0,45$  %). O AZT permaneceu na forma cristalina e o PLLA permaneceu na forma semicristalina, nos lotes L3, L5 e L9 produzidos pelo processo SAS, quando avaliados pelo MEV, DRX, DSC e FTIR. Este estudo demonstrou que é possível utilizar o processo SAS na obtenção de sistemas de liberação modificada para fármacos pouco permeáveis que devem ser, primariamente, absorvidos no estômago e no duodeno. Assim como, demonstrou que uma dispersão sólida de AZT com PLLA permite o controle da liberação do AZT por mecanismo de difusão.

**Palavras-chave:** Tecnologia de fluido supercrítico. Antissolvente supercrítico. Antirretrovirais. Zidovudina. PLLA.

## ABSTRACT

In this study we proposed the use of supercritical antisolvent process (SAS), in which carbon dioxide was selected as antisolvent agent, to obtain drug controlled release system. Factorial  $3^2$  experimental design use the of zidovudine and poly (L-lactic acid) ratio (AZT:PLLA ) as  $X_1$  factor, also the temperature and pressure conditions as  $X_2$  factor, both independent variables, the process yield and particles macroscopic morphology represented the dependent variables. In this study, the dependent variables determined the product that have been selected to solid state characterization, AZT content, type, release kinetics, and intestinal permeation. Solid state characterization used X-ray diffraction (XRD) analysis, scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy with Fourier transform (FTIR), and differential scanning calorimetry (DSC). The AZT content was determined by validated analytical methodology. The dissolution test provided data for AZT release and release kinetics evaluation. The rat everted gut sac model was take on for the *ex vivo* study of intestinal permeation of AZT. The L3 (91.54 % yield and sample with uniform appearance), L5 and L9 lots (59.06 % and 51.50 % yield , respectively , both of which resulted in samples with non-uniform and solid filamentous appearance) resulting from factorial  $3^2$  planning were selected for analytical studies. The L3batch ratio of AZT:PLLA (1:2, w/w) resulted in a high yield of 91.54 % and 58.76 % AZT content compared to batches produced, and was selected for the study of intestinal permeation . The AZT permeability from L3 lot ( $9.87 \pm 0.47\%$ ) was higher than pure AZT ( $3.84 \pm 0.45 \%$ ). AZT remained in crystalline form and PLLA remained in semi - crystalline form, in lots L3, L5, and L9 produced by the SAS process, when evaluated by SEM, XRD, DSC, and FTIR. This study demonstrated that it is possible to use the SAS process to obtaining modified release systems for poorly permeable drugs that should be primarily absorbed in the stomach and duodenum. Well as, demonstrated that AZT solid dispersion with PLLA permits AZT controlled release by diffusion mechanism.

**Key-words:** Supercritical fluid technology. Supercritical antisolvent. Antiretrovirals. Zidovudine. PLLA.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                   |                                                                                                                                |    |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b>  | Fórmula estrutural da zidovudina. ....                                                                                         | 18 |
| <b>Figura 2:</b>  | Diagrama esquemático do processo SAS para obtenção das partículas sólidas.....                                                 | 24 |
| <b>Figura 3:</b>  | Fotografias do vaso coletor do equipamento FSC contendo amostra com aspecto uniforme.....                                      | 31 |
| <b>Figura 4:</b>  | Fotografias do vaso coletor do equipamento FSC contendo sólido particulado de aspecto não uniforme e sólido filamentosos. .... | 32 |
| <b>Figura 5:</b>  | Fotografias do vaso coletor do equipamento FSC contendo sólido não particulado .....                                           | 33 |
| <b>Figura 6:</b>  | Curva analítica do AZT.....                                                                                                    | 35 |
| <b>Figura 7:</b>  | Perfil de liberação do AZT a partir das amostras L3, L5 e L9 (n=3). ....                                                       | 36 |
| <b>Figura 8:</b>  | Fotomicrografias das partículas de AZT obtidas por mev. ....                                                                   | 39 |
| <b>Figura 9:</b>  | Fotomicrografias do PLLA obtidas por mev.....                                                                                  | 39 |
| <b>Figura 10:</b> | Fotomicrografias da amostra L3 obtidas por mev .....                                                                           | 40 |
| <b>Figura 11:</b> | Fotomicrografias das amostras L5 e L9 obtidas por mev. ....                                                                    | 41 |
| <b>Figura 12:</b> | Padrão de Difração Raios X do AZT, das amostras L3, L5 e L9 e do PLLA.....                                                     | 42 |
| <b>Figura 13:</b> | Padrão de Difração Raios X normalizado do AZT, das amostras L3, L5 e L9 e do PLLA. ....                                        | 43 |
| <b>Figura 14:</b> | Curva DSC do AZT. ....                                                                                                         | 44 |
| <b>Figura 15:</b> | Curva DSC do PLLA. ....                                                                                                        | 45 |
| <b>Figura 16:</b> | Curva DSC da amostra L3 .....                                                                                                  | 46 |
| <b>Figura 17:</b> | Curva DSC da amostra L5. ....                                                                                                  | 46 |
| <b>Figura 18:</b> | Curva DSC da amostra L9. ....                                                                                                  | 47 |
| <b>Figura 19:</b> | Curva DSC do AZT, PLLA, L3, L5 e L9 .....                                                                                      | 48 |
| <b>Figura 20:</b> | Espectros do FTIR do AZT, PLLA, L3, L5 e L9. ....                                                                              | 50 |
| <b>Figura 21:</b> | Quantificação do AZT nos meios interno e externo ao SIIR (n=6).....                                                            | 51 |

**LISTA DE TABELAS**

|                  |                                                                                                                                                                                           |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> | Condições utilizadas nos testes de dissolução.....                                                                                                                                        | 25 |
| <b>Tabela 2:</b> | Representação matemática dos modelos usados para descrever os perfis de liberação. ....                                                                                                   | 26 |
| <b>Tabela 3:</b> | Delineamento fatorial 32 completo para preparação das formulações. ....                                                                                                                   | 30 |
| <b>Tabela 4:</b> | Avaliação da linearidade. Resultados em absorbância média, desvio padrão e coeficiente de variação dos pontos da curva de linearidade. DP Desvio padrão; CV Coeficiente de variação. .... | 34 |
| <b>Tabela 5:</b> | Parâmetros da curva analítica. ....                                                                                                                                                       | 35 |
| <b>Tabela 6:</b> | Teor de AZT nas amostras L3, L5 e L9.....                                                                                                                                                 | 36 |
| <b>Tabela 7:</b> | Estudo cinético da liberação do fármaco considerando a constante de liberação (K), os valores das constantes de correlação linear (r) e expoente de liberação (n). ....                   | 37 |
| <b>Tabela 8:</b> | Interpretação do mecanismo de liberação por difusão a partir de filme polimérico.....                                                                                                     | 38 |
| <b>Tabela 9:</b> | Estudo dos valores de $\Delta H$ obtidos através da análise DSC.....                                                                                                                      | 47 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                          |                                                               |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------|
| ASES .....               | Aerosol solvent extraction system                             |
| AZT .....                | Zidovudina                                                    |
| FDA .....                | Food and Drug Administration                                  |
| FSC .....                | Fluido supercrítico                                           |
| GAS .....                | Gas antisolvent (gás antissolvente supercrítico)              |
| HIV .....                | Human immunodeficiency virus                                  |
| PC .....                 | Ponto crítico                                                 |
| PT .....                 | Ponto triplo                                                  |
| RESAS .....              | Rapid expansion from supercritical to aqueous solution        |
| RESS .....               | Rapid expansion of supercritical solutions                    |
| SAA .....                | Supercritical assisted atomization                            |
| SAS .....                | Supercritical antisolvent                                     |
| SIIR .....               | Saco intestinal invertido de rato                             |
| SC-CO <sub>2</sub> ..... | Gás carbônico supercrítico                                    |
| SEDS .....               | Solution enhanced dispersion by supercritical fluids          |
| SFEE .....               | Supercritical fluid extraction of emulsions                   |
| SPH .....                | Hidrogel superporoso                                          |
| TGI .....                | Trato gastrintestinal                                         |
| TRG .....                | Tempo de retenção gástrica                                    |
| TTF .....                | Tempo total de flutuação                                      |
| UNIFAC .....             | Universal quasichemical functional group activity coefficient |
| USP .....                | Farmacopeia dos Estados Unidos da América                     |

## SUMÁRIO

|       |                                                                                        |    |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | INTRODUÇÃO .....                                                                       | 13 |
| 2     | REVISÃO DE LITERATURA.....                                                             | 15 |
| 2.1   | TECNOLOGIA DE FLUIDO SUPERCRÍTICO E SUAS<br>APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS.....              | 15 |
| 2.1.1 | PROCESSO ANTISSOLVENTE SUPERCRÍTICO (SAS).....                                         | 16 |
| 2.2   | A SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA E OS<br>ANTIRRETROVIRAIS.....                 | 17 |
| 2.3   | AZT .....                                                                              | 18 |
| 2.4   | PLLA.....                                                                              | 19 |
| 2.5   | GÁS CARBÔNICO SUPERCRÍTICO .....                                                       | 20 |
| 3     | OBJETIVOS .....                                                                        | 21 |
| 4     | MATERIAL .....                                                                         | 22 |
| 5     | MÉTODOS .....                                                                          | 23 |
| 5.1   | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL 3 <sup>2</sup> COMPLETO.....                        | 23 |
| 5.2   | PREPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES .....                                                       | 23 |
| 5.3   | LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> E CINÉTICA .....                                             | 24 |
| 5.3.1 | DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AZT .....                                                      | 24 |
| 5.3.2 | AVALIAÇÃO, <i>IN VITRO</i> , DA LIBERAÇÃO DO AZT DAS<br>AMOSTRAS .....                 | 25 |
| 5.3.3 | AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO .....                                               | 26 |
| 5.4   | CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....                                                     | 26 |
| 5.4.1 | MORFOLOGIA ATRAVÉS DE MEV .....                                                        | 26 |
| 5.4.2 | CRISTALINIDADE ATRAVÉS DE DRX .....                                                    | 26 |
| 5.4.3 | ANÁLISE TÉRMICA ATRAVÉS DE DSC .....                                                   | 27 |
| 5.4.4 | IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA FTIR .....                                            | 27 |
| 5.4.5 | ESTUDO, <i>EX VIVO</i> , DE PERMEAÇÃO INTESTINAL POR MSIIR .....                       | 27 |
| 6     | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                            | 29 |
| 6.1   | SELEÇÃO DOS PARÂMETROS PARA PREPARAÇÃO DAS<br>AMOSTRAS EM CONDIÇÕES SUPERCRÍTICAS..... | 29 |
| 6.2   | LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> E CINÉTICA .....                                             | 34 |

|       |                                                                          |     |
|-------|--------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.2.1 | DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AZT .....                                        | 34  |
| 6.2.2 | AVALIAÇÃO, <i>IN VITRO</i> , DA LIBERAÇÃO DE AZT DAS<br>AMOSTRAS .....   | 36  |
| 6.2.3 | AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DE AZT DAS<br>AMOSTRAS .....          | 37  |
| 6.3   | AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS.....                               | 39  |
| 6.3.1 | ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MEV.....                                         | 39  |
| 6.3.2 | CRISTALINIDADE ATRAVÉS DE DRX .....                                      | 41  |
| 6.3.3 | ANÁLISE TÉRMICA ATRAVÉS DE DSC .....                                     | 43  |
| 6.3.4 | IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA FTIR .....                              | 49  |
| 6.3.5 | ESTUDO, <i>EX VIVO</i> , DE PERMEAÇÃO INTESTINAL POR<br>MODELO SIIR..... | 50  |
| 7     | CONCLUSÃO.....                                                           | 52  |
|       | REFERÊNCIAS .....                                                        | 53  |
|       | APÊNDICA A .....                                                         | 60  |
|       | APÊNDICA B .....                                                         | 109 |

## 1 INTRODUÇÃO

As formas farmacêuticas convencionais têm contribuído para melhorar a qualidade e a expectativa de vida de portadores da infecção viral na imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency virus*, HIV), mas inúmeros fatores, tais como disponibilidade baixa dos fármacos, meia biológica curta, efeitos adversos graves, entre outros, dificultam o melhor aproveitamento do arsenal terapêutico disponível (VON BRIESEN; RAMGE; KREUTER, 2000; OJEWOLE *et al.*, 2008).

Embora novos fármacos estejam sendo testados para o tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), os resultados são pouco expressivos quando comparados aos já existentes. Para fármacos atualmente utilizados como anti-HIV, vários sistemas de liberação de fármacos têm sido desenvolvidos para melhorar a eficiência terapêutica. Entre estes sistemas destacam-se: nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas, nanoemulsões, dendrímeros, fármacos conjugados e microesferas ocas (LANAO; BRIONES; COLINO, 2007; SHAHIWALA; AMIJI, 2007; GOVENDER *et al.*, 2008; OJEWOLE *et al.*, 2008; MAINARDES *et al.*, 2009; YOSHIDA *et al.*, 2011).

A obtenção de sistema sólido em escala micro ou nanométrica, através de métodos convencionais como co-precipitação, coacervação e polimerização por evaporação de solvente, usa grandes quantidades de solventes orgânicos e/ou tensoativos que, em geral, são poluentes e fisiologicamente tóxicos (KAWASHIMA *et al.*, 1989; BENITA; BARKAI; PATHAK, 1990).

Os métodos, citados acima, para obtenção de partículas apresentam, comumente, taxa de aprisionamento baixa de fármaco, dificuldades de escalonamento e na maioria das vezes requerem o tratamento posterior das partículas para eliminação do solvente e/ou de impurezas. Embora a indústria farmacêutica demonstre interesse por tecnologias inovadoras, que envolvam a produção de micro e nanopartículas, o descarte dos solventes limita a produção industrial e gera aumento de custos (PERRUT, 2000).

Assim, esforços na busca de outras tecnologias que minimizem os problemas relacionados à poluição, toxicidade e facilidade de produção em escala tem sido objeto de vários estudos (LEE *et al.*, 2005; JOSEPH; SHARMA, 2008; ZHANG; ULUDAĞ, 2009; CATTANI *et al.*, 2010; DAS NEVES *et al.*, 2010; MACHIDA; TAKESUE; SMITH JR, 2011). Dentre os processos inovadores para a obtenção de sistemas de liberação de fármaco, a tecnologia de fluido supercrítico (FSC) tem lugar de destaque. As vantagens do processo de FSC são a simplicidade das etapas de produção, o uso das propriedades físico-químicas dos



compostos supercríticos, minimização ou eliminação do uso de solventes orgânicos e o uso de intermediários ambientalmente aceitos (CHAN; KWOK, 2011). E, entre os FSC, o CO<sub>2</sub> é o mais utilizado em aplicações farmacêuticas, não apenas pelo custo, mas também pelas condições supercríticas mais brandas, o que, por sua vez, possibilita o processamento de fármacos e outras matérias-primas termolábeis (DESIMONE, 2002).

Este estudo teve como objetivo empregar o processo antissolvente supercrítico, usando CO<sub>2</sub> como fluido, para obtenção de sistema de liberação controlado, biocompatível, contendo zidovudina (AZT) e poli(L-ácido láctico) (PLLA).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A abordagem realizada nesta pesquisa bibliográfica teve como finalidade contextualizar a síndrome da imunodeficiência adquirida e o princípio das técnicas e aplicação do fluido supercrítico na tecnologia farmacêutica para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos.

### 2.1 Tecnologia de Fluido Supercrítico e suas aplicações farmacêuticas

Em 1822 o cientista francês Caignard de la Tour descobriu os fenômenos críticos (BERCHE; HENKEL; KENNA, 2009) (a fase termodinâmica nas condições críticas de temperatura e pressão apresenta uma fenomenologia bem característica que a torna única e diferente das fases sólida, líquida e gasosa) pela observação da mineralização natural.

A descoberta dos fenômenos críticos é à base da tecnologia de fluido supercrítico (FSC). Embora o FSC seja conhecido desde o final do século XIX, o conceito básico de expansão rápida de soluções supercríticas (RESS) foi descrito pela primeira vez por Hannay e Hogarth (HANNAY; HORGARTH, 1879), em um estudo da solubilidade de cloretos metálicos em etanol supercrítico para compreender a mineralização natural, observada por Caignard de la Tour (BERCHE; HENKEL; KENNA, 2009), neste estudo os autores relataram o grande poder de solvatação dos FSC. Porém, foi Worthy (1981) que direcionou o estudo dos FSC para otimizar a micromerítica de materiais orgânicos difíceis de cominuir.

Por mais de cem anos a ampla variedade de técnicas, a limitação dos equipamentos e as condições específicas para alcançar o estado supercrítico dificultaram o avanço mais acelerado das pesquisas científicas nesta área (DESIMONE, 2002).

O conceito de tecnologia de FSC segundo Jung e Perrut (2001), foi melhor compreendido e desenvolvido após os trabalhos pioneiros de Krukoni (1984) e, especialmente, pela divulgação das pesquisas do Instituto Battelle (SMITH; WASH, 1986; PETERSEN, MATSON; SMITH, 1986; MATSON *et al.*, 1987; MATSON; PETERSEN; SMITH, 1987; SMITH; WASH, 1988) que descreveram e modelaram padrão de fluxo e processo de nucleação em condições supercríticas. Desde então, muitos métodos utilizando esta tecnologia têm sido publicados e patenteados (SMITH; WASH, 1986, 1988; CASTOR; HONG, 1995; SUBRAMANIAM *et al.*, 1998; ROUANET *et al.*, 1999; SUBRAMANIAM *et al.*, 1999; GUPTA; CHATTOPADHYAY, 2003; SHEKUNOV; CHATTOPADHYAY; SEITZINGER, 2008; WANG; PFEFFER; DAVE, 2009) para purificação, extração e obtenção de partículas, entre outros.

Um solvente supercrítico é aquele que a certa temperatura e pressão não se condensa nem evapora, ou seja, existe como um fluido (YASUJI; TAKEUCHI; KAWASHIMA, 2008). Isto acontece quando uma substância é elevada acima de seus pontos críticos de temperatura e pressão, e passa para uma condição chamada de “o estado fluido supercrítico”. Nestas condições, as densidades do líquido e do vapor são idênticas, e por esta razão o menisco, na interface entre as duas fases, desaparece (MORIBE; TOZUKA; YAMAMOTO, 2008; CHRASTIL, 1982).

Nas condições de FSC as substâncias exibem propriedades físicas que são intermediárias entre os gases e os líquidos das mesmas. Assim, a densidade de um FSC pode ser alterada pela variação da pressão aplicada sobre o fluido. Quando o fluido é comprimido a altas temperaturas pode ter uma densidade que oscila entre aquelas exibidas pelos gases até valores típicos dos líquidos. Do mesmo modo, um FSC mantido a uma densidade relativamente alta tem capacidade de dissolver uma variedade de materiais, exatamente como fazem os líquidos convencionais, mas com o poder de penetração dos gases (MAUL, 1999; CHAN; KWOK, 2011).

Entre as vantagens da tecnologia de FSC está o uso de intermediários ambientalmente mais aceitáveis, como dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e água. O  $\text{CO}_2$  é o FSC mais utilizado em aplicações farmacêuticas, não apenas pelo custo, mas também pelas condições supercríticas mais brandas, o que, por sua vez, possibilita o processamento de fármacos e outras matérias-primas termolábeis (DESIMONE, 2002).

O APÊNDICE A – Artigo de revisão preparado para ser submetido e avaliado para publicação científica – traz a revisão completa do assunto deste tópico.

### **2.1.1 Processo antissolvente supercrítico (SAS)**

O processo denominado SAS está baseado na diminuição da potência solvente de um solvente orgânico polar, no qual o ativo farmacêutico e/ou polímero é dissolvido. Na sequência, esta solução saturada com o FSC provoca a precipitação e recristalização do substrato de interesse. Desta forma, o FSC é utilizado para extrair o solvente desta solução (DE ZORDI *et al.*, 2012; SHETH *et al.*, 2012).

No processo SAS, o gás carbônico supercrítico ( $\text{SC-CO}_2$ ) pode ser usado como antissolvente. A solução, contendo os solutos, forma pequenas gotículas, produzidas por um bocal através do qual a solução é pulverizada para um vaso mantido a pressão superior a 70bar. Quando as gotas entram em contato com o  $\text{SC-CO}_2$ , uma difusão muito rápida tem lugar, incluindo a separação de fases e precipitação do soluto (CHONG *et al.*, 2009).

Na precipitação de partículas, a transferência de massa ocorre entre uma gota de solvente orgânico e um antissolvente comprimido. Em condições miscíveis, acima do ponto de mistura crítica, não há tensão interfacial entre os dois fluidos (MONTES *et al.*, 2011a).

O processo SAS é facilmente escalonado e tem sido largamente estudado devido ao seu potencial de produção de partículas micro e nanométricas, com controle do tamanho e da morfologia de partículas (REVERCHON; ADAMI, 2006; SHARIATI; PETERS, 2003).

## **2.2 A síndrome da imunodeficiência adquirida e os antirretrovirais**

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana e síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/SIDA) tornou-se uma preocupação global de saúde, social e econômico (DAS NEVES *et al.*, 2010).

Segundo a UNAIDS (2010) em 2009, havia cerca de 2,6 milhões de pessoas infectadas com o HIV. Isto é quase um quinto ou 19 % a menos dos 3,1 milhões de pessoas infectadas em 1999, e mais de um quinto ou 21 % menor do que o estimado (3,2 milhões) em 1997, ano em que atingiu um pico anual de novas infecções. Em 2007, foi estimado que o número total de pessoas infectadas pelo HIV representou cerca de 33 milhões (UNAIDS, 2008). Estes números podem ser explicados pela expansão do acesso a medicamentos antirretrovirais (ARV) que não só aumenta a longevidade, mas também a qualidade de vida das pessoas infectadas pelo HIV.

Apesar de sua importância, a terapia ARV tem sido limitada por fatores, tais como toxicidade, eficácia insuficiente e resistência aos fármacos. Paralelamente, propriedades físico-químicas inadequadas da maioria desses fármacos ARV (como, por exemplo, baixa solubilidade, permeabilidade e estabilidade) prejudicam a absorção, biodistribuição e efeito ARV sustentado, contribuindo assim para o baixo resultado clínico. Para resolver estes problemas, diferentes sistemas de liberação e formas farmacêuticas têm sido propostos (VON BRIESEN; RAMGE; KREUTER, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2003; GOVENDER *et al.*, 2008; MAINARDES *et al.*, 2009; DAS NEVES *et al.*, 2010; YOSHIDA *et al.*, 2011).

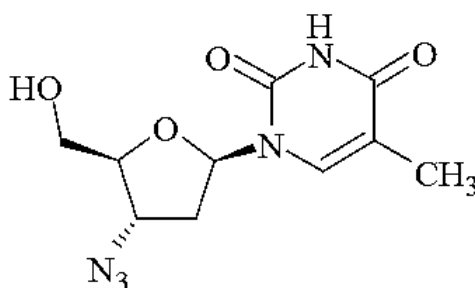
Junto ao tratamento baseado em diferentes categorias de fármacos anti-HIV a terapia combinada ou terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) foi uma grande revolução o tratamento de pacientes com HIV (GUPTA; JAIN, 2010), porém a zidovudina (AZT) continua sendo um importante constituinte da HAART.

## 2.3 AZT

A zidovudina (AZT) foi o primeiro agente antirretroviral licenciado para o tratamento da infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV, sigla em inglês para *human immunodeficiency virus*) (RACHLIS, 1990). Sua fórmula molecular é  $C_{10}H_{13}N_5O_4$ ; com uma massa molecular de  $267,24 \text{ g.mol}^{-1}$ ; seus sinônimos são azidotimidina e 3'-azido-2,3'-didesoxitimidina e seu número de CAS é 30516-87-1. A matéria-prima deve conter, no mínimo, 97,0 % e, no máximo, 102,0 % de  $C_{10}H_{13}N_5O_4$  (Figura 1), em relação à substância dessecada (BRASIL, 2010).

O AZT apresenta-se como pó cristalino e acastanhado, apresenta polimorfismo, sendo a forma 3'-azido-2,3'-didesoxitimidina a mais estável e com temperatura de fusão em torno de  $124^\circ\text{C}$ , ligeiramente solúvel em água, isto é, uma grama de AZT em 30 a 100 mL de água (BRASIL, 2010; FPORT, 2002) e solúvel em álcool etílico ( $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) (USP 31, 2008). O AZT é semelhante à timidina endógena, diferenciando apenas pela presença de um grupo azido ( $N_3$ ) no anel ribose (VEAL; BACK, 1995; AOKI, 1999; SOUZA; STORPIRTIS, 2004) ao invés de hidroxila na posição 3. O AZT apresenta valor de pH em solução que varia de 3,5 a 5,5 e pKa igual a 9,8 (MESPLET *et al.*, 2001).

**Figura 1:** Fórmula estrutural da zidovudina.



O AZT é um análogo de nucleosídeo que interfere com o ciclo replicativo do HIV de tipo 1 (HIV-1) e é convertido na sua forma monofosfato por timidina-quinase celular e subsequentemente à sua forma ativa trifosfato por outras enzimas intracelulares.

A forma ativa trifosfato do AZT é a que mais avidamente inibe a transcriptase reversa do HIV-1, e assim inibe a ligação da enzima ao timidina-5'-trifosfato, impedindo a síntese de DNA viral.

Quando forma ativa trifosfato do AZT é incorporado no DNA viral, a substituição 3' no monofosfato de zidovudina impede ainda mais as ligações 5' para 3' fosfodiéster e inibe a síntese da cadeia de DNA. O AZT inibe a replicação *in vitro* do HIV em concentrações inferiores a  $0,1 \mu\text{mol}$  (RACHLIS, 1990).

Quando Mitsuya e colaboradores (1985) escreveram a sua primeira comunicação sobre a atividade do AZT, dificilmente poderiam ter previsto a expansão e utilização desta classe de fármaco como a conhecemos hoje. Desde 1985, um número incontável de nucleosídeos e análogos estruturalmente diferentes de nucleotídeos, assim como seus pró-fármacos têm sido sintetizados e testados para a atividade ARV (CIHLAR; ADRIAN; RAY, 2010). Há quase três décadas atrás, o AZT demonstrou de forma eficiente bloquear a replicação do HIV em culturas celulares. Estudos posteriores demonstraram que AZT atua via inibição seletiva da transcriptase reversa do HIV pelo seu metabólito trifosfato (CIHLAR; ADRIAN; RAY, 2010) como descrito anteriormente.

Embora o AZT tenha provado ser um agente ARV clinicamente eficaz, o fármaco apresenta toxicidade dose-dependente. Esta toxicidade levou a reduções de dose, preservando a eficácia, mas com menos efeitos colaterais. Ainda assim, o AZT apresenta dose terapêutica alta (GAVIN; SCOTT, 1992).

O AZT pode ser administrado por via parenteral e oral, sendo rapidamente absorvido por via oral, apresentando pico de concentração no soro entre 30 a 90 min após administração, tendo biodisponibilidade de apenas 60-70% e meia-vida biológica de 1 h, mas a meia-vida intracelular do trifosfato ativo é de 3 h (RACHLIS, 1990), o que significa que as concentrações intracelulares do fármaco declinam mais lentamente. Além disso, o AZT é um fármaco Classe III, isto é, apresenta solubilidade alta e permeabilidade baixa - segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutico proposto por Amidon e colaboradores (1995) -, e demonstra alto metabolismo pré-sistêmico pela glucuronidação hepática e rápida excreção na urina (RACHLIS, 1990).

Todas essas características do AZT, apresentadas acima, culminam na necessidade de dose alta por via oral, quando o sistema é de liberação imediata (isto é, liberam 80 % do fármaco em 30 min ou menos), para alcançar uma ação terapêutica desejada, o que o torna um bom candidato a fármaco para sistemas de liberação controlada de fármaco.

Neste trabalho, além de desenvolver e avaliar um sistema de liberação controlada de AZT foi selecionado um polímero com característica de não-toxicidade, biodegradabilidade e biocompatividade para o organismo humano.

## **2.4 PLLA**

Os poliésteres alifáticos constituem um grupo de homopolímeros ou copolímeros sintetizados, não tóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis. Em meio aquoso sofrem degradação hidrolítica em ácidos hidroxicarboxílicos não tóxicos, por meio de clivagem de

ligações éster. Os poliésteres alifáticos são eventualmente metabolizados a dióxido de carbono e água, através do ciclo do ácido cítrico, sendo assim considerados materiais seguros e biodegradáveis (CHU; CAMPBELL, 1982; ROWE; SHESKEY; WELLER, 2009).

Os poliésteres alifáticos são utilizados principalmente como polímeros biocompatíveis e biodegradáveis para formulação de sistemas de liberação de fármacos implantáveis (incluem varetas, cilindros, tubos, películas, fibras, grânulos e esferas) e injetáveis (incluem microcápsulas, microesferas e nanopartículas) para uso humano e veterinário. A razão de biodegradação e as características de liberação do fármaco a partir desses sistemas formulados com os poliésteres alifáticos podem ser controladas por alteração das propriedades físico-químicas dos polímeros, tais como cristalinidade, hidrofobicidade, estereoquímica de monômero, razão de copolímero e massa molecular do polímero (ROWE; SHESKEY; WELLER, 2009, p. 63-68).

O poli(L-ácido láctico) (PLLA) é um poliéster alifático e degrada-se em ácido L-lático, um produto metabólico natural. O PLLA é um polímero semicristalino, isto é, polímero formado por regiões amorfa e cristalina, sendo que a região amorfa é aquela caracterizada por completa desordem de moléculas, ao contrário das regiões cristalinas, em que os segmentos de cadeias moleculares estão estendidos, arranjados de uma maneira ordenada formando um empacotamento regular, chamado cristalito amorfo com resíduos cristalinos.

O ponto de fusão do PLLA é alcançado no intervalo de 175~185 °C, sendo a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) no intervalo de 60~65 °C e massa molecular no intervalo de 5.000~700.000 (PIEMONTE; GIRONI, 2013).

## **2.5 Gás carbônico supercrítico**

O gás carbônico (CO<sub>2</sub>) é o FSC mais utilizado em aplicações farmacêuticas, não apenas pelo custo, mas também pelas condições supercríticas mais brandas, o que, por sua vez, possibilita o processamento de fármacos e outras matérias-primas termolábeis (REVERCHON *et al.*, 2000; BRUNNER, 1994).

O CO<sub>2</sub> supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>) é obtido na temperatura crítica ( $T_c$ ) de 304,12 K e pressão crítica ( $P_c$ ) de 7,37 Mpa (YASUJI; TAKEUCHI; KAWASHIMA, 2008; CARRILHO; TAVARES; LANÇAS, 2001; REID; PRAUSNITZ; POLING, 1987).

### **3 OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho foi utilizar condições supercríticas para desenvolver dispersões sólidas de AZT com PLLA.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Utilizar o planejamento fatorial  $3^2$  completo aleatorizado para o delineamento da formulação de AZT com PLLA.

Utilizar o processo de antissolvente supercrítico (SAS) para obtenção das dispersões sólidas de AZT com PLLA.

Avaliar do rendimento das amostras obtidas pelo processo SAS.

Caracterizar físico-quimicamente das amostras obtidas pelo processo SAS.

Estudar a permeação do AZT por método *ex vivo*.

Avaliar do teor e perfil de liberação de AZT das amostras obtidas pelo processo SAS.



## 4 MATERIAL

### Matérias-Prima

- ☐ AZT (Cristalia<sup>®</sup>), lote 0035/13, validade 27/11/15, grau de pureza 99,849%;
- ☐ Diclorometano (Chemco<sup>®</sup>), lote 25961 e validade Abril/2014;
- ☐ Etanol Absoluto (Synth<sup>®</sup>);
- ☐ Gás Carbônico (White Martins<sup>®</sup>) 99,9%, lote 40403123520001, validade 17/12/2015;
- ☐ Poli(L-ácido láctico) – produzido e doado pela Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek - Grupo de Biomateriais da Faculdade de Ciências Médicas e Saúde da PUC-SP;
- ☐ Polivinilpirrolidona K 30 (Henrifarma<sup>®</sup>), lote 16829, validade até 04/2014;
- ☐ Solução TC 199: NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, glicose.

### Equipamentos

- ☐ Calorímetro Exploratório Diferencial Shimadzu<sup>®</sup> DSC-60 – Tóquio, Japão - Projeto Fapesp nº 2012/01333-0
- ☐ Difratorômetro de Raios X Philips<sup>®</sup> Analytical X Ray, X'Pert-MPD – Almelo, Netherlands – LRAC/Unicamp
- ☐ Dissolutor American Lab<sup>®</sup> AL. 1000 – Charqueada, São Paulo, Brasil
- ☐ Equipamento de Sistema de reação/formação de partículas SAS/RESS com fluido supercrítico Waters<sup>®</sup> Corporation – SFC division, P/N 186006705 – N° de série 3646799-US40 – Milford Massachusetts, USA) – Projeto Fapesp nº 2012/01333-0
- ☐ Espectrofotômetro UV-Visível Shimadzu<sup>®</sup> MultiSpec-1501 – Tóquio, Japão
- ☐ Espectrômetro Infravermelho Transformador de Fourier Thermo Scientific<sup>®</sup> Nicolet 6700 – Madison, USA – LRAC/Unicamp
- ☐ Microscópio Eletrônico de Varredura com Detector de Energia e Dispersiva de raios X MEV/EDS: LEO Electron Microscopy, MEV: Leo 440i, EDS: 6070 – Oxford, Cambridge, Inglaterra – LRAC/Unicamp
- ☐ Incubadora com agitação orbital temporizada American Lab<sup>®</sup> AL140 – Piracicaba, São Paulo, Brasil

## 5 MÉTODOS

### 5.1 Delineamento experimental fatorial $3^2$ completo

O planejamento fatorial  $3^2$  completo aleatorizado foi utilizado no desenvolvimento da formulação para o sistema de liberação de AZT. Neste projeto, dois fatores foram avaliados cada um em três níveis (+1, 0, -1) e ensaios experimentais foram realizado com todas as nove possíveis combinações. No presente estudo, a proporção entre AZT:PLLA ( $X_1$ ) e as condições de temperatura e pressão ( $X_2$ ) foram selecionados como variáveis independentes.

O aspecto do produto quanto a morfologia macroscópica e o rendimento ( $R$ ) (calculada através da Equação 1) foram selecionados como variáveis dependentes.

$$R = \left( \frac{m_{obtida}}{m_{teórica}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Rendimento em porcentagem ( $R$ ) e  $m$  representa a massa.

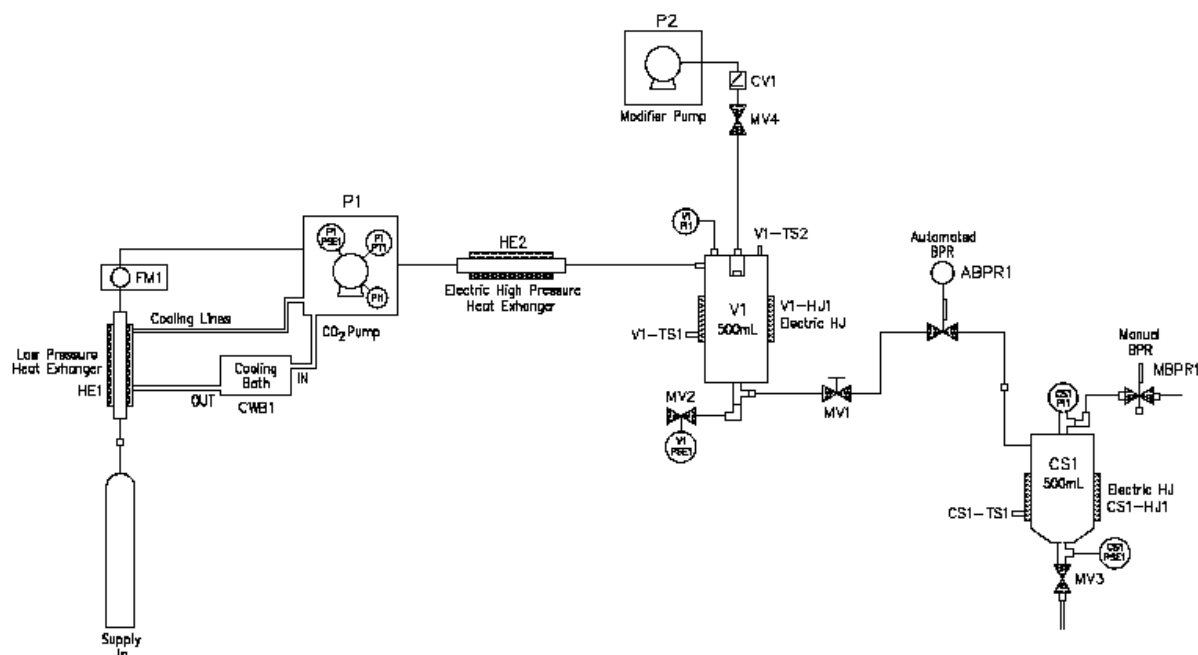
As misturas de AZT:PLLA ( $X_1$ ) foram avaliadas a 2:1 (m/m), 1:1 (m/m) e 1:2(m/m) e as condições de temperatura e pressão do processo ( $X_2$ ) foram avaliadas em 45 °C – 85 bar (318,15 K – 8,5 Mpa), 45 °C – 100 bar (318,15 K – 10,0 Mpa) e 45 °C – 135 bar (318,15 K – 13,5 Mpa).

### 5.2 Preparação das formulações para obtenção das dispersões sólidas

Foi preparada uma solução contendo o AZT e PLLA, nas diferentes proporções pré-estabelecidas, em diclorometano. Um banho de ultrassom foi utilizado para eliminar gases e homogeneizar a solução.

Durante o experimento, a temperatura e a pressão foram mantidas a 45 °C e 85, 100 e 135 bar, no equipamento de FSC utilizando o processo SAS. Quando as condições de estado estacionário foram alcançadas no reservatório de alta pressão (V1), a solução foi liberada para V1 por uma bomba de alta pressão (P2) com vazão de 0,75 mL.min<sup>-1</sup> e pulverizada através de um bocal de aço inoxidável do tipo capilar (101,6 µm DI). A pulverização foi mantida durante 27 min seguido por mais 20 min de fluxo de CO<sub>2</sub> para a conclusão da etapa. Depois disso, o CO<sub>2</sub> foi fornecido a uma razão de 3,0 mL.min<sup>-1</sup> para remover qualquer solvente orgânico residual por 15 min. Quando o passo de limpeza foi completado, o vaso de alta pressão foi lentamente despressurizado e as amostras foram recolhidas. O esquema do processo SAS é mostrado na Figura 2.

**Figura 2:** Diagrama esquemático do processo SAS para obtenção das partículas sólidas.



Fonte: Waters Corporation.

Onde, HE1 e HE2 representam trocadores de calor um e dois, respectivamente (*heat exchanger*); FM1 representa medidor de fluxo (*flow meter*); CWB1 representa banho de arrefecimento; P1 representa bomba de fluxo de CO<sub>2</sub> (*pump*); P2 representa bomba de fluxo da solução (*pump*); ABPR1 retorno de pressão automatizado (*automated back pressure*); MBPR1 retorno de pressão manual (*manual back pressure*); V1 representa vaso de precipitação (*vessel*); CS1 representa vaso separador de CO<sub>2</sub> e solvente (*cyclone*).

Fonte: Waters Corporation.

### 5.3 Liberação *in vitro* e cinética

A liberação *in vitro* do fármaco a partir das amostras foi avaliada quanto ao teor de AZT, taxa de liberação de AZT a partir das amostras, e os dados obtidos pelo teste de dissolução foram utilizados no estudo da cinética de liberação de AZT.

#### 5.3.1 Determinação do teor de AZT

Para a construção das curvas analíticas do AZT por análise espectrofotométrica, uma solução aquosa de AZT foi preparada, a partir de uma solução inicial na concentração de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>. E, diluições sucessivas nas concentrações de 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 17,5 e 20,0 µg.mL<sup>-1</sup> foram feitas em triplicata. As absorvâncias das respectivas concentrações foram determinadas por espectrofotometria UV ( $\lambda=266$  nm). A média das absorvâncias para as diferentes concentrações, o desvio padrão e o coeficiente de variação foram determinados

matematicamente. A regressão linear foi determinada usando o método dos mínimos quadrados, bem como o seu correspondente coeficiente de correlação linear ( $r$ ).

O teor de AZT nas amostras AZT:PLLA foi determinado pela extração do AZT em água purificada. Uma massa de ~3,0 mg de amostra foi precisamente pesada e adicionada a 90mL de água purificada em balão volumétrico. Esta dispersão foi mantida a temperatura de 37°C e sob agitação constante (150 rpm) por um período de tempo de 24 h. Após este período, o volume foi completado para 100 mL com água purificada e as amostras foram filtradas através de papel filtro com porosidade 2,0 micras. O filtrado foi devidamente diluído (obtendo-se uma concentração teórica entre 5 a 20  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) para permitir a leitura dentro do intervalo da curva analítica, determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 266 nm. As concentrações de AZT das amostras foram calculadas utilizando a equação da reta obtida através da curva analítica ( $n=3$ ). O teor de AZT foi calculado pela Equação 2.

$$\text{Teor (\%)} = \frac{\text{massa fármaco obtido}}{\text{massa soluto precipitado}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

### 5.3.2 Avaliação, *in vitro*, da liberação do AZT das amostras

A avaliação da liberação do fármaco a partir das amostras foi determinada utilizando conforme parâmetros apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Condições utilizadas nos testes de dissolução.

| Parâmetro                    | Condição               |
|------------------------------|------------------------|
| Meio de dissolução           | Ácido clorídrico 0,1 N |
| Volume do meio de dissolução | 900 mL                 |
| Temperatura                  | 37± 0,5 °C             |
| Valor de pH                  | 1,2                    |
| Velocidade de rotação        | 50 rpm                 |
| Sistema de agitação          | Aparato II (pá)        |

Neste estudo foram utilizadas três cubas para cada amostra. As amostras foram introduzidas nas cubas com intervalo de 90 s. Aliquotas de 5,0 mL foram retiradas do meio de dissolução nos seguintes tempos: 0,25 h, 0,50 h, 1,0 h, 2,0 h, 3,0 h, 4,0 h, 5,0 h, 6,0 h, 7,0 h, 8,0 h, 9,0 h, 10,0 h, 20,0 h e 24,0 h. Estas amostras foram filtradas e a concentração de AZT dissolvido no meio foi determinada por espectrofotometria (266 nm). O volume do meio de dissolução foi mantido constante pela reposição, imediata, do volume, retirado em cada

tempo. A concentração de AZT presente nas amostras foi calculada a partir da equação da reta obtida anteriormente. O resultado foi utilizado para avaliar o perfil de liberação.

### 5.3.3 Avaliação da cinética de liberação

Os dados obtidos dos perfis de dissolução foram submetidos a tratamento, utilizando o software SigmaPlot 10.0, em três modelos matemáticos (Tabela 2) (COSTA; LOBO, 2001) para interpretação da cinética de dissolução.

**Tabela 2:** Representação matemática dos modelos usados para descrever os perfis de liberação.

| Modelo           | Equação                     |
|------------------|-----------------------------|
| Primeira Ordem   | $\ln Q_t = \ln Q_0 K_1 t$   |
| Higuchi          | $Q_t = Q_0 + K_H t^{1/2}$   |
| Korsmeyer-Peppas | $Q_t/Q_\infty = K_{KP} t^n$ |

## 5.4 Caracterização físico-química

As características físicas e químicas das amostras foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (DRX), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

### 5.4.1 Morfologia através de MEV

Uma pequena porção do pó ou das partículas foi colocada em uma fita adesiva de carbono dupla face presa a um *stub* de alumínio. Os *stubs* foram recobertos com uma fina camada de ouro no metalizador (SC7620 Spatter Coater).

As amostras foram submetidas à condição de vácuo, o gás argônio foi liberado como meio que forma o plasma para ionizar a placa metálica de ouro e a corrente foi ajustada para 3mA durante 3 min para obter um filme de recobrimento com espessura  $\sim 92 \text{ \AA}$ . Em seguida, as amostras foram aleatoriamente microfotografadas e digitalizadas em microscópio eletrônico de varredura com detector de energia e dispersiva de raios X MEV/EDS: LEO Electron Microscopy, MEV: Leo 440i, EDS: 6070 – Oxford, Cambridge, Inglaterra. Para a análise das amostras foi utilizada tensão de aceleração igual a 5 kV e corrente do feixe igual a 50 pA. Para obtenção das fotomicrografias foi utilizado microscópio eletrônico de varredura.

### 5.4.2 Cristalinidade através de DRX

Os estudos de DRX das amostras foram realizados utilizando difratômetro de raios X Philips® Analytical X Ray, X'Pert-MPD – Almelo, Netherlands, com níquel purificado e

radiação de cobre (Cu K $\alpha$  de  $\lambda=1,54060$  Å). Todas as análises foram realizadas com a difração em ângulo de  $2\theta$ , variando de 4 a 40°, passo: 0,02 graus, velocidade 0,05 graus/segundo. A voltagem e corrente usadas foram 40 kV e 40 pA, respectivamente.

#### 5.4.3 Análise térmica através de DSC

As medidas de DSC foram realizadas utilizando um Calorímetro Exploratório Diferencial (Shimadzu<sup>®</sup>, DSC-60 – Tóquio, Japão), equipado com controlador de fluxo modelo FC 60A; *software* e interface para controle e aquisição de dados e sistema de selagem de cadinho. As curvas DSC das amostras foram obtidos utilizando cadinho de alumínio hermético com ~5mg de amostra sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup> na faixa de temperatura de 30 a 350 °C.

#### 5.4.4 Identificação por espectroscopia FTIR

Os espectros de absorção das amostras por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos através de equipamento espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier Thermo Scientific<sup>®</sup> Nicolet 6700 – Madison, USA. A medida no modo ATR com o acessório SMART OMNI-SAMPLER foi a condição de análise espectrofotométrica. Os espectros foram obtidos na faixa de 4000 a 675 cm<sup>-1</sup> com resolução 4 cm<sup>-1</sup>.

#### 5.4.5 Estudo, *ex vivo*, de permeação intestinal por MSIIR

A permeação intestinal das amostras foi avaliada utilizando o modelo de saco intestinal invertido de rato (MSIIR). Os sacos intestinais foram obtidos de ratos machos adultos, da linhagem Wistar, pesando entre 250 e 300 g, após jejum por um período de 8 h (ZANCHETTA *et al.*, 2008; CHAUD *et al.*, 2010; CORREA *et al.*, 2011; FERRARI *et al.*, 2012).

Após medicação pré-anestésica inalatória (halotano em solução) e anestesia com pentobabital administrado por via intraperitonal, o intestino delgado foi imediatamente dissecado, lavado com solução TC199 a 10°C e inseridos em 20 mL de meio de cultura para tecido (TC199) na mesma temperatura e oxigenado (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> – 95:5). O intestino foi então invertido com auxílio de uma haste flexível com sua extremidade protegida com um fino tecido de seda (*mini brush*), uma das extremidades foi fechada utilizando fio de sutura e o segmento intestinal preenchido com solução TC199. A outra extremidade do segmento

intestinal foi então fechada com auxílio de fios de sutura, de forma que o comprimento do segmento intestinal fosse de 6 cm.

Ao meio de incubação foi adicionado, separadamente, o AZT puro e as amostras contendo AZT. A incubação foi realizada a 37 °C, sob agitação suave do sistema previamente oxigenado. Após o período de 60 min de incubação, as amostras (n=6) do interior (em contato com a membrana serosa) e do exterior (em contato com a membrana mucosa) do saco intestinal foram filtradas e analisadas por espectrofotometria UV ( $\lambda=266$  nm).

A solução designada de TC199 foi composta de 8,47 g NaCl; 0,34 g KCl; 0,126 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,595 g  $\text{NaHPO}_4$  e 0,018 g de glicose, para preparar um litro de solução com valor de pH 7,4. Os reagentes e solventes foram de grau analítico. O protocolo para estudo de permeação intestinal de fármaco utilizando saco intestinal invertido de ratos foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR) sob o nº 003/2011, atendendo a Res. CFMV nº 1000/ 2012.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Seleção dos parâmetros para preparação das amostras em condições supercríticas

O delineamento fatorial  $3^2$  completo aleatorizado foi utilizado no desenvolvimento da formulação para o sistema de liberação de AZT, obtido por processo SAS, resultando em três níveis (+1, 0, -1) do fator  $X_1$  (proporção entre AZT:PLLA (m/m)) e três níveis (+1, 0, -1) do fator  $X_2$  (condições de temperatura e pressão): Assim, para cada repetição foi obtido nove tratamentos.

O aspecto do produto (particulado uniforme ou particulado não uniforme) é uma medida da qualidade tecnológica do produto e foi considerado um fator importante para seleção da formulação e das condições de temperatura e pressão.

A Tabela 3 mostra resultados de rendimento e aspecto macroscópico das amostras de AZT com PLLA. Os lotes de L1 a L9 correspondem às formulações obtidas do delineamento experimental  $3^2$  completo. No presente estudo, a variável independente  $X_1$  – nos três níveis diferentes (+1, 0 e -1) e variável independente  $X_2$  – nos três níveis diferentes (+1, 0 e -1) – resultaram na obtenção de precipitado sólido de diferentes aspectos, exceto para o L1. As variáveis dependentes do lote L1 provavelmente foram às condições para que fármaco e polímero fossem carregados juntos com o solvente para o vaso separador de CO<sub>2</sub> e solvente, isto é, não houve transferência de massa do solvente para o antissolvente. Estes resultados nortearam a seleção das amostras para as avaliações físico-químicas.

De acordo com o observado na Tabela 3 e nas Figuras 3, 4 e 5, para cada proporção AZT:PLLA, uma condição supercrítica diferente foi necessária para obter uma amostra uniforme. Nas amostras L1, L2 e L3 (proporção AZT:PLLA 1:2) a melhor condição foi obtida com 45°C e 85 bar (Figura 3). Nas amostras L4, L5 e L6 (proporção AZT:PLLA 1:1) a melhor condição foi obtida com 45°C e 100bar (Figura 4). Na amostra L7, L8 e L9 (proporção AZT:PLLA 2:1) a melhor condição foi obtida com 45°C e 85 bar (Figura 5). Desta forma, é possível afirmar que a melhor condição supercrítica depende da razão fármaco:polímero.

A formulação L3, corresponde à proporção 1:2 AZT:PLLA (nível +1) e temperatura de 45 °C e pressão de 85 bar (nível -1), apresentou-se uniforme e com ausência de grumos. As demais formulações apresentaram grau de uniformidade variável com presença de grumos. As características das amostras podem ser atribuídas à proporção de AZT e PLLA ou às condições de pressão do sistema em ambiente supercrítico, uma vez que às condições de temperatura e fluxo de CO<sub>2</sub> foram mantidos constantes para todas as formulações.



A massa não recuperada dos componentes das formulações pode ter sido eliminada junto com o solvente (resultado da transferência parcial de massa), durante o processo de remoção deste do vaso de precipitação do equipamento de fluido supercrítico.

**Tabela 3:** Delineamento fatorial  $3^2$  completo para preparação das formulações.

| Código do lote | Valores codificados |                     | Rendimento (%) | Aspecto do produto* |
|----------------|---------------------|---------------------|----------------|---------------------|
|                | $X_1$<br>(AZT:PLLA) | $X_2$<br>( $T, P$ ) |                |                     |
| L1             | +1                  | +1                  | 0              | -                   |
| L2             | +1                  | 0                   | 51,50          | +                   |
| L3             | +1                  | -1                  | 91,54          | +++                 |
| L4             | 0                   | +1                  | 78,74          | +                   |
| L5             | 0                   | 0                   | 59,06          | ++                  |
| L6             | 0                   | -1                  | 75,80          | +                   |
| L7             | -1                  | +1                  | 77,29          | +                   |
| L8             | -1                  | 0                   | 62,50          | +                   |
| L9             | -1                  | -1                  | 51,50          | ++                  |

| Valores codificados | $X_1$ | $X_2$       |
|---------------------|-------|-------------|
| -1                  | 2:1   | 45°C-85bar  |
| 0                   | 1:1   | 45°C-100bar |
| +1                  | 1:2   | 45°C-135bar |

\*Legenda: Não obtenção de produto (-); amostra com aspecto uniforme (+++); amostra com aspecto não uniforme e presença de filamentosos (++); amostra com aspecto não particulado (+). As Figuras 3, 4 e 5 mostram, respectivamente, o aspecto macroscópico das formulações após o processo SAS.

O comportamento de transferência de massa das gotículas é tido como fator crítico do processo e influencia a morfologia da partícula. A expansão volumétrica do  $\text{CO}_2$  reduz a capacidade de solvatação promovendo a supersaturação da fase líquida e a consequente formação das partículas por co-precipitação do fármaco com o carreador (MONTES *et al.*, 2011a). Portanto, a perda de massa dos componentes das formulações no processo está relacionada a uma expansão volumétrica insuficiente do  $\text{CO}_2$ . Nestas condições, a redução da capacidade de solvatação do  $\text{CO}_2$  não é suficiente para promover a supersaturação da fase líquida.

**Figura 3:** Fotografias do vaso coletor do equipamento FSC contendo amostra com aspecto uniforme (+++).



**Figura 4:** Fotografias do vaso coletor do equipamento FSC contendo sólido particulado de aspecto não uniforme e sólido filamentososo (++).





**Figura 5:** Fotografias do vaso coletor do equipamento FSC contendo sólido não particulado (+).



Dukhin e colaboradores (2003) evidenciaram a existência transitória de gotículas em condições ligeiramente acima do ponto de mistura crítica, devido à existência de uma tensão dinâmica interfacial. Desta forma, a descrição de transferência de massa a partir de uma gotícula, mesmo em condições miscíveis parece razoável.

Considerando o rendimento e o aspecto macroscópico do produto L3 (91,54 % e amostra com aspecto uniforme), este foi selecionado como principal amostra para caracterização físico-química, avaliação do perfil de dissolução e estudo *ex vivo* de permeação intestinal. Porém, considerando as mesmas variáveis dependentes foram selecionados os lotes L5 (59,06 % e amostra com aspecto não uniforme e sólido filamentosos) e L9 (51,50 % e amostra com aspecto não uniforme e sólido filamentosos).

## 6.2 Liberação *in vitro* e cinética

### 6.2.1 Determinação do teor de AZT

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003).

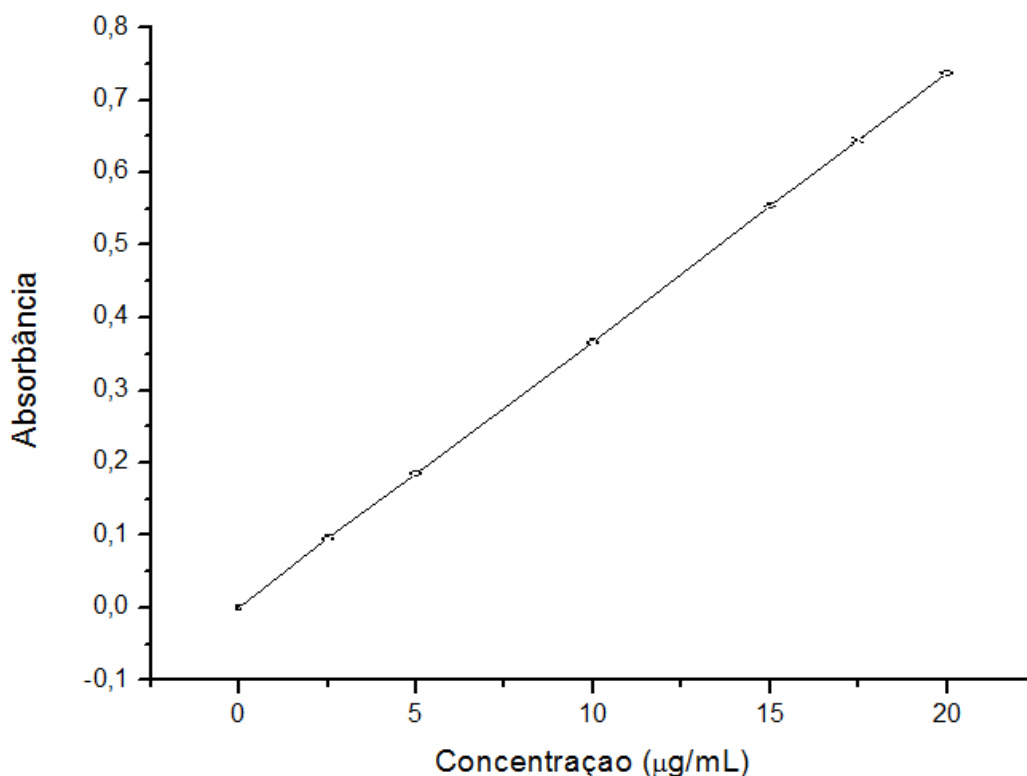
Os resultados do estudo de linearidade são apresentados na Figura 6. A **Tabela 4** mostra a correlação entre a concentração e a absorbância do AZT ( $n=3$ ). A média das leituras foram plotadas em um gráfico cartesiano para avaliação da linearidade (Figura 6). Os resultados obtidos mostram um coeficiente de variação menor que 2% e o coeficiente de correlação linear ( $r$ ) igual a 1,0.

Os resultados obtidos no presente estudo garantem que a espectrofotometria por UV em 266 nm é adequada para determinar a concentração de AZT em solução nesta faixa de concentração. Os parâmetros da curva analítica e a equação da reta são apresentados na **Tabela 5**.

Os resultados da avaliação de teor de AZT nas amostras são mostrados na Tabela 6. A amostra L3 apresentou rendimento de 91,54 % no processo SAS

**Tabela 4:** Avaliação da linearidade. Resultados em absorbância média, desvio padrão e coeficiente de variação dos pontos da curva de linearidade. DP Desvio padrão; CV Coeficiente de variação.

| Concentração<br>( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | Curva 1<br>(Abs) | Curva 2<br>(Abs) | Curva 3<br>(Abs) | Média  | DP       | CV%    |
|-------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|--------|----------|--------|
| 2,5                                       | 0,097            | 0,097            | 0,095            | 0,0963 | 0,001155 | 1,1904 |
| 5,0                                       | 0,184            | 0,184            | 0,186            | 0,1847 | 0,001155 | 0,6276 |
| 10,0                                      | 0,367            | 0,365            | 0,367            | 0,3663 | 0,001155 | 0,3146 |
| 15,0                                      | 0,555            | 0,553            | 0,553            | 0,5537 | 0,001155 | 0,2088 |
| 17,5                                      | 0,648            | 0,642            | 0,643            | 0,6443 | 0,003215 | 0,4999 |
| 20,0                                      | 0,736            | 0,739            | 0,736            | 0,7370 | 0,001732 | 0,2353 |

**Figura 6:** Curva analítica do AZT.**Tabela 5:** Parâmetros da curva analítica.

| Parâmetros                                  | Valores obtidos        |
|---------------------------------------------|------------------------|
| Coeficiente angular (a)                     | 0,0368                 |
| Intersecção com eixo y (b)                  | 0,0013                 |
| Constante de correlação linear ( <i>r</i> ) | 1                      |
| Equação da reta                             | $y = 0,0368x + 0,0013$ |

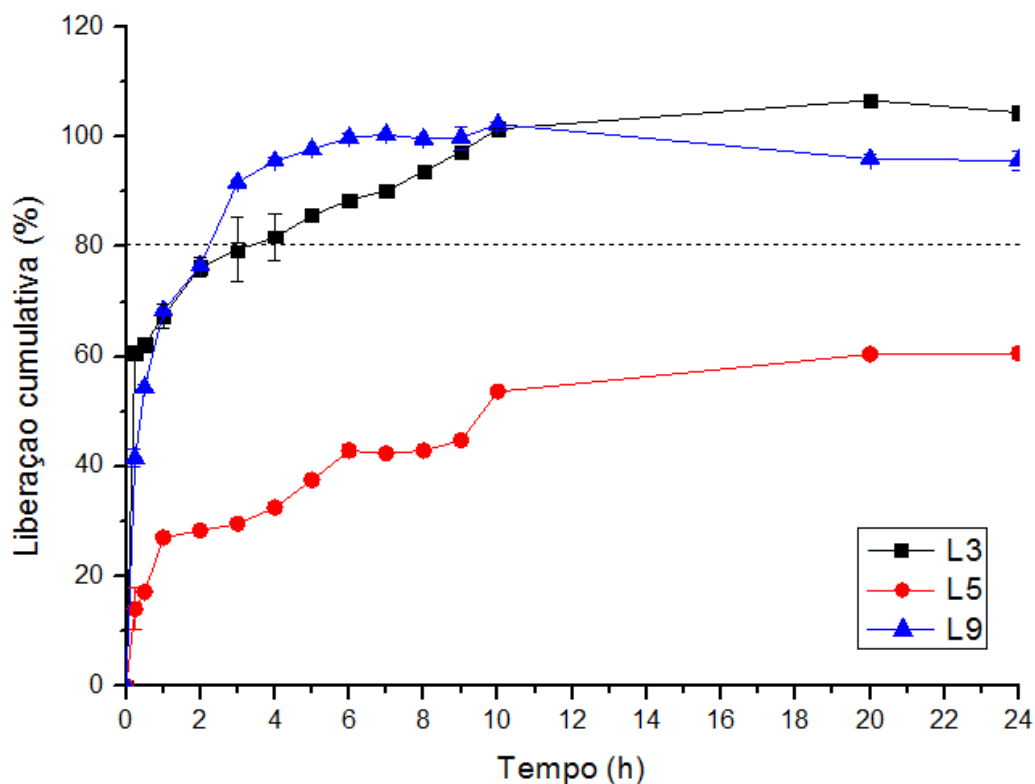
A detecção de AZT nas amostras (Tabela 6) comprovou que o fármaco foi preservado nas mesmas durante o processo produtivo. Sabendo que a proporção AZT:PLLA foi de 1:2, 1:1 e 2:1 em L3, L5 e L9, respectivamente, nas condições de pressão e temperatura 45 °C-85bar, 45 °C-100bar 45 °C-135bar, respectivamente, pode ser comprovado que houve influencia da proporção AZT:PLLA e da pressão supercrítica do processo produtivo na formação das amostras. Sendo que a proporção 1:2 (AZT:PLLA) e pressão supercrítica de 85 bar resultou em maior teor de fármaco na amostra e melhor rendimento em relação as condições investigadas.

**Tabela 6:** Teor de AZT nas amostras L3, L5 e L9.

| Amostra | Massa de amostra (mg/100mL de água) | Massa experimental de AZT ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Média AZT ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Teor (%) |
|---------|-------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------|----------|
| L3      | 2,30                                | 13,51                                          | 13,51                          | 58,76    |
|         |                                     | 13,51                                          |                                |          |
|         |                                     | 13,51                                          |                                |          |
| L5      | 3,02                                | 11,06                                          | 11,07                          | 36,66    |
|         |                                     | 11,06                                          |                                |          |
|         |                                     | 11,09                                          |                                |          |
| L9      | 3,87                                | 3,92                                           | 3,95                           | 10,21    |
|         |                                     | 3,92                                           |                                |          |
|         |                                     | 4,01                                           |                                |          |

### 6.2.2 Avaliação, *in vitro*, da liberação de AZT das amostras

A liberação do AZT a partir das amostras L3, L5 e L9 foi avaliada em pH 1,2, é mostrada na Figura 7.

**Figura 7:** Perfil de liberação do AZT a partir das amostras L3, L5 e L9 (n=3).

Na Figura 7 temos L3(-■-), L5 (-●-) e L9 (-▲-). Cada ponto representa a variação do experimento em triplicata. A barra de erros mostra o desvio padrão.

As três amostras testadas apresentaram perfil de liberação modificada de AZT, sendo que L3 liberou 100 % do fármaco em 10 h, L5 liberou 60 % do fármaco em 24 h de análise e L9 liberou 100 % do fármaco em 6 h.

Segundo Severino, Santana e Malmonge (2011), a degradação do PLLA, poliéster alifático, parece ocorrer em quatro etapas consecutivas: hidratação, degradação inicial, degradação posterior e solubilização.

Na etapa de hidratação do PLLA, o meio aquoso em que o polímero se encontra penetra na matriz polimérica, resultando no relaxamento das cadeiras do polímero.

A degradação inicial do PLLA começa na região hidratada do polímero através da hidrólise da ligação éster, resultando na clivagem da cadeia principal do polímero, liberação de ácido lático e na redução da massa do PLLA.

A hidrólise continua no interior da matriz hidratada de tal forma que a massa molecular do polímero diminui continuamente, embora mantenha a sua identidade polimérica. Na etapa de degradação posterior, a cadeia polimérica continua a ser hidrolisada e a sua massa molecular diminui até um ponto em que não consegue manter a sua integridade polimérica. Em consequência, inicia-se a perda da massa do polímero devido à sua solubilidade no meio aquoso (SEVERINO; SANTANA; MALMONGE, 2011).

A degradação do PLLA das amostras L3, L5 e L9 pode ter influenciado a liberação do AZT a partir das mesmas.

### 6.2.3 Avaliação da cinética de liberação de AZT das amostras

A Tabela 7 mostra os resultados do estudo matemático da cinética de liberação de AZT a partir das amostras L3, L5 e L9.

**Tabela 7:** Estudo cinético da liberação do fármaco considerando a constante de liberação ( $K$ ), os valores das constantes de correlação linear ( $r$ ) e expoente de liberação ( $n$ ).

| Lote | Primeira Ordem |       | Higuchi |       | Korsmeyer-Peppas |       |       |
|------|----------------|-------|---------|-------|------------------|-------|-------|
|      | $K_I$          | $r$   | $K_H$   | $r$   | $K_{KP}$         | $n$   | $r$   |
| L3   | 0,031          | 0,857 | 3,966   | 0     | 39,297           | 0,139 | 0,996 |
| L5   | 0,001          | 0,715 | 1,937   | 0,921 | 6,210            | 0,319 | 0,989 |
| L9   | 0,022          | 0,974 | 4,035   | 0     | 38,606           | 0,146 | 0,949 |

Os modelos cinéticos foram avaliados por meio da linearização dos dados de dissolução de acordo com o tempo e a porcentagem de AZT liberada. Utilizou-se a constante de correlação linear ( $r$ ) para a seleção do modelo cinético mais adequado (COSTA; LOBO, 2001).

O modelo cinético de Primeira ordem descreve a dissolução de fármaco em formas farmacêuticas, tais como aqueles contendo fármacos solúveis em água em matrizes porosas.



Neste modelo, para cada formulação foi plotado gráfico de tempo *versus*  $\ln$  da quantidade não dissolvida de AZT no tempo imediatamente anterior.

O modelo Higuchi descreve a dissolução do fármaco a partir de vários tipos de formas farmacêuticas de liberação modificada, tal como no caso de alguns sistemas transdérmicos e comprimidos matriciais com fármacos solúveis em água. Neste modelo, para cada formulação foi plotado gráfico da raiz quadrada do tempo *versus* quantidade dissolvida de AZT no tempo imediatamente anterior.

Korsmeyer e colaboradores (1983) desenvolveram um modelo semi-empírico, simples, relativo exponencialmente à liberação do fármaco no tempo ( $t$ ), que descreve a liberação do fármaco a partir de um sistema polimérico. E, Peppas (1985) usou o valor do expoente de liberação ( $n$ ) para caracterizar diferentes mecanismos de liberação, concluindo que através dos valores de  $n$  o mecanismo de transporte do fármaco pode ser classificado em difusão fickiana ou não fickiana como descrito na Tabela 8.

A amostra L3 não respondeu ao modelo Higuchi e apresentou  $r$  (0,857) com baixa linearidade para o modelo de Primeira ordem. De acordo com a Tabela 7, as amostras L3 e L5 apresentaram  $r$  mais próximo da linearidade para o modelo de Korsmeyer-Peppas. Os valores de  $n$  para ambas as amostras foi menor que 0,5, indicando a difusão do fármaco através do polímero por um mecanismo de difusão fickiano.

Apesar da amostra L5 ter liberado cerca de 60 % em 24 h do AZT, também apresentou  $r$  próximo à linearidade para o modelo de Higuchi, reforçando a sugestão da liberação do AZT como um processo de difusão baseado na Lei de Fick, sendo que este modelo pode ser usado para descrever a dissolução de fármaco de diversas formas farmacêuticas de liberação modificada (COSTA; LOBO, 2001).

A cinética de liberação para a amostra L9 apresentou  $r$  mais próximo da linearidade para o modelo de Primeira ordem, confirmando a dissolução do AZT para a liberação. Porém, o  $r$  (0,949) para o modelo Korsmeyer-Peppas foi muito semelhante e se considerarmos  $n$ , a difusão fickiana é sugerida como modelo de transporte do AZT.

**Tabela 8:** Interpretação do mecanismo de liberação por difusão a partir de filme polimérico.

| Expoente de liberação ( $n$ ) | Mecanismo de transporte do fármaco | Velocidade como uma função de tempo |
|-------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 0,5                           | Difusão fickiana                   | $t^{-0,5}$                          |
| $0,5 < n < 1,0$               | Transporte anômalo                 | $t^{n-1}$                           |
| 1,0                           | Transporte caso II                 | Liberação ordem zero                |
| $> 1,0$                       | Transporte super caso II           | $t^{n-1}$                           |

Fonte: Costa e Lobo (2001).

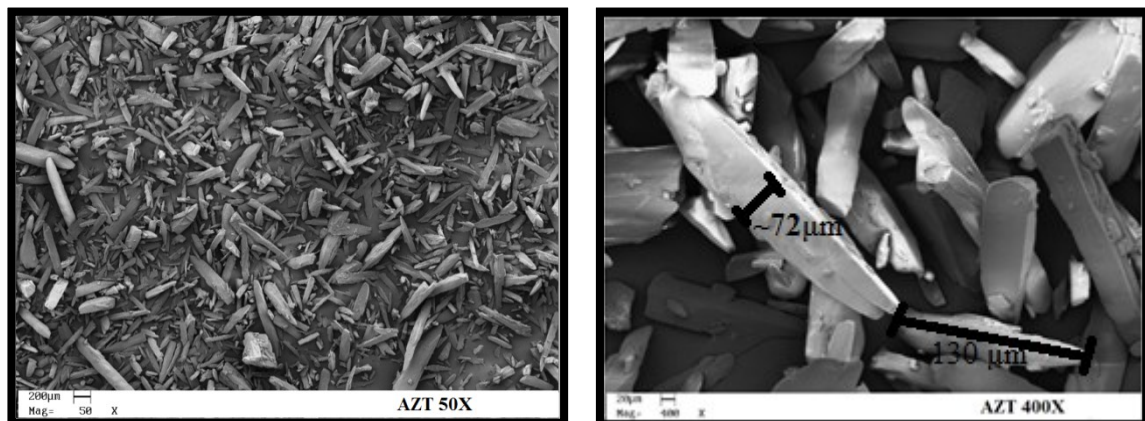
O conhecimento das etapas de degradação do PLLA, como proposto anteriormente, somado aos dados obtidos no estudo da cinética de liberação de AZT aprisionado nas amostras L3, L5 e L9, indica que o AZT foi solubilizado na fase de hidratação do PLLA e liberado das amostras L3, L5 e L9 por difusão nas fases de degradação inicial do PLLA.

### 6.3 Avaliação físico-química das amostras

#### 6.3.1 Análise morfológica por MEV

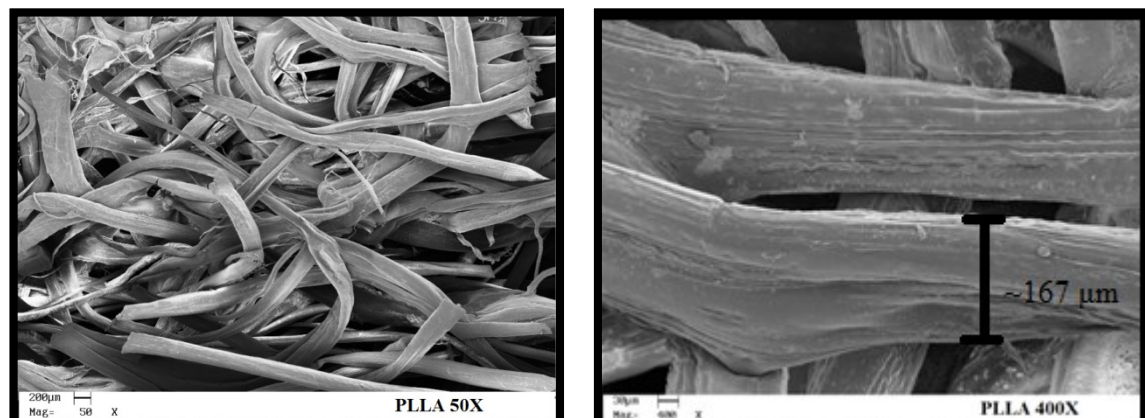
A Figura 8 mostra as fotomicrografias do AZT puro com aumento de 50× e 400× e revela a forma cristalina deste fármaco. Conforme descrito na literatura o AZT é um cristal com formato aculiforme.

**Figura 8:** Fotomicrografias das partículas de AZT obtidas por microscopia eletrônica de varredura.



A Figura 9 mostra as fotomicrografias do PLLA com aumentos de 50× e 400× e mostra a estrutura filamentosa deste polímero.

**Figura 9:** Fotomicrografias do PLLA obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

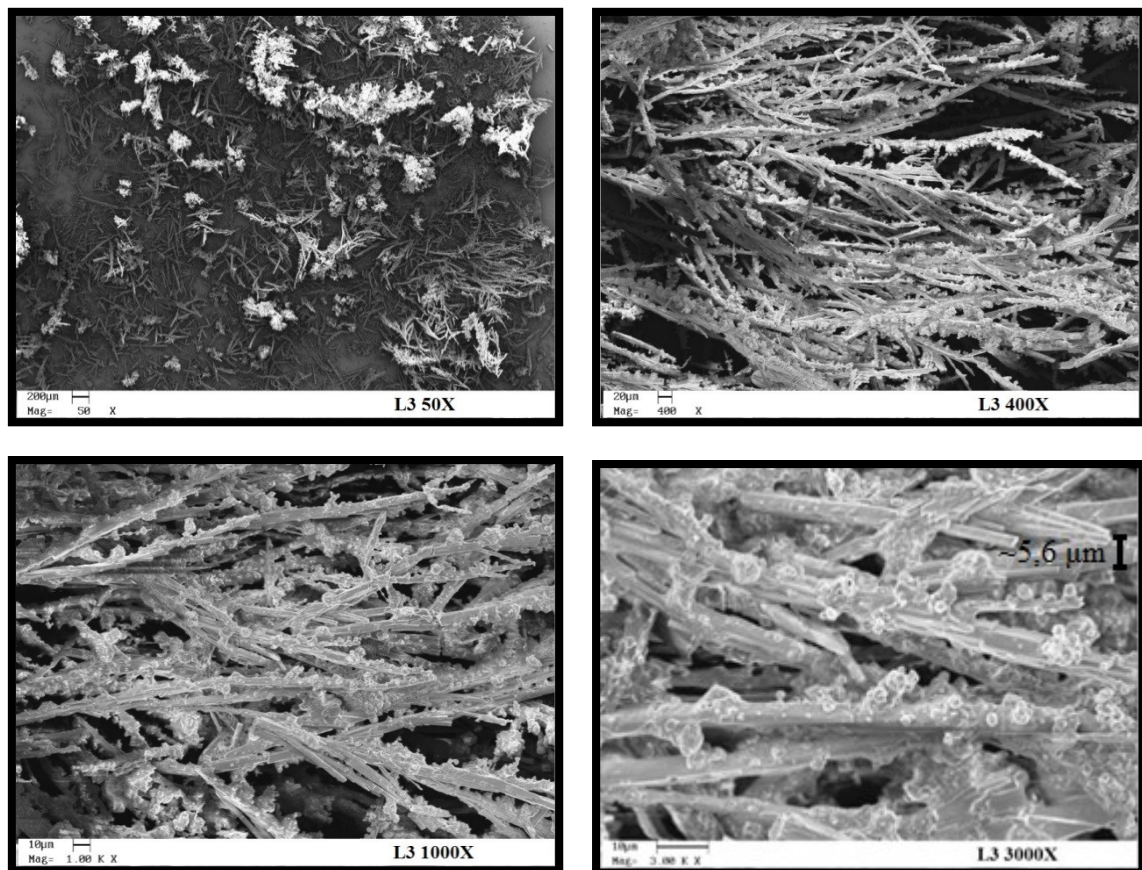


A Figura 10 mostra as fotomicrografias da amostra de AZT com PLLA (L3) com aumentos de 50 $\times$ , 400 $\times$ , 1000 $\times$  e 3000 $\times$  e mostra os cristais de AZT aderidos às fibras de PLLA.

Através das fotomicrografias foi possível observar a alteração na estrutura física de ambos, AZT e PLLA, na forma de dispersão sólida após processamento utilizando o método SAS.

A redução significativa no tamanho e diâmetro da fibra de PLLA (comparando o PLLA 400 $\times$  da Figura 9 com o a amostra L3 3000 $\times$  da Figura 10) e no tamanho dos cristais de AZT foi evidenciada nas fotomicrografias.

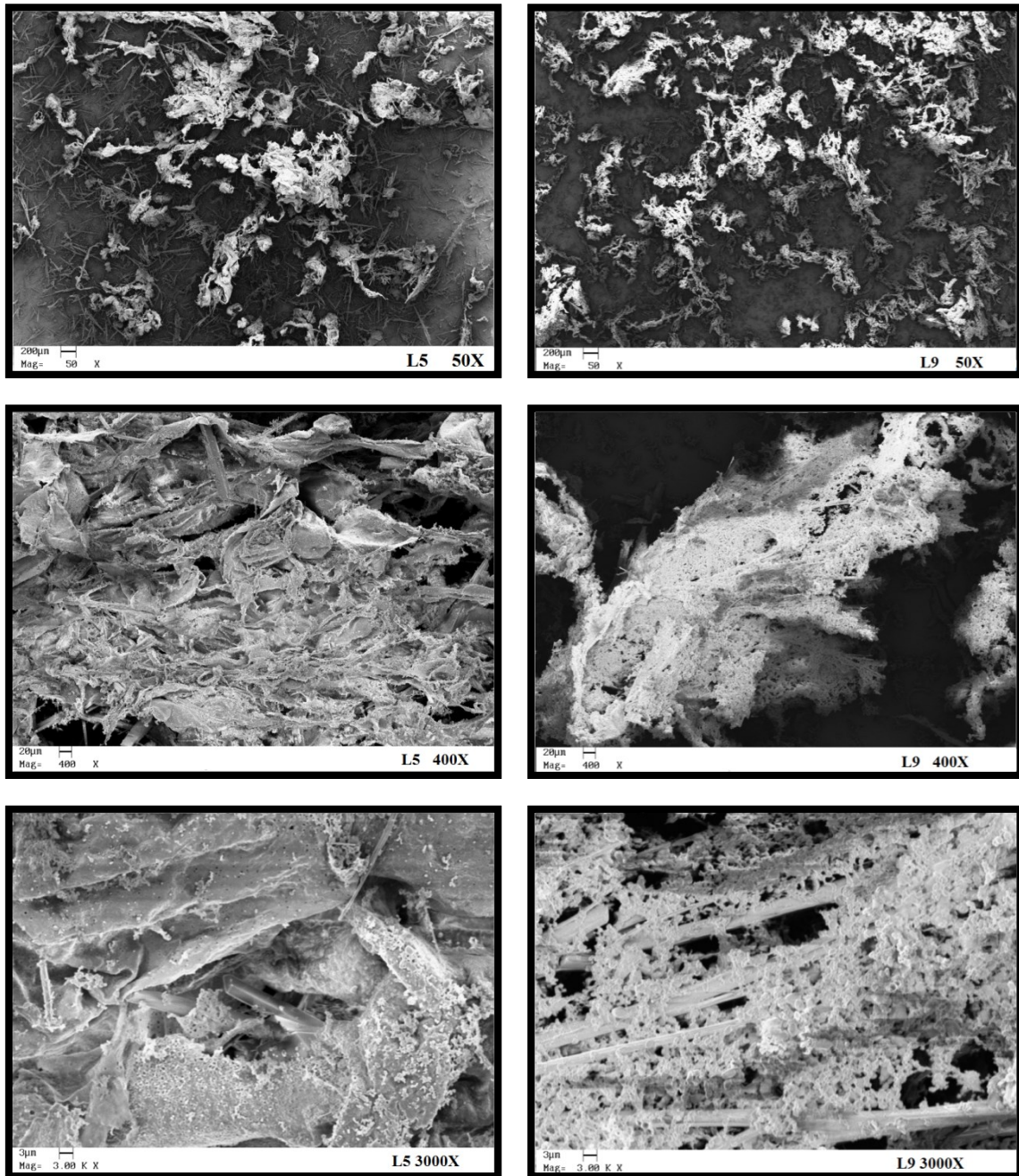
**Figura 10:** Fotomicrografias da amostra L3 obtidas por microscopia eletrônica de varredura (50 $\times$ , 400 $\times$ , 1000 $\times$  e 3000 $\times$ ).



A Figura 11 mostra as fotomicrografias das amostras L5 e L9 com aumentos de 50 $\times$ , 400 $\times$  e 3000 $\times$ . Tanto a amostra L5, como a amostra L9, apresentou morfologia desordenada quando comparadas a amostra L3.



**Figura 11:** Fotomicrografias das amostras L5 e L9 obtidas por microscopia eletrônica de varredura (50×, 400× e 3000×).



### 6.3.2 Cristalinidade através de DRX

A análise DRX oferece uma identificação precisa da fase sólida cristalina. Devido à intensidade dos picos dependerem também da concentração do fármaco, entre outros fatores, a diminuição dos tamanhos dos picos era esperada para as amostras.

O padrão de DRX do AZT, PLLA, L3, L5 e L9 são mostrados na Figura 12 (sem valores de intensidade normalizada) e na Figura 13 (com valores de intensidade normalizada).

A normalização dos valores de intensidade nos difratogramas foi feita convertendo o maior valor de pico de cada difratograma equivalendo a um, permitindo evidenciar melhor as comparações entre eles.

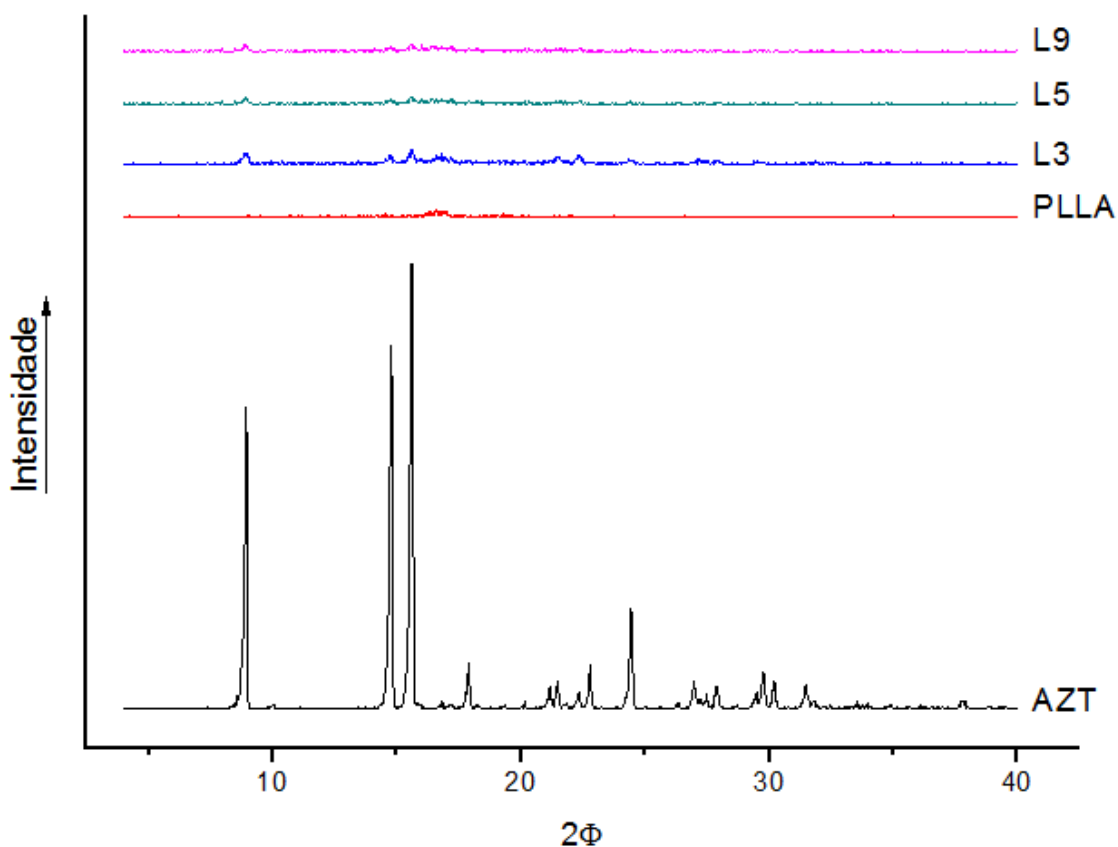
O difratograma do AZT exibiu vários picos, indicando que ele é um composto cristalino (Figura 12).

O difratograma do PLLA (Figura 12) revelou uma banda larga característica de composto amorfo (sem picos finos e afinados), exceto na faixa de  $16,04 \leq 2\Phi \leq 17,02$ , que apresentou pequenos picos evidenciando os resíduos cristalinos do PLLA sendo este um polímero semicristalino (PIEMONTE; GIRONI, 2013).

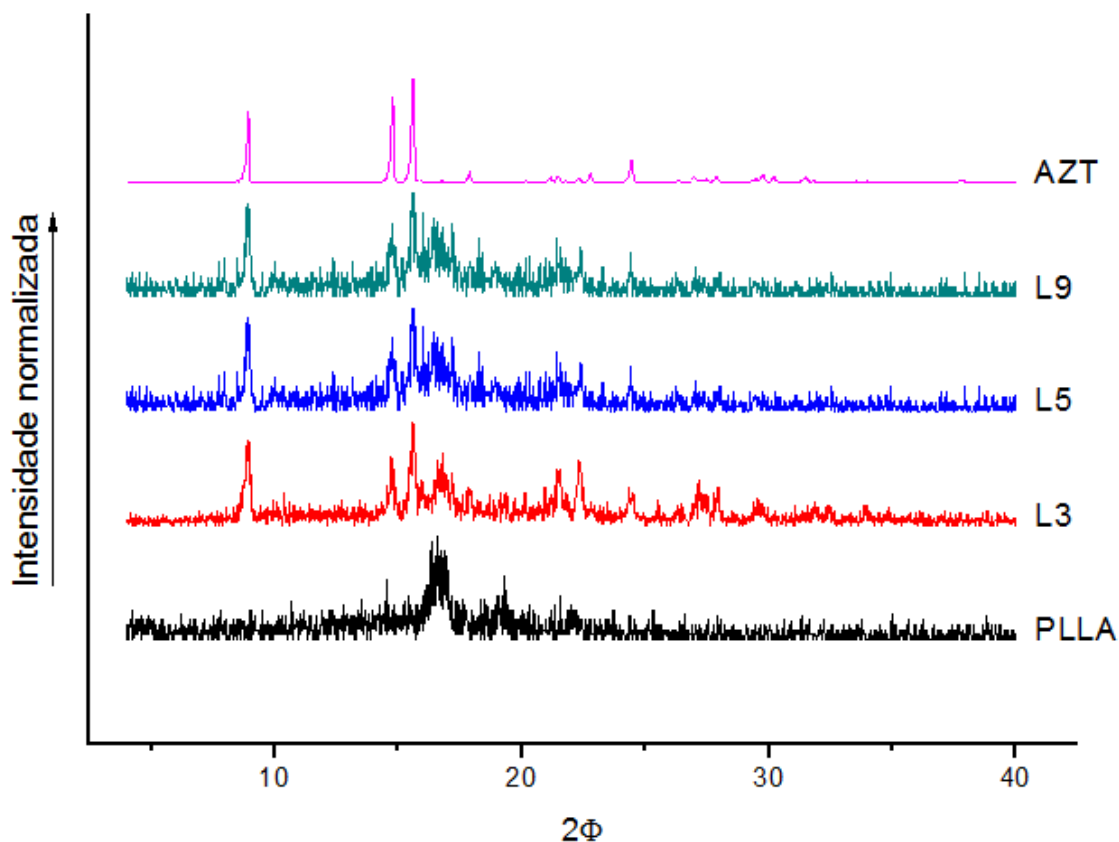
A manutenção da forma cristalina do AZT nas amostras L3, L5 e L9 (Figura 12) foi observada nos difratogramas das Figuras 12 e 13, que mostram picos agudos referentes ao AZT na banda larga referente ao PLLA. Resultados semelhantes foram descritos na literatura (RAVIOLO; BRIÑÓN, 2011; GUPTA; PATHAK, 2008; CUI *et al.*, 2003).

A banda larga referente ao PLLA reproduzida nas amostras L3, L5 e L9 (Figura 13).

**Figura 12:** Padrão de Difração Raios X do AZT, das amostras L3, L5 e L9 e do PLLA.



**Figura 13:** Padrão de Difração Raios X normalizado do AZT, das amostras L3, L5 e L9 e do PLLA.



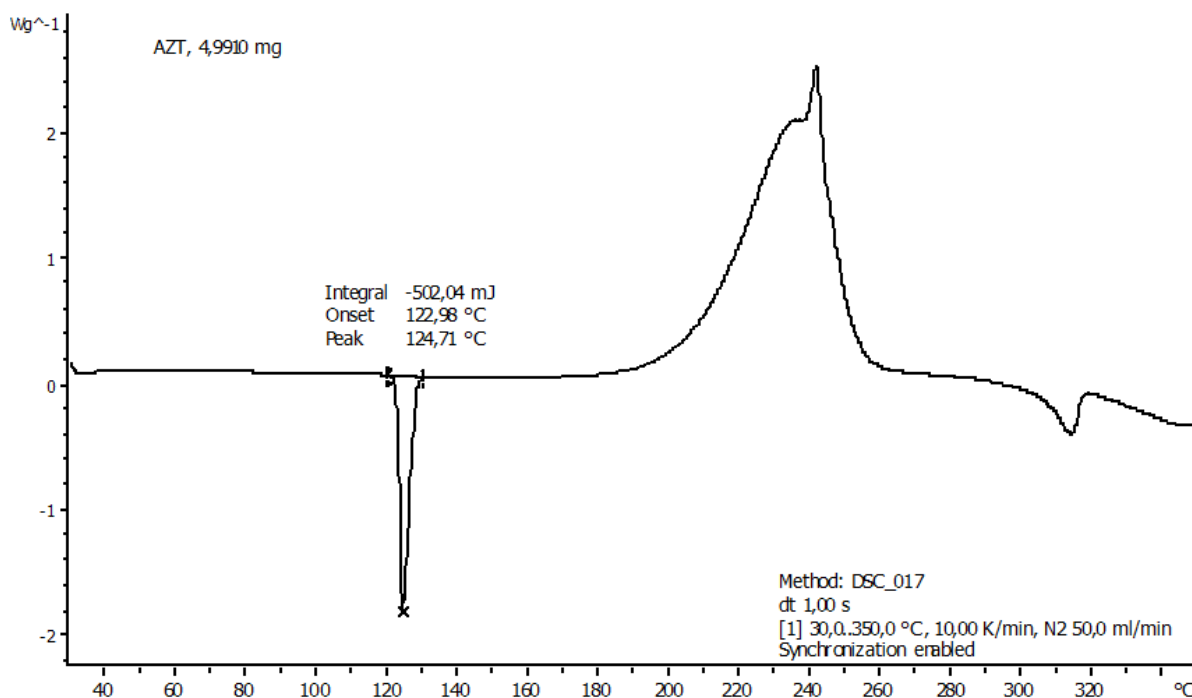
### 6.3.3 Análise térmica através de DSC

O AZT foi caracterizado termicamente através das curvas DSC, como mostra a Figura 14. A curva de DSC do AZT exibe um evento endotérmico agudo, na faixa de 120 °C a 130 °C ( $T_{onset} = 122,98$  °C), com um consumo de energia de 100,595 J/g, característico do processo de fusão da substância, confirmando o preconizado na literatura para o AZT (USP 31, 2008). Após a fusão, o processo de decomposição tem início na temperatura de 169 °C, sendo evidenciado por dois eventos consecutivos. O primeiro, evento exotérmico, ocorreu na faixa de temperatura de 180 e 260 °C com temperatura de pico em 242 °C. O segundo evento endotérmico entre 274 e 320 °C representado por um pico de menor intensidade. A curva de DSC de AZT apresentada neste estudo foi muito semelhante à obtida por Araújo e colaboradores (2003), Rodrigues e colaboradores (2005), Raviolo e Briñón (2011) e Yoshida e colaboradores (2011).

A curva DSC do PLLA (Figura 15) exibe três eventos endotérmicos: o primeiro evento com  $T_g = 63,14$  °C que representa a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ); o segundo com  $T_{onset} = 122,78$  °C poderia ser interpretado como um pico de fusão não descrito na literatura; e

o terceiro na faixa de 160°C a 191 °C ( $T_{onset} = 167,48$  °C) coerente com o intervalo de 165~185 °C preconizado na literatura para temperatura de fusão (CHU; CAMPBELL, 1982; BESLIKAS *et al.*, 2011; BUZAROVSKA; GROZDANOV, 2012). Os mesmos eventos em menor intensidade foram observados nas curvas DSC das amostras L3, L5 e L9. Após a fusão, o processo de decomposição tem início na temperatura de ~250 °C.

**Figura 14:** Curva DSC do AZT em atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL.min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento 10 °C.min<sup>-1</sup>.



A energia transferida para um sistema é representada como  $q$ . Portanto, quando a energia interna de um sistema se altera por transferência de energia na forma de calor. Na termodinâmica, a capacidade de um sistema realizar trabalho – seu conteúdo total de energia – é chamada sua energia interna,  $U$ . Em um sistema com volume constante, na qual nenhum trabalho de expansão é realizado, a variação na energia interna é igual à energia fornecida ao sistema na forma de calor ( $\Delta U = q$ , em volume constante) (ÇENGEL; BOLES, 2013).

A função de estado que permite obter informações sobre as variações de energia em pressão constante é chamada de entalpia,  $H$ :

$$H = U + pV$$

### Equação 3

em que  $U$ ,  $p$  e  $V$  são a energia interna, a pressão e o volume do sistema. O que temos de mostrar agora é que uma consequência dessa definição e da primeira lei da termodinâmica é que a variação da entalpia de um sistema é igual ao calor liberado ou absorvido em pressão constante. A variação de entalpia é igual ao calor fornecido ao sistema em pressão constante.

Para um processo endotérmico,  $\Delta H > 0$ . Para um processo exotérmico,  $\Delta H < 0$  (ÇENGEL; BOLES, 2013).

Para processos envolvendo apenas sólidos e líquidos os valores de  $\Delta H$  e  $\Delta U$  podem ser considerados idênticos. Isto porque estes têm volumes molares ( $pV_m$ ) pequenos, assim:

$$H_m = U_m + pV_m \cong U_m \quad \text{Equação 4}$$

Os valores da variação de entalpia de fusão para AZT e PLLA ( $\Delta H_{AZT}$  e  $\Delta H_{PLLA}$ , respectivamente) ( $J/g$ ) foram calculados pela razão do valor da integral ( $\Delta U$ ;  $mJ$ ) obtida em relação a massa ( $mg$ ) da amostra pesada analiticamente para cada experimento DSC.

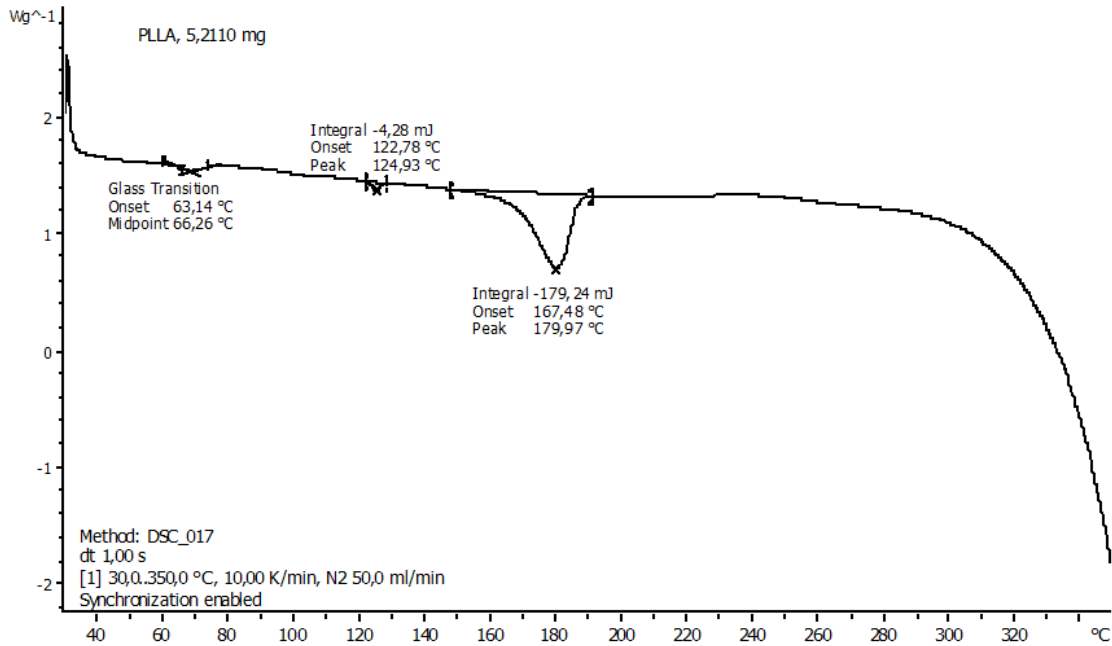
Os valores da variação de entalpia esperada de fusão ( $\Delta H_{esperado}$ ) e os valores de variação de entalpia experimental de fusão ( $\Delta H_{experimental}$ ) foram calculados para as amostras L3, L5 e L9. Sendo que, os valores de  $\Delta H_{esperado}$  ( $J/g$ ) foram calculados através da Equação 4 e os valores  $\Delta H_{experimental}$  ( $J/g$ ) foram calculados através da Equação 5.

$$\Delta H_{AZT} = \frac{\Delta U_{integral}}{m} \quad \text{Equação 5}$$

$$\Delta H_{AZT} = \frac{\Delta U_{integral}}{m} = \frac{502,04}{4,991} = 100,595 J/g$$

$$\Delta H_{esperado} = \frac{massa_{AZT} da amostra \times \Delta H_{AZT}}{4,991} \quad \text{Equação 6}$$

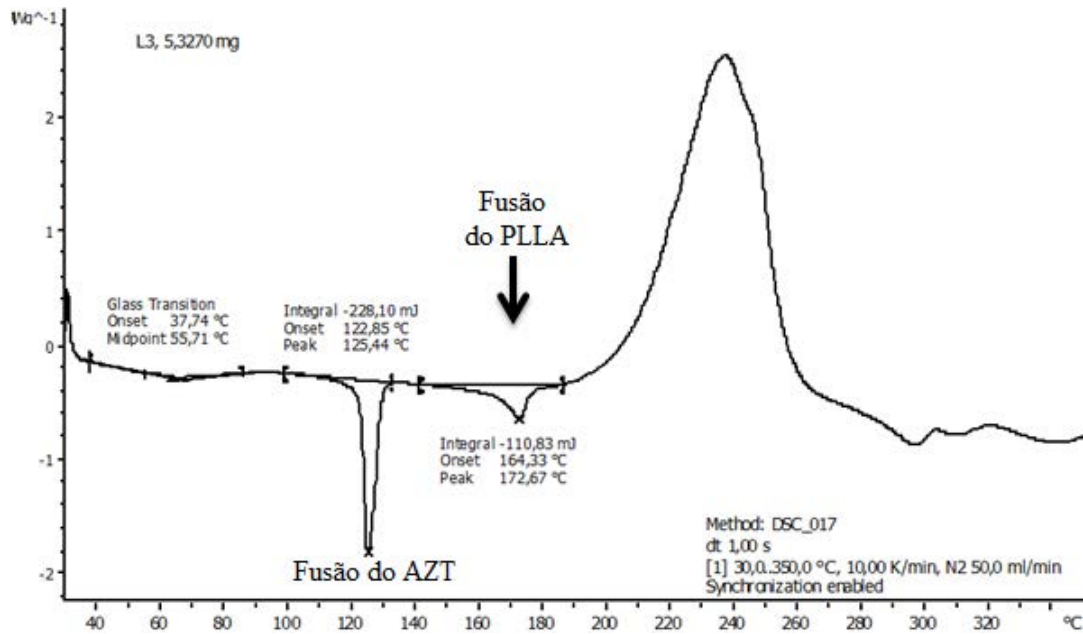
**Figura 15:** Curva DSC do PLLA em atmosfera dinâmica de  $N_2$  ( $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ) e razão de aquecimento  $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ .



$$\Delta H_{PLLA} = \frac{\Delta U_{integral}}{m} = \frac{4,28}{5,211} = 0,821 J/g$$



**Figura 16:** Curva DSC da amostra L3 em atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL.min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento 10 °C.min<sup>-1</sup>.

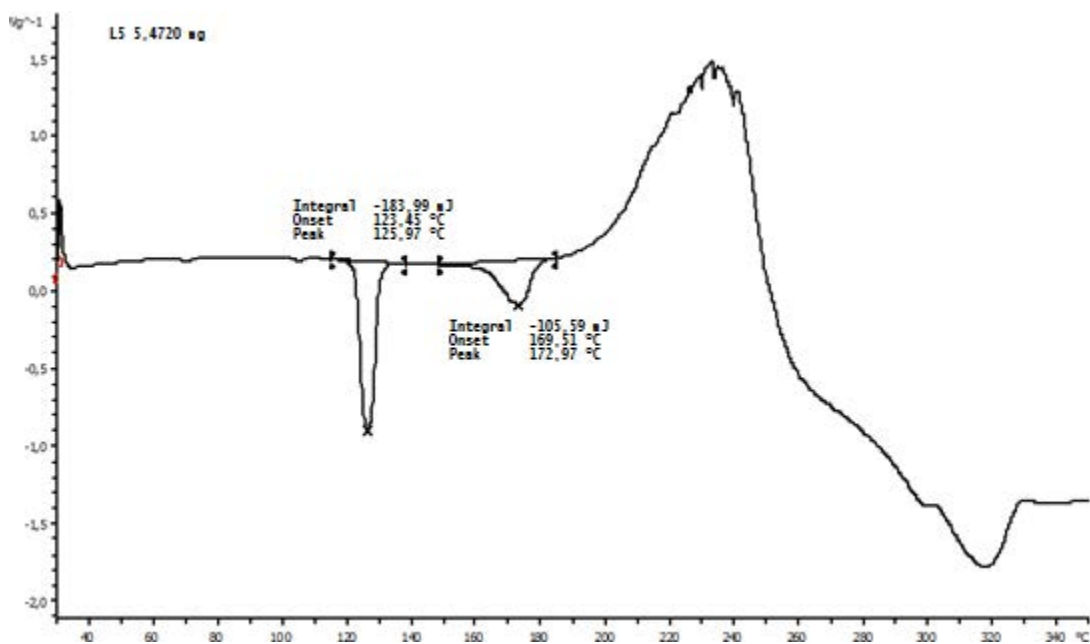


$$massa_{AZT \text{ da amostra}} = \frac{teor_{AZT} \times m_{amostra}}{100} = \frac{58,76 \times 5,327}{100} = 3,130mg$$

$$\Delta H_{esperado} = \frac{massa_{AZT \text{ da amostra}} \times \Delta H_{AZT}}{4,991} = \frac{3,130 \times 100,595}{4,991} = 63,089J/g$$

$$\Delta H_{experimental} = \frac{\Delta U_{integral}}{m_{amostra}} = \frac{228,10}{3,130} = 72,875J/g$$

**Figura 17:** Curva DSC da amostra L5 em atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL.min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento 10 °C.min<sup>-1</sup>.

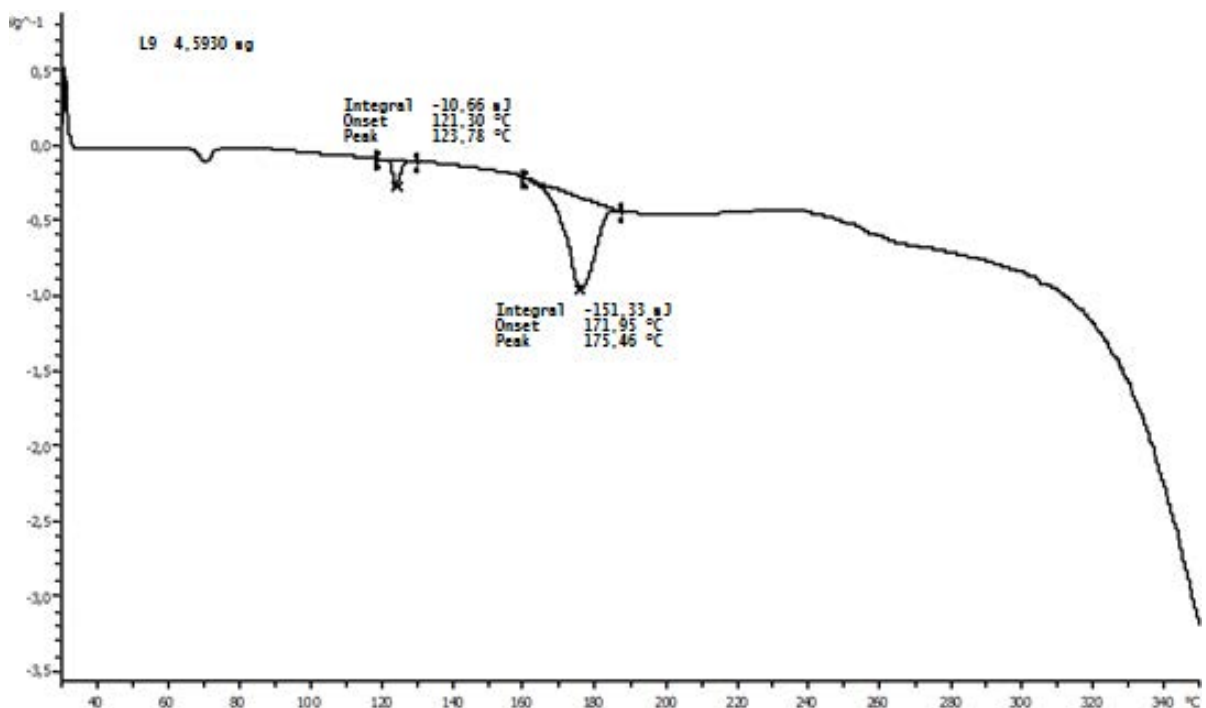


$$massa_{AZT \text{ da amostra}} = \frac{teor_{AZT} \times m_{amostra}}{100} = \frac{36,66 \times 5,472}{100} = 2,006mg$$

$$\Delta H_{esperado} = \frac{massa_{AZT \text{ da amostra}} \times \Delta H_{AZT}}{4,991} = \frac{2,006 \times 100,595}{4,991} = 40,432J/g$$

$$\Delta H_{experimental} = \frac{\Delta U_{integral}}{m_{amostra}} = \frac{183,99}{2,006} = 91,720J/g$$

**Figura 18:** Curva DSC da amostra L9 em atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (50 mL.min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento 10 °C.min<sup>-1</sup>.



$$massa_{AZT \text{ da amostra}} = \frac{teor_{AZT} \times m_{amostra}}{100} = \frac{10,21 \times 4,593}{100} = 0,469mg$$

$$\Delta H_{esperado} = \frac{massa_{AZT \text{ da amostra}} \times \Delta H_{AZT}}{4,991} = \frac{0,469 \times 100,595}{4,991} = 9,453J/g$$

$$\Delta H_{experimental} = \frac{\Delta U_{integral}}{m_{amostra}} = \frac{10,66}{0,469} = 22,729J/g$$

**Tabela 9:** Estudo dos valores de  $\Delta H$  obtidos através da análise DSC.

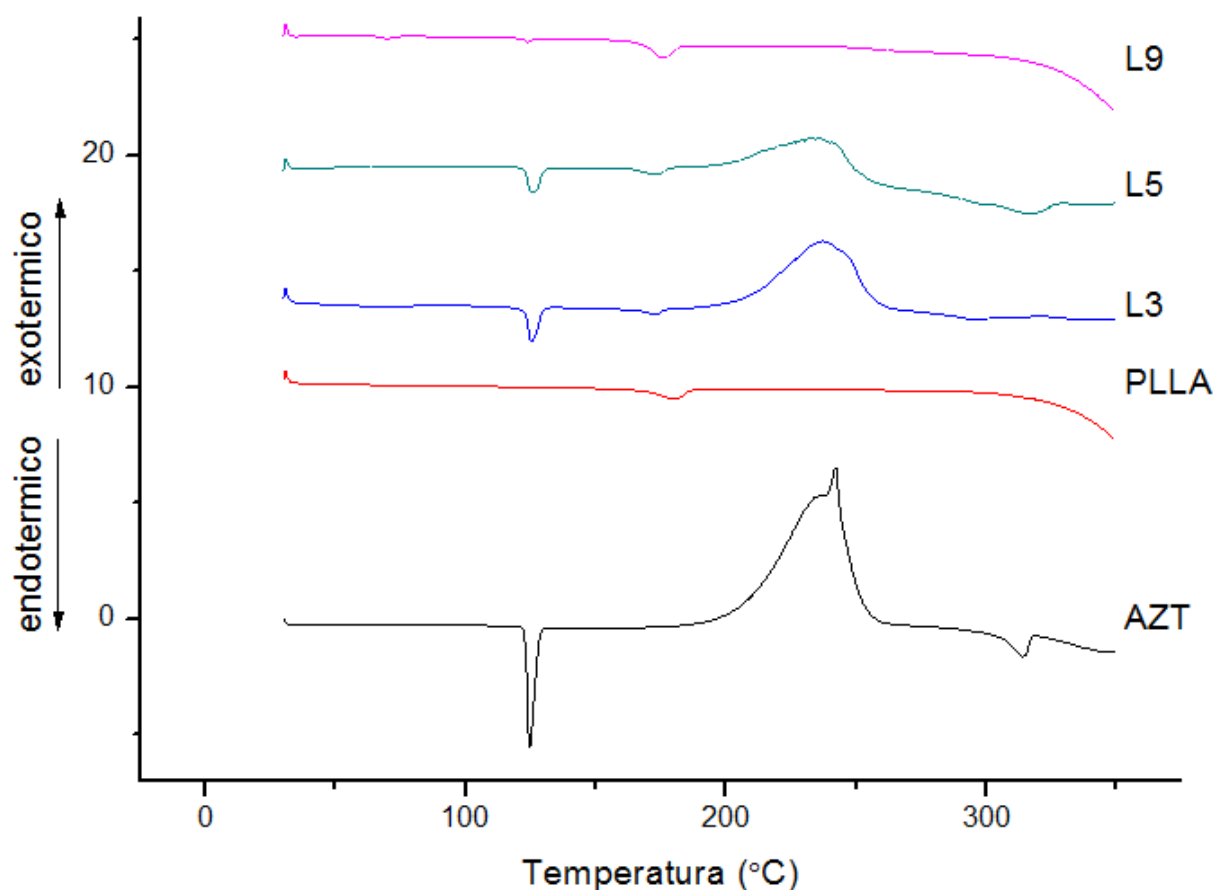
| Amostra | $\Delta H_{esperado}$ (J/g) | $\Delta H_{experimental}$ (J/g) | $\Delta H_{experimental} - \Delta H_{esperado}$ (J/g) |
|---------|-----------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------------------|
| L3      | 63,089                      | 72,875                          | 9,786                                                 |
| L5      | 40,432                      | 91,720                          | 51,288                                                |
| L9      | 9,453                       | 22,729                          | 11,276                                                |

O valor experimental de  $\Delta H$  foi maior que o valor esperado de  $\Delta H$  para todas as amostras estudadas (Tabela 9), principalmente para a amostra L5, mostrando que houve maior quantidade de energia gasta para romper as ligações intermoleculares. Através destes dados pode ser teorizado que durante o processo SAS as moléculas de AZT podem ter sido reorganizadas na precipitação, em associação com as moléculas de PLLA, de forma mais organizada exigindo maior energia para romper as ligações intermoleculares.

Se as ligações intermoleculares são mais fortes, demonstradas pelo aumento no consumo de energia relativo, estas podem ter influenciado na lenta liberação do AZT a partir das dispersões sólidas avaliadas.

Os resultados das análises DRX e DSC das amostras L3, L5 e L9 sugerem que o AZT se encontra na forma cristalina.

**Figura 19:** Curva DSC do AZT, PLLA, L3, L5 e L9 em atmosfera dinâmica de  $N_2$  ( $50\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) e razão de aquecimento  $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .



As amostras L3 e L5 foram caracterizadas termicamente através de DSC, como mostram as Figuras 16 e 17, respectivamente, as curvas DSC resultantes exibiram um evento endotérmico agudo, na faixa de 100 °C a 132 °C ( $T_{\text{onset}} = 122,85\text{ }^\circ\text{C}$  e  $T_{\text{onset}} = 123,45\text{ }^\circ\text{C}$ ,

respectivamente), caracterizando o processo de fusão do AZT, sugerindo a preservação da cristalinidade do mesmo nas amostras L3 e L5, sendo que L5 exibiu menor pico em relação a L3. A amostra L9 exibiu na curva DSC um evento endotérmico menor que os de L3 e L5 com  $T_{\text{onset}} = 121,30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , evidenciando uma menor concentração de AZT nesta amostra.

As curvas DSC das amostras L3, L5 e L9 sugerem que a proporção de AZT:PLLA na formulação (1:2 para L3, 1:1 para L5, 2:1 para L9).

Após a fusão do AZT nas amostras L3 e L5 (Figuras 16 e 17, respectivamente), podem ser observados um pico endotérmico de intensidade baixa em  $172,67\text{ }^{\circ}\text{C}$  e em  $172,97\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, que, provavelmente, devem estar relacionados ao pico endotérmico mostrado na curva do PLLA. Foi evidenciado evento exotérmico na faixa de temperatura de  $190\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $260\text{ }^{\circ}\text{C}$  para ambas as amostras, devido à decomposição do AZT nas amostras L3 e L5.

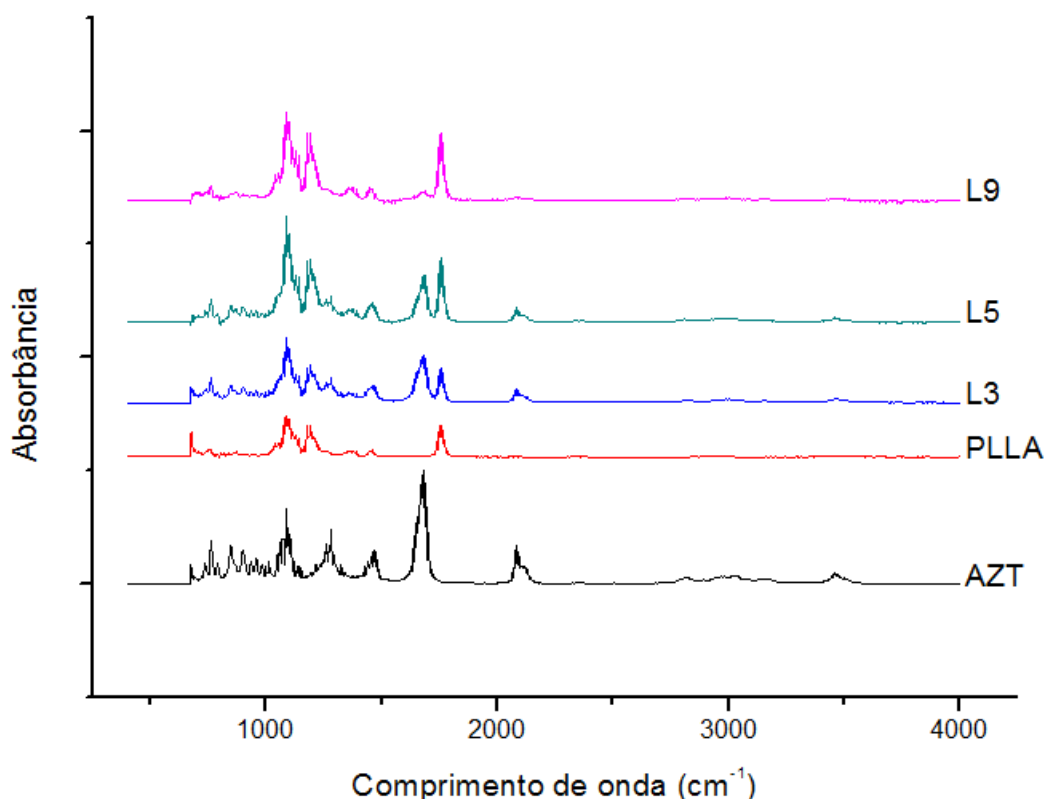
#### 6.3.4 Identificação por espectroscopia FTIR

A espectroscopia FTIR (infravermelho com transformada de Fourier) é uma técnica que permite a identificação de substâncias orgânicas ou minerais através dos grupos funcionais presentes nas moléculas, bem como a quantificação do composto analisado. Esta análise baseia-se na medida da energia absorvida pela vibração ou rotação de cada uma das ligações químicas do material analisado. As frequências vibracionais ou rotacionais são previsíveis e correlacionáveis com as ligações químicas que compõem a estrutura molecular, permitindo a análise de substância pura ou em mistura (YOSHIDA *et al.*, 2011).

Os espectros do FTIR do AZT, do PLLA e das amostras L3, L5 e L9 obtidos são mostrados na **Figura 20**.

Tanto o espectro do AZT, quanto das amostras L3, L5 e L9, mostram a banda de estiramento entre  $3200\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ , que representa o intervalo do comprimento de onda atribuído ao estiramento do O-H, uma banda em  $2083\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao  $\text{C}=\text{N}=\text{N}=\text{N}$  (grupo azido), uma banda em  $1683\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao  $\text{C}=\text{O}$ , uma banda em  $1380\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao  $\text{CH}_2$  e uma banda em  $1281\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  e ao  $\text{C}-\text{OH}$ . Os intervalos das bandas de estiramento deste estudo foram comparáveis com os obtidos por Araújo e colaboradores (2003) e Yoshida e colaboradores (2011). Estes resultados sugerem que os componentes das formulações L3, L5 e L9 resultaram em dispersões sólidas, bem como estes componentes e o processo de fabricação não afetaram a estrutura molecular do AZT.

**Figura 20:** Espectros do FTIR do AZT, PLLA, L3, L5 e L9.



### 6.3.5 Estudo, *ex vivo*, de permeação intestinal por modelo SIIR

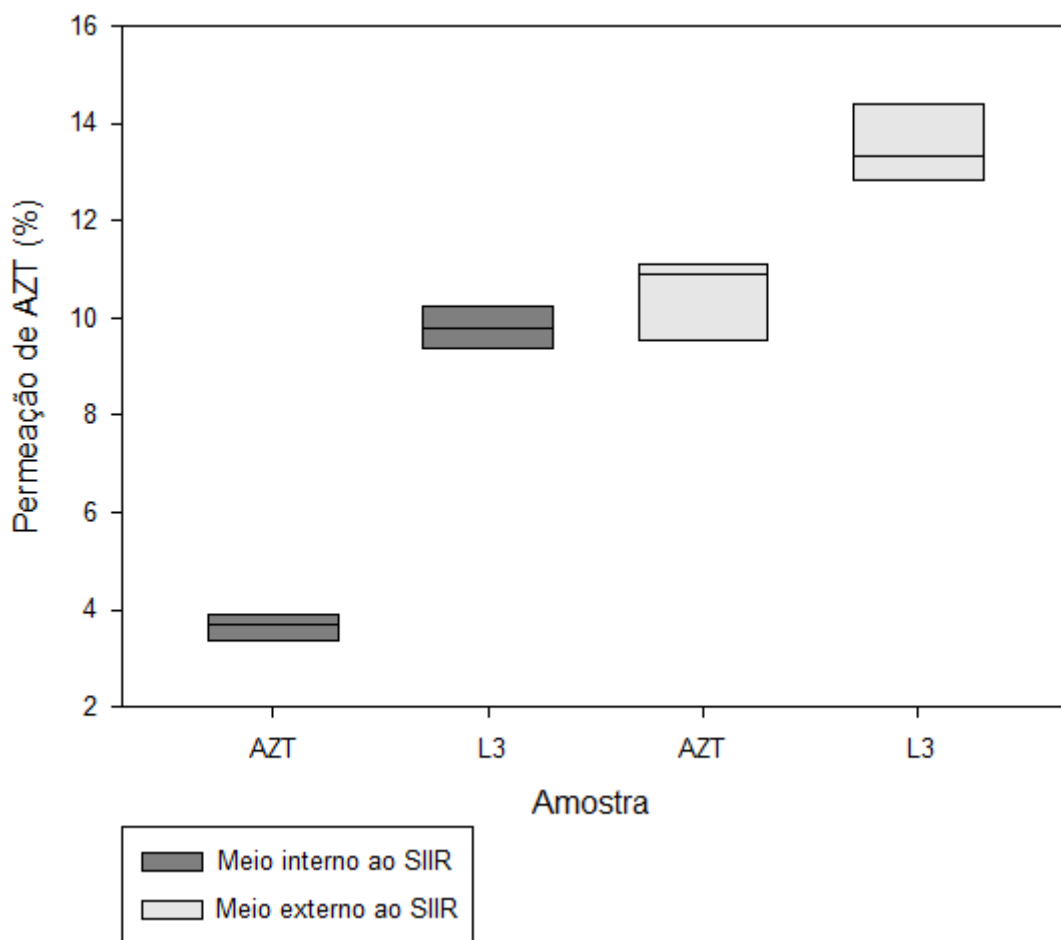
A permeação intestinal das amostras foi avaliada utilizando o modelo de saco intestinal invertido de rato (SIIR). Para minimizar o uso de animais no experimento foi selecionada a amostra L3 a partir dos dados da caracterização macroscópica (aspecto particulado uniforme) e rendimento (91,54%). O ensaio avaliou a permeação do AZT a partir da amostra AZT:PLLA (L3) e comparou estes valores com a permeação do AZT puro. A Tabela 10 apresenta as concentrações de AZT determinadas utilizando o modelo de saco intestinal invertido de ratos.

Os dados de permeação intestinal cumulativa durante 60min mostraram que a amostra L3 é diferente do AZT puro quanto à permeação intestinal (Figura 21). Este resultado é apoiado pelos resultados dos testes de liberação de AZT a partir da amostra L3, em que foi evidenciada uma liberação modificada do fármaco.

A permeabilidade do AZT a partir da amostra L3 ( $9,87 \pm 0,47$  %) foi muito maior que a do AZT puro ( $3,84 \pm 0,45$  %) no meio interno (em contato com a membrana serosa) do SIIR, sugerindo que a amostra obtida por processamento utilizando fluido supercrítico (processo SAS) favoreceu a permeação do AZT. Entretanto, a absorção do AZT depende da sua característica intrínseca de solubilidade e de permeabilidade (capacidade de difundir

através da membrana apical lipofílica dos enterócitos, baseada no aparecimento do fármaco no lado seroso e desaparecimento do lado mucoso) no meio aquoso do lúmen intestinal.

**Figura 21:** Quantificação do AZT (%) nos meios interno e externo ao SIIR (n=6).



Sabendo-se que o AZT é tido como Classe III no Sistema de Classificação Biofarmacêutico (AMIDON *et al.*, 1995), sendo, portanto, de solubilidade alta e permeabilidade baixa, é relevante otimizar a permeabilidade do AZT.

A quantidade de AZT da amostra L3 ( $13,59 \pm 0,88$  %) foi maior que a do AZT puro ( $11,01 \pm 1,19$  %) no meio externo (em contato com a membrana serosa) ao SIIR (Figura 21).

Na avaliação *in vitro* da liberação de AZT das amostras foram observados que, no período de 1 h do início do teste de dissolução, foram liberados  $67,36\% \pm 2,254$  de AZT a partir de L3. Sendo assim, a quantificação do AZT, no meio interno e no meio exterior ao SIIR, deve ser relacionada com a quantidade de AZT liberada pela amostra L3.

A permeabilidade do AZT da amostra L3 será estudada posteriormente por um período de tempo maior (10 h), no modelo SIIR, para gerar mais dados comparativos aos obtidos teste de dissolução. Isto é necessário para confirmação de que a obtenção das dispersões sólidas favorece a permeação intestinal de AZT.

## 7 CONCLUSÃO

O processo antissolvente supercrítico (SAS) foi eficiente na obtenção das dispersões sólidas de AZT com PLLA.

Através do processo SAS a formulação L3 resultou em rendimento (91,54 %) e aspecto macroscópico que justificou sua seleção para caracterização físico-química e estudo *ex vivo* de permeação de intestinal.

A amostra L3 apresentou teor de AZT (58,76 %) elevado em relação às outras formulações (L5 e L9) desta investigação. No processo SAS o AZT das dispersões sólidas permaneceu na forma cristalina sugerida pelo MEV, DRX e DSC.

Pode ser sugerido que o processamento utilizando fluido supercrítico como antissolvente favorece a permeação do AZT, pois permeabilidade do AZT a partir da amostra L3 ( $9,87 \pm 0,47$  %) foi muito maior que a do AZT puro ( $3,84 \pm 0,45$  %), porém são necessários experimentos complementares com um maior período de tempo para melhor correlação com os dados do teste de liberação de AZT a partir da amostra.

No processo SAS as propriedades químicas do AZT, bem como pelos componentes das formulações, não foram alteradas.

## REFERÊNCIAS

- CATTANI, V. B. *et al.* Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 39, p. 116-124, 2010.
- ÇENGEL, Y. A.; BOLES, M. A. **Termodinâmica**. 7. ed. Interamericana: McGraw Hill, 2013. 1048 p. ISBN: 9788580552003.
- CHAN, H.-K.; KWOK, P. C. L. Production methods for nanodrug particles using the bottom-up approach. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 63, p. 406–416, 2011.
- CHAN, K. *et al.* The effects of sinomenine on intestinal absorption of paeoniflorin by the everted rat gut sac model. **J. Ethnopharmacol.**, v. 103, n. 3, p. 425-432, 20 Feb 2006.
- CHAUD, M. V. *et al.* Solid dispersion with hydrogenated castor oil increase solubility, dissolution rate and intestinal absorption of praziquantel. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 46, p. 474-481, 2010.
- CHEN, Y. *et al.* The absorption behavior of cyclosporine A lecithin in rat intestinal tissue. **Int. J. Pharm.**, v. 261, p. 21-26, 2003.
- CHONG, G. H. *et al.* Coating and encapsulation of nanoparticles using supercritical antisolvent. **Am. J. Appl. Sci.**, v. 6, n. 7, p. 1352-1358, 2009.
- CHOWHAN, Z. T.; AMARO, A. A. Everted rat intestinal sacs as an in vitro model for assessing absorptivity of new drugs. **J. Pharm. Sci.**, v. 66, p. 1249-1253, 1977.
- CHU, C. C.; CAMPBELL, N. D. Scanning electron microscopic study of the hydrolytic degradation of poly(glycolic acid) suture. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 16, n. 4, p. 417-430, Jul. 1982.
- CHULA, S. *et al.* The effects of notoginsenoside R1 on the intestinal absorption of geniposide by the everted rat gut sac model. **J. Ethnopharmacol.**, v. 142, p. 136-143, 2012.
- CIHLAR, T.; ADRIAN, S.; RAY, A. S. Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors 25 years after AZT. **Antiviral Research**, v. 85, p. 39-58, 2010.
- CORNAIRE, G. *et al.* Impact of excipients on the absorption of P-glycoprotein substrates in vitro and in vivo. **Int. J. Pharm.**, v. 278, n. 1, p. 119-131, Jun 2004.
- CORREA, E. M. *et al.* Assessment of solubility and intestinal absorption in vitro of Praziquantel in solid dispersions of polyethylene glycol 6000. **Acta Farm. Bonaer.**, v. 30, p. 1910-1915, 2011.
- COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur. J. Pharm. Sci.** v.13, p.123–133, 2001.
- CUI, F.; YANG, M.; JIANG, Y.; CUN, D.; LIN, W.; FAN, Y.; KAWASHIMA, Y. Design of sustained-release nitrendipine microspheres having solid dispersion structure by quasi-emulsion solvent diffusion method. **J. Control. Release**, v.91, p.375–384, 2003.
- DA SILVA, C. F. *et al.* The intestinal permeation of didanosine from granules containing microspheres using the everted gut sac model. **J. Microencapsulation**, v. 26, p. 523-528, 2009.
- DAS NEVES, J. *et al.* Nanotechnology-based systems for the treatment and prevention of HIV/AIDS. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 62, p. 458-477, 2010.



- DAVIS, G. R. *et al.* Permeability characteristics of human jejunum, ileum, proximal colon and distal colon: results of potential difference measurements and unidirectional fluxes. **Gastroenterology**, v. 83, p. 844-850, 1982.
- ALAM, M. A.; AL-JENOABI, F. I.; AL-MOHIZEA, A. M. Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research: limitations and applications. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 64, n. 3, p. 326-336, 2012.
- AMIDON, G. L. *et al.* A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharm. Res.**, v. 12, p. 413-420, 1995.
- AOKI, F. Y. Infecções virais. In: PAGE, C. P., *et al.* **Farmacologia Integrada**. São Paulo: Manole, 1999. p. 445-460.
- ARAÚJO, A. A. *et al.* Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. **Int. J. Pharm.**, v. 260, n. 2, p. 303-314, Jul 2003.
- BARTHE, L. *et al.* An improved everted gut sac as a simple and accurate technique to measure paracellular transport across the small intestine. **Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.**, v. 23, p. 313-323, 1998.
- BARTHE, L.; WOODLEY, J.; HOUIN, G. Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. **Fund. Clin. Pharmacol.**, v. 13, p. 154-168, 1999.
- BENITA, S.; BARKAI, A.; PATHAK, Y. V. J. Effect of drug loading extent on the vitro release kinetic behaviour of nifedipine from polyacrylate microspheres. **J. Control. Release**, v. 12, n. 3, p. 213-222, 1990.
- BERCHE, B.; HENKEL, M.; KENNA, R. Critical phenomena: 150 years since Cagniard de la Tour. **J. Phys. Studies**, v. 13, p. 3201, 2009.
- BESLIKAS, T. *et al.* Crystallization Study and Comparative in Vitro–in Vivo Hydrolysis of PLA Reinforcement Ligamen. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 12, p. 6597-6618, 2011.
- BETUING, L. *et al.* Influence of ondansetron on topotecan intestinal absorption: an in vitro study with the everted gut sac model in rat and pig. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 23, p. 66, 2009.
- BOHETS, H. *et al.* Strategies for absorption screening in drug discovery and development. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 2001, p. 367-383, 2001.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), v. 2, 2010. 808 p.
- BUZAROVSKA, A.; GROZDANOV, A. Biodegradable poly(L-lactic acid)/TiO<sub>2</sub> nanocomposites: Thermal properties and degradation. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 123, n. 4, p. 2187-2193, Feb 2012.
- CAO, X. *et al.* Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. **Pharm. Res.**, v. 23, n. 8, p. 1675-1686, Ago 2006.
- CARRENO-GOMEZ, B.; WOODLEY, J. F.; FLORENCE, A. T. Studies on the uptake of tomato lectin nanoparticles in everted gut sacs. **Int. J. Pharm.**, v. 183, p. 7-11, 1999.
- CASTOR, T. P.; HONG, G. T. **Supercritical fluid disruption of and extraction from microbial cells**. US Patent 5,380,826, 10 Jan 1995.

- CHAN, H.-K.; KWOK, P. C. L. Production methods for nanodrug particles using the bottom-up approach. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 63, p. 406–416, 2011.
- CHRASTIL, J. Solubility of solids and liquids in supercritical gases. **J. Phys. Chem.**, v. 86, n. 15, p. 3016-3021, 1982.
- DESIMONE, J. M. Practical approaches to green solvents. **Science**, v. 297, p. 799–803, Aug 2002.
- DUKHIN, S. S. *et al.* Dynamic interfacial tension near critical point of a solvent–antisolvent mixture and laminar jet stabilization. **Physicochem. Eng. Aspects**, v. 229, p. 181-199, 2003.
- FERRARI, P. C. *et al.* In vitro drug permeation from chitosan pellets. **Carbohydr. Polym.**, v. 87, p. 2526-2531, 2012.
- FIESE, E. F. General pharmaceuticals - The new physical pharmacy. **J. Pharm. Sci.**, v. 92, p. 1331-1342, 2003.
- FPORT. **Farmacopeia Portuguesa VII.** : edição oficial. Lisboa, Portugal: Imprensa Nacional de Lisboa, 2002. 3583 p.
- GAVIN, X. M.; SCOTT, M. H. Zidovudine: Five Years Later. **Ann. Int. Med.**, v. 117, p. 487-501, 1992.
- GOVENDER, T. *et al.* Polymeric nanoparticles for enhancing antiretroviral drug therapy. **Drug Deliv.**, v. 15, n. 8, p. 493-501, Nov 2008.
- GUPTA, R. B.; CHATTOPADHYAY, P. **Method of forming nanoparticles and microparticles of controllable size using supercritical fluids with enhanced mass transfer.** US Patent 6,620,351 B2, 16 Set 2003.
- GUPTA, U.; JAIN, N. K. Non-polymeric nano-carriers in HIV/AIDS drug delivery and targeting. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 62, n. 4-5, p. 478-490, Mar 2010. Epub 2009 Nov 12.
- GUPTA, R.; PATHAK, K. Optimization studies on floating multiparticulate gastroretentive drug delivery system of famotidine. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.34, p.1201–1208, 2008.
- HANNAY, J. B.; HORGARTH, J. On the solubility of solids in gases. **Proceedings on the Royal Society of London**, v. 30, p. 178-188, 1879.
- HOWLAND, R. D.; MYCEK, M. J. **Farmacologia Ilustrada.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 560 p.
- JOSEPH, N. M.; SHARMA, P. K. Nanoparticle: Drug delivery system for cancer therapy. **Asian J. Pharm.**, v. 2, n. 3, p. 139-140, 2008.
- JUNG, J.; PERRUT, M. Particle design using supercritical fluids: literature and patent survey. **J. Supercrit. Fluids**, v. 20, p. 179-219, 2001.
- KAWASHIMA, Y. *et al.* Preparation of controlled-release microspheres of Ibuprofen with acrylic polymers by a novel quasi-emulsion solvent diffusion method. **J. Pharm. Sci.**, v. 78, p. 68-72, 1989.
- KRUKONIS, V. J. **Supercritical Fluid Nucleation of Difficult-to-Comminute Solids.** Annual Meeting AIChE. San Francisco: Annual Meeting AIChE. Nov 1984. p. 11.
- LANAO, J. M.; BRIONES, E.; COLINO, C. I. Recent advances in delivery systems for anti-HIV1 therapy. **J. Drug Target.**, v. 15, p. 21-36, 2007.

- LASSOUED, M. A.; KHEMISS, F.; SFAR, S. Comparative study of two in vitro methods for assessing drug absorption. Sartorius SM 16750 apparatus versus Everted Gut Sac. **J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 14, n. 1, p. 117-127, 2011.
- LE FERREC, E. *et al.* In vitro models of the intestinal barrier. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 46. **ATLA**, v. 29, p. 649-668, 2001.
- LEE, S. *et al.* Preparation and characterization of solid dispersion of itraconazole by using aerosol solvent extraction system for improvement in drug solubility and bioavailability. **Arch. Pharm. Res.**, v. 28, p. 866-874, 2005.
- LEPPERT, P. S.; FIX, J. A. Use of everted intestinal rings for in vitro examination of oral absorption potential. **J. Pharm. Sci.**, v. 83, p. 976-998, 1994.
- LI, M. *et al.* Excipients enhance intestinal absorption of ganciclovir by P-gp inhibition Assessed in vitro by everted gut sac and in situ by improved intestinal perfusion. **Int. J. Pharm.**, v. 403, p. 37-45, 2011.
- LONGER, M. A.; ROBINSON, J. R. Fundamental aspects of bioadhesion. **Pharm Int.**, v. 7, p. 114-117, 1986.
- MACHIDA, H.; TAKESUE, M.; SMITH JR, R. L. Green chemical processes with supercritical fluids. **J. Supercrit. Fluids**, v. 60, p. 2-15, 2011.
- MAHMOUD, M. R. Everted intestinal sacs as in vitro model for assessing absorptivity of L-histidine under the effect of aspirine and gum acacia in male rats. **Egyptian J. Hosp. Med.**, v. 16, p. 14-28, Sep 2004.
- MAINARDES, R. M. *et al.* Development of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles and evaluation of intestinal permeation by the everted gut sac model. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 6, p. 3057-3061, 2006.
- MAINARDES, R. M. *et al.* Zidovudine-loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. **J. Pharm. Sci.**, J. Pharm. Sci., v. 98, p. 257-267, 2009.
- MATSON, D. W. *et al.* Rapid expansion of supercritical fluid solutions: Solute formation of powders, thin films, and fibers. **Nnd. Eng. Chem. Res.**, v. 26, p. 2298–2306, 1987.
- MATSON, D. W.; PETERSEN, R. C.; SMITH, R. D. Production of powders and films from supercritical solutions. **J. Mater. Sci.**, v. 22, p. 1919–1928, 1987.
- MAUL, A. A. Fluidos supercríticos - Situação atual e futuro da extração supercrítica. **Biotecnologia Cienc. Desenvolv.**, v. 11, p. 42–46, 1999.
- MESPLET, N. *et al.* Simultaneous quantification of nicleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors by short-end injection capillary eletrochromatography on a  $\beta$ -cyclodextrinblonded silica stationary phase. **J. Chromatogr. A**, v. 927, p. 161-168, 2001.
- MITSUYA, H. *et al.* 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): An antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 7096-7097, 1985.
- MONTES, A. *et al.* Particles formation using supercritical fluids. In: NAKAJIMA, H. **Mass Transfer - Advanced Aspects**. CC BY 3.0 license: InTech, 2011a. Cap. 20, p. 824. ISBN 978-953-307-636-2.

- MONTES, A. *et al.* Supercritical antisolvent precipitation of ampicillin in complete miscibility conditions. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 50, p. 2343-2347, 2011b.
- MORIBE, K.; TOZUKA, Y.; YAMAMOTO, K. Supercritical carbon dioxide processing of active pharmaceutical ingredients for polymorphic control and for complex formation. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 60, p. 328-338, 2008.
- NAISBETT, B.; WOODLEY, J. F. The potential of tomato lectin in oral drug delivery system: 1- Mechanism of uptake in vitro. **Int. J. Pharm.**, v. 107, p. 223-230, 1994a.
- NAISBETT, B.; WOODLEY, J. F. The potential of tomato lectin in oral drug delivery system: 2- Mechanism of uptake in vitro. **Int. J. Pharm.**, v. 110, p. 127-136, 1994b.
- OJEWOLE, E. *et al.* Exploring the use of novel drug delivery systems for antiretroviral drugs. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 70, p. 697-710, 2008.
- PATEL, M.; MISHRA, S. A kinetic study for in-vitro intestinal uptake of monosaccharide across rat everted gut sacs In the presence of some antidiabetic medicinal plants. **Internet J. Alter. Med.**, v. 7, n. 1, 2009.
- PATEL, R. R.; PATEL, J. K.; RAJPUT, G. C. Novel coating techniques for pharmaceutical dosage form. **J. Pharmacy Research**, v. 2, n. 4, p. 756-761, 2009.
- PATÓ, J. *et al.* Uptake and transport of poly(N-vinylpyrrolidone-co-maleic acid) by the adult rat small intestine cultured in vitro: effect of chemical structure. **Int. J. Pharm.**, v. 104, p. 227-237, 1994.
- PEPPAS, N. A. Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. **Pharm. Acta Helv.**, v. 60, p. 110-111, 1985.
- PERRONE, M. G. *et al.* Comparative evaluation of two dye probes in the rat everted gut sac model for unambiguous classification of P-gp substrate and inhibitor. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, 2012. ISSN <http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2012.11.004>.
- PERRUT, M. Supercritical fluid applications: industrial developments and economic issue. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 39, p. 4531-4535, 2000.
- PETERSEN, R. C.; MATSON, D. W.; SMITH, R. D. Rapid precipitation of low vapor pressure solids from supercritical fluid solutions: the formation of thin films and powders. **J. Am. Chem. Soc.**, 108, 1986. 2100-2102.
- PIEMONTE, V.; GIRONI, F. Lactic acid production by hydrolysis of poly(lactic acid) in aqueous solutions: An experimental and kinetic study. **J. Polym. Environ.**, v. 21, n. 1, p. 275-279, 2013.
- RACHLIS, A. R. Zidovudine (Retrovir) update. **Can Med Assoc J**, v. 143, p. 1177-1185, 1990.
- RANG, H. P. *et al.* **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 904 p.
- RAVIOLO, M. A.; BRIÑÓN, M. C. Preformulation studies of zidovudine derivatives: Acid dissociation constants, differential scanning calorimetry, thermogravimetry, X-ray powder diffractometry and aqueous stability studies. **Sci. Pharm.**, v. 79, n. 3, p. 479-491, Sep 2011.
- RODRIGUES, P. O.; CARDOSO, T. F. M.; SILVA, M. A. S.; MATOS, J. R. Aplicação de técnicas termoanalíticas na caracterização, determinação da pureza e cinética de degradação da zidovudina (AZT). **Acta Farm. Bonaerense**, v.24, n.3, p.383-387, 2005.
- ROUANET, S. F. *et al.* **Methods for forming particles using a supercritical fluid**. US Patent 5,864,923, 2 Feb 1999.

- ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; WELLER, P. J. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6. ed. London/Washington: Pharmaceutical Press and American Pharmaceutical Association, v. 1, 2009. 2215 p.
- ROWLAND, R. N.; WOODLEY, J. F. The uptake of distearyphosphatidylcholine/cholesterol liposomes by rat intestinal sac in vitro. **Biochem. Bioph. Acta**, v. 673, p. 217-223, Mar 1981a.
- ROWLAND, R. N.; WOODLEY, J. F. Uptake of free and liposome-entrapped insulin by rat intestinal sacs in vitro. **Biosci. Rep.**, v. 1, n. 4, p. 345-352, Abr 1981b.
- ROWLAND, R. N.; WOODLEY, J. F. Uptake of free and liposome-entrapped 125I-labelled PVP by rat intestinal sacs in vitro: evidence for endocytosis. **Biosci. Rep.**, v. 1, n. 5, p. 399-406, May 1981c.
- SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; MALMONGE, S. M. A. S. E. B. Polímeros usados como sistemas de transporte de princípios ativos. **Polímeros**, v. 21, n. 5, p. 361-368, Epub Nov. 2011. ISSN 0104-1428.
- SHAH, A. K.; AGNIHOTRI, S. A. Recent advances and novel strategies in pre-clinical formulation development: an overview. **J. Control. Release**, v. 156, n. 3, p. 281-296, Dez 2011.
- SHAH, S. H.; PATEL, J. K.; PATEL, N. V. Stomach specific floating drug delivery system: a review. **Int. J. PharmTech Res.**, v. 1, n. 3, p. 623-633, 2009.
- SHEKUNOV, B. Y.; CHATTOPADHYAY, P.; SEITZINGER, J. S. **Methods and apparatus for producing composite particles using supercritical fluid as plasticizing and extracting agent**. US Patent 7,449,136 B2, 11 Nov 2008.
- SMITH, R. D.; WASH, R. **Supercritical fluid molecular spray film deposition and powder formation**. US Patent 4,582,731, 15 Abr 1986.
- SMITH, R. D.; WASH, R. **Supercritical fluid molecular spray thin films and fine powders**. US Patent 4,734,451, 29 Mar 1988.
- SOUZA, J. D.; STORPIRTIS, S. Atividade anti-retroviral e propriedades farmacocinéticas da associação entre lamivudina e zidovudina. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 40, n. 1, p. 9-19, Jan/Mar 2004.
- SUBRAMANIAM, B. et al. **Methods for a particle precipitation and coating using near-critical and supercritical antisolvents**. US Patent 5,833,891, 10 Nov 1998.
- SUBRAMANIAM, B. et al. **Methods for particle micronization and nanonization by recrystallization from organic**. US Patent 5,874,029, 23 Fev 1999.
- UNAIDS. **Report on the Global AIDS Epidemic**. United Nations. Geneva, Switzerland. 2008.
- UNAIDS. **Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2010**. United Nations. Geneva, Switzerland, p. 364. 2010. (ISBN 978-92-9173-871-7).
- USP 31. **The United States Pharmacopeia Convention 12601**. 31. ed. Twinbrook Parkway: Rockville, v. 2, 2008. 2498-2499 p.
- VATS, R. *et al.* Drug-drug interaction study to assess the effects of atorvastatin co-administration on pharmacokinetics and anti-thrombotic properties of cilostazol in male Wistar rats. **Biopharm. Drug Dispos.**, v. 33, n. 8, p. 455-465, Nov 2012.

VEAL, G. J.; BACK, J. D. Metabolism of zidovudine. **Gen. Pharmacol.**, v. 26, n. 7, p. 1469-1475, 1995.

VON BRIESEN, H.; RAMGE, P.; KREUTER, J. Controlled release of antiretroviral drugs. **AIDS Rev.**, v. 2, p. 31-38, 2000.

WANG, Y.; PFEFFER, R.; DAVE, R. **Polymer coating encapsulation of nanoparticles using a supercritical anti-solvent process**. US Patent 7,537,803 B2, 26 Mai 2009.

WILSON, T. H.; WISEMAN, G. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. **J Physiol.**, v. 123, n. 1, p. 116-125, 28 Jan 1954.

WORTHY, W. Supercritical fluids offer improved separations. **Chemical and Engineering News**, v. 59, n. 31, p. 16-17, 1981.

YANGA, J.-M. *et al.* PLC-MS analysis of Schisandra lignans and their metabolites in Caco-2 cell monolayer and rat everted gut sac models and in rat plasma. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 1, n. 1, p. 46-55, 2011.

YASUJI, T.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Particle design of poorly water-soluble drug substances using supercritical fluid technologies. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 60, p. 388-398, 2008.

YOSHIDA, V. M. H. *et al.* Development and evaluation of a floating multiparticulate gastroretentive system for modified release of AZT. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 2, p. 658-664, 2011.

ZANCHETTA, B. *et al.* Estabilidade e absorção intestinal de medicamentos contendo isoniazida preparados extemporaneamente em farmácias institucionais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, p. 319-321, 2008.

ZHANG, S.; ULUDAĞ, H. Nanoparticulate systems for growth factor delivery. **Pharm. Res.**, v. 26, n. 7, p. 1561-1580, 2009.

ZHOU, Y. *et al.* Enhancement of intestinal absorption of akebia saponin D by borneol and probenecid in situ and in vitro. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 29, n. 3, p. 229-234, Mai 2010.

## APÊNDICE A – Artigo de revisão preparado para submissão em revista

### Tecnologia de Fluido Supercrítico e Suas Aplicações Farmacêuticas: Uma Revisão

Valquíria Miwa Hanai Yoshida<sup>1,2</sup>, Marco Vinícius Chaud<sup>1</sup>, Maria Palmira Daflon Gremião<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Biomaterial and nanotechnology laboratory of Sorocaba University, Sorocaba University - UNISO, Sorocaba, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Pharmaceutical Sciences School of São Paulo State University - UNESP, Araraquara, SP, Brazil.

#### Resumo

A tecnologia de fluido supercrítico tem sido alvo de muitas investigações farmacêuticas na produção de partículas há quase 35 anos. Isto se deve as grandes vantagens que ela oferece em relação a outras tecnologias atualmente utilizadas para o mesmo fim. Um breve histórico é apresentado, assim como uma classificação da tecnologia de fluido supercrítico baseada no papel que o fluido supercrítico (dióxido de carbono) desempenha no processo e a utilização desta tecnologia na obtenção de partículas para a área farmacêutica.

**Palavras-chave:** Fluido supercrítico, Tecnologia de fluido supercrítico, Partículas farmacêuticas, Gás carbônico supercrítico.

#### Abstract

The supercritical fluid technology has been target of many pharmaceuticals investigations in particles production for almost 35 years. This is due to the great advantages it offers over others technologies currently used for the same purpose. A brief history is presented, as well as the classification of supercritical technology based on the role that the supercritical fluid (carbon dioxide) works in the process, and the use of this technology in particles production for pharmaceutical field.

**Keywords:** Supercritical fluid, Supercritical fluid technology, Pharmaceutical Technology, Supercritical Carbon Dioxide.

## 1 Introdução

Em 1822 o cientista francês Cagnard de la Tour descobriu os fenômenos críticos (BERCHE, HENKEL e KENNA, 2009) (a fase termodinâmica nas condições críticas de temperatura e

pressão apresenta uma fenomenologia bem característica que a torna única e diferente das fases sólida, líquida e gasosa) pela observação da mineralização natural.

A descoberta dos fenômenos críticos é à base da tecnologia de fluido supercrítico (FSC). Embora o FSC seja conhecido desde o final do século XIX, o conceito básico de expansão rápida de soluções supercríticas (RESS) foi descrito pela primeira vez por Hannay e Hogarth (2), em um estudo da solubilidade de cloretos metálicos em etanol supercrítico para compreender a mineralização natural, observada por Caignard de la Tour (1), neste estudo os autores relataram o grande poder de solvatação dos FSC. Porém, foi Worthy (3) que direcionou o estudo dos FSC para otimizar a micromerítica de materiais orgânicos difíceis de cominuir.

Por mais de cem anos a ampla variedade de técnicas, a limitação dos equipamentos e as condições específicas para alcançar o estado supercrítico dificultaram o avanço mais acelerado das pesquisas científicas nesta área (4).

O conceito de tecnologia de FSC segundo Jung e Perrut (5), foi melhor compreendido e desenvolvido após os trabalhos pioneiros de Krukoniš (6) e, especialmente, pela divulgação das pesquisas do Instituto Battelle (7,8,9,10,11) que descreveram e modelaram padrão de fluxo e processo de nucleação em condições supercríticas. Desde então, muitos métodos utilizando esta tecnologia têm sido publicados e patenteados (7,11,12,13,14,15,16,17,18) para purificação, extração e obtenção de partículas, entre outros.

Um solvente supercrítico é aquele que a certa temperatura e pressão não se condensa nem evapora, ou seja, existe como um fluido (19). Isto acontece quando uma substância é elevada acima de seus pontos críticos de temperatura e pressão, e passa para uma condição chamada de “o estado fluido supercrítico”. Nestas condições, as densidades do líquido e do vapor são idênticas, e por esta razão o menisco, na interface entre as duas fases, desaparece (20,21). A Tabela 1 mostra as condições críticas para alguns solventes.

Nas condições de FSC as substâncias exibem propriedades físicas que são intermediárias entre os gases e os líquidos das mesmas. Assim, a densidade de um FSC pode ser alterada pela variação da pressão aplicada sobre o fluido. Quando o fluido é comprimido a altas temperaturas pode ter uma densidade que oscila entre aquelas exibidas pelos gases até valores típicos dos líquidos. Do mesmo modo, um FSC mantido a uma densidade relativamente alta tem capacidade de dissolver uma variedade de materiais, exatamente como fazem os líquidos convencionais, mas com o poder de penetração dos gases (22,23).

Entre as vantagens da tecnologia de FSC está o uso de intermediários ambientalmente mais aceitáveis, como dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e água. O  $\text{CO}_2$  é o FSC mais utilizado em



aplicações farmacêuticas, não apenas pelo custo, mas também pelas condições supercríticas mais brandas, o que, por sua vez, possibilita o processamento de fármacos e outras matérias-primas termolábeis (4).

Tabela 1: Condições críticas de alguns fluidos supercríticos.

| Fluido supercrítico  | Fórmula química                 | $T_c$ (K)           | $P_c$ (MPa)         | $\rho_c$ (g.mL <sup>-1</sup> ) |
|----------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------------|
| Nitrogênio           | N <sub>2</sub>                  | 126,20 <sup>a</sup> | 3,398 <sup>b</sup>  | 0,312 <sup>i</sup>             |
| Metano               | CH <sub>4</sub>                 | 190,60 <sup>c</sup> | 4,610 <sup>c</sup>  | 0,162 <sup>f</sup>             |
| Eteno (etileno)      | C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>   | 282,50 <sup>c</sup> | 5,060 <sup>c</sup>  | 0,215 <sup>f</sup>             |
| Xenônio              | Xe                              | 289,74 <sup>c</sup> | 5,840 <sup>c</sup>  | 1,100 <sup>d</sup>             |
| Trifluorometano      | CHF <sub>3</sub>                | 299,10 <sup>e</sup> | 4,828 <sup>e</sup>  | 0,525 <sup>c</sup>             |
| Clorotrifluorometano | CClF <sub>3</sub>               | 301,84 <sup>c</sup> | 3,885 <sup>c</sup>  | -                              |
| Dióxido de carbono   | CO <sub>2</sub>                 | 304,12 <sup>f</sup> | 7,374 <sup>g</sup>  | 0,469 <sup>d</sup>             |
| Etano                | C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>   | 305,30 <sup>c</sup> | 4,900 <sup>c</sup>  | 0,203 <sup>f</sup>             |
| Óxido nitroso        | N <sub>2</sub> O                | 309,56 <sup>e</sup> | 7,238 <sup>e</sup>  | 0,450 <sup>d</sup>             |
| Fluorometano         | CH <sub>3</sub> F               | 317,40 <sup>h</sup> | 5,870 <sup>h</sup>  | -                              |
| Propileno            | C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>   | 365,20 <sup>c</sup> | 4,610 <sup>c</sup>  | 0,232 <sup>f</sup>             |
| Propano              | C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>   | 369,90 <sup>c</sup> | 4,260 <sup>c</sup>  | 0,217 <sup>f</sup>             |
| Hidróxido de amônio  | NH <sub>4</sub> OH              | 405,40 <sup>i</sup> | 11,350 <sup>i</sup> | -                              |
| <i>n</i> -Pentano    | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub>  | 469,80 <sup>c</sup> | 3,360 <sup>c</sup>  | 0,230 <sup>d</sup>             |
| <i>n</i> -Hexano     | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>  | 507,60 <sup>c</sup> | 3,200 <sup>c</sup>  | 0,232 <sup>f</sup>             |
| Acetona              | C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O | 508,10 <sup>f</sup> | 4,640 <sup>f</sup>  | 0,278 <sup>f</sup>             |
| Isopropanol          | C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O | 508,30 <sup>j</sup> | 4,790 <sup>j</sup>  | 0,270 <sup>d</sup>             |
| Metanol              | CH <sub>4</sub> O               | 513,00 <sup>c</sup> | 8,100 <sup>c</sup>  | 0,270 <sup>d</sup>             |
| Etanol               | C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O | 514,00 <sup>c</sup> | 6,300 <sup>c</sup>  | 0,276 <sup>f</sup>             |
| Ciclohexano          | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>  | 553,54 <sup>l</sup> | 4,070 <sup>c</sup>  | 0,273 <sup>c</sup>             |
| Benzeno              | C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>   | 562,16 <sup>l</sup> | 4,890 <sup>c</sup>  | 0,301 <sup>l</sup>             |
| Tolueno              | C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>   | 591,79 <sup>l</sup> | 4,100 <sup>c</sup>  | 0,300 <sup>l</sup>             |
| Água                 | H <sub>2</sub> O                | 647,55 <sup>k</sup> | 22,680 <sup>k</sup> | 0,322 <sup>f</sup>             |

Os fluidos supercríticos, com suas respectivas fórmulas químicas, foram ordenados pela temperatura crítica ( $T_c$ ) em ordem crescente e respectivas pressão crítica ( $P_c$ ) e densidade crítica ( $\rho_c$ ). Referências: <sup>a</sup> Weber (24); <sup>b</sup> Jacobsen, Stewart e Jahangiri (25); <sup>c</sup> NIST (26); <sup>d</sup> Carrilho, Tavares e Lanças (27); <sup>e</sup> Ohfaki, Umezono e Katayama (28); <sup>f</sup> Reid, Prausnitz e Poling (29); <sup>g</sup> Yasuji, Takeuchi e Kawashima (19); <sup>h</sup> Bominaar *et al.* (30); <sup>i</sup> Brunner (31); <sup>j</sup> Green e Perry (32); <sup>k</sup> Da Silva, De Lacerda e Jones Junior (33); <sup>l</sup> Yaws (34).

O CO<sub>2</sub> supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>) é obtido na temperatura crítica ( $T_c$ ) de 304,12 K e pressão crítica ( $P_c$ ) de 7,37 Mpa (19, 26, 27, 29), mas há outras substâncias (Tabela 1) que também têm propriedades solventes interessantes no seu estado supercrítico. Entretanto, por razões de

custo, toxicidade, inflamabilidade, perigo de explosão e propriedades físicas adversas (condições de  $T_c$  e  $P_c$  muito elevadas), são pouco usadas comercialmente (22).

Atualmente, a tecnologia de FSC é uma alternativa para aplicação em tecnologia na liberação de fármacos, além de atender aos princípios da química verde, cuja definição mais aceita é “a concepção, desenvolvimento e implementação de processos e produtos químicos para reduzir ou eliminar substâncias perigosas para a saúde humana e o ambiente” (35, 36).

## 2 Processos em tecnologia de FSC

A tecnologia FSC pode ser classificada em três grandes categorias de acordo com sua utilização no processo. O FSC pode ser empregado (i) como solvente, (ii) como antissolvente e (iii) processos que não dependem do poder solvente do  $\text{CO}_2$ .

### 2.1 FSC usado como solvente

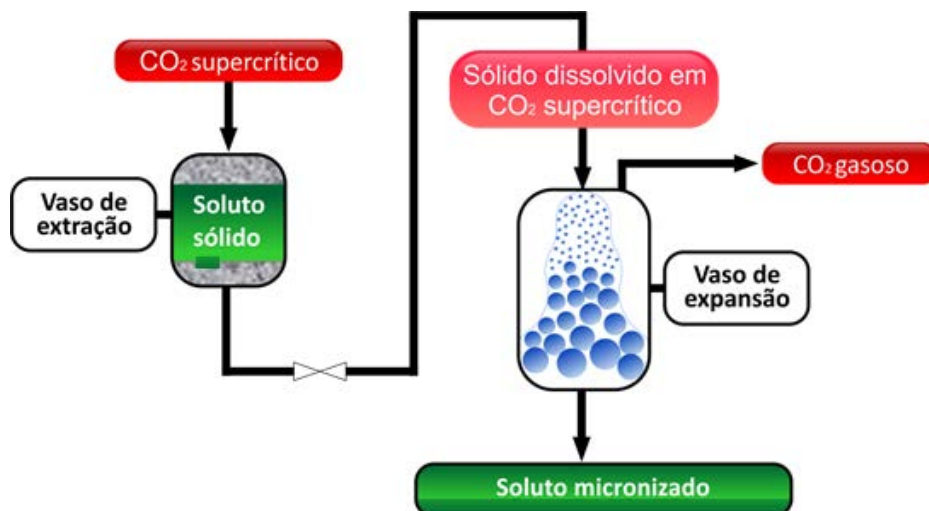
Os processos que usam o FSC como solvente de insumos para gerar partículas sólidas são representados pelas siglas RESS, RESOLV, RESAS, RESS-SC e SII.

#### 2.1.1 Rapid Expansion of Supercritical Solutions (RESS)

O processo RESS vem sendo extensivamente investigado (37,38,39,40,41,42,43,44) e envolve duas etapas, solubilização seguido da formação de partículas.

A obtenção de material particulado ocorre pela dissolução do material no FSC para formar uma solução, e posteriormente esta mistura é expandida e rapidamente despressurizada, causando nucleação rápida e geração de partículas de tamanho submicrométricas ( $\leq 100$  nm) (45,46,47,48,40), como ilustrado pela Figura 1.

Figura 1: Diagrama esquemático do processo RESS.



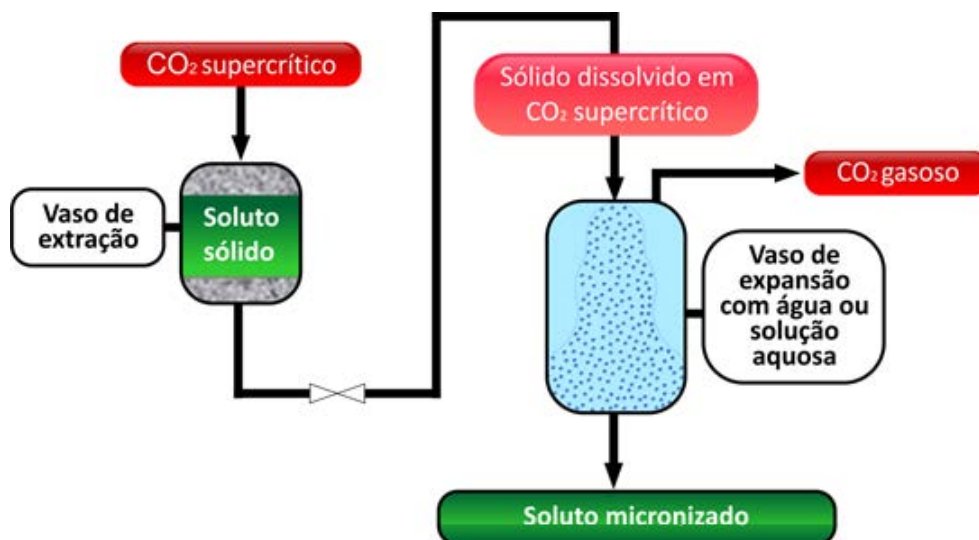
A vantagem do processo RESS é apresentar aplicações valiosas em escala comercial quando a solubilidade do material ou produto no FSC (de preferência  $\text{CO}_2$ ) não é muito pequena ( $\geq 10^{-3}$  kg/kg ou fração molar  $> 10^{-4}$ ). A aplicação do processo RESS é limitada para os compostos apolares ou de baixa polaridade (49,50).

Porem, os insumos mais frequentemente utilizados para o desenvolvimento dos sistemas particulados não são suficientemente solúveis em  $\text{SC-CO}_2$  para tornar o processo de produção eficiente. Assim, muitas vezes é necessário modificar o processo RESS adicionando um cossolvente orgânico (51,46) ou um cossolvente sólido (52,53).

### 2.1.2 Rapid Expansion of a Supercritical Solution into a Liquid Solvent (RESOLV)

Sun e colaboradores (54,55,56,57,58,59) fizeram uma modificação simples, mas significativa no processo RESS, usando um líquido na extremidade de recepção da expansão rápida (RESOLV) (Figura 2). A modificação no sistema RESS foi desenvolvida para a produção de partículas em nanoescala. Tem sido demonstrado que o RESOLV pode ser empregado para a nanonização de fármacos insolúveis em água (60,61,59).

Figura 2: Diagrama esquemático do processo RESOLV.



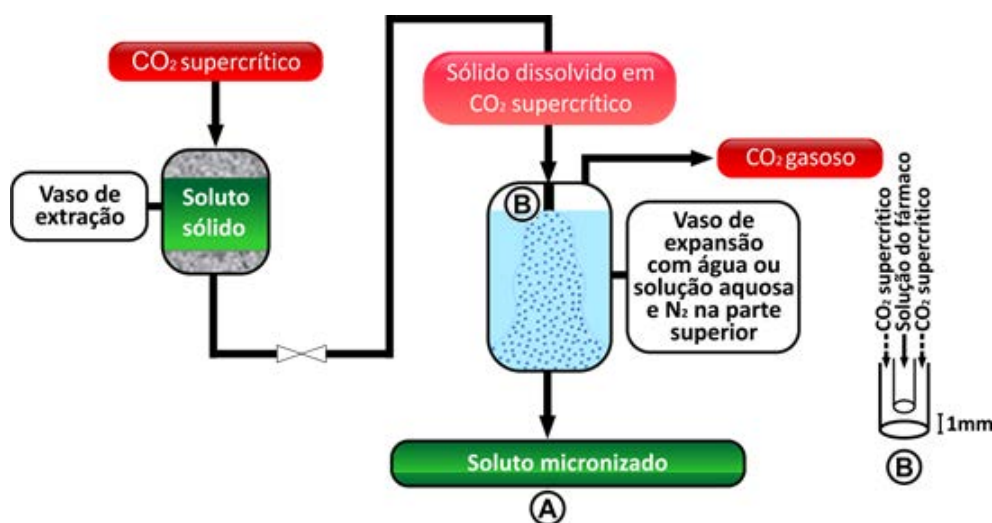
### 2.1.3 Rapid Expansion from Supercritical to Aqueous Solution (RESAS)

O sistema RESAS foi proposto por Young e colaboradores (62,63) (Figura 3) para superar o problema de crescimento das partículas que ocorre no processo RESS. Pelos de cálculos teóricos, o processo RESS poderia formar partículas na escala de 20-50 nm. A incapacidade do processo RESS de se aproximar do limite teórico inferior está, provavelmente, relacionada ao crescimento das partículas durante as colisões livres no jato de expansão (64). Estas

colisões foram minimizadas no RESAS pela utilização de bico co-axial (item B da Figura 3), que modificou a forma de contato da solução do fármaco com o SC-CO<sub>2</sub>.

Para proporcionar a estabilização contra o crescimento de partícula resultante de colisões no jato de expansão Young e colaboradores (63) utilizaram solução aquosa contendo fosfolípidios, misturados com surfactante não-iônico para obter partículas submicrométricas com razão elevada de carregamento de fármaco.

Figura 3: (A) Diagrama esquemático do processo RESAS e (B) forma do bico.



#### 2.1.4 Rapid Expansion of Supercritical Solution with Solid Cosolvents (RESS-SC)

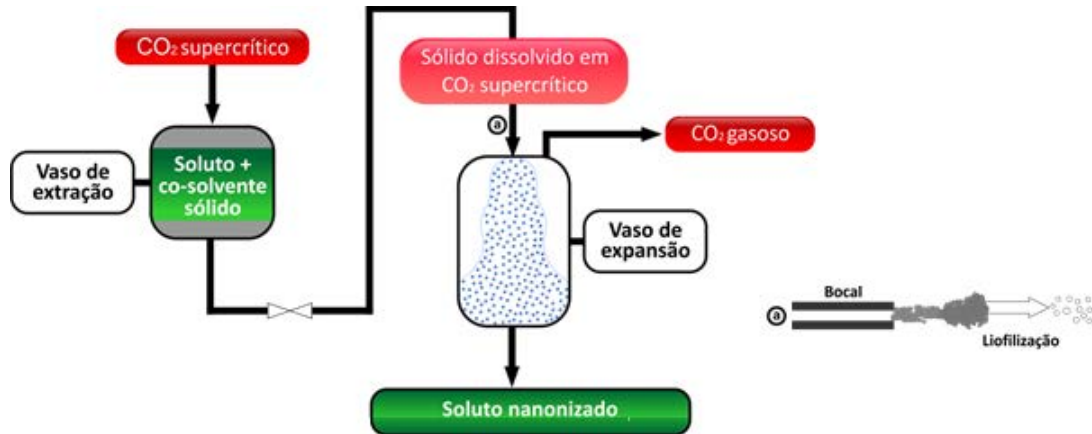
No processo RESS-SC (Figura 4) a escolha do cossolvente sólido é muito importante, pois este precisa favorecer a solubilidade do soluto em CO<sub>2</sub>. O cossolvente sólido deve ter as seguintes propriedades (52,53): (i) pressão de vapor suficientemente elevada para a remoção fácil por sublimação; (ii) sólido nas condições de saída de bicos (tipicamente -5 a 25 °C); (iii) solubilidade apreciável em SC-CO<sub>2</sub>; (iv) não-reativo com soluto desejado ou SC-CO<sub>2</sub>; (v) não-inflamável e não tóxico; (vi) barato.

O mentol é um composto que preenche todos os requisitos de cossolvente sólido. O seu ponto de fusão é de 34-36 °C, com pressão de vapor elevada, boa solubilidade em SC-CO<sub>2</sub> e é amplamente utilizado em indústrias farmacêuticas e alimentícias (53).

O processo RESS-SC é dividido em três partes, pré-extração, extração e expansão. Na pré-extração o CO<sub>2</sub> é pressurizado até a pressão desejada. Na extração dois vasos cilíndricos são utilizados como coluna de extração, um para o cossolvente sólido e outro para o fármaco. Ambos os vasos são mantidos à temperatura constante e a pressão da seção de extração é monitorada. Na expansão a temperatura é controlada para ser menor que 5° C. Um filtro de lã

de vidro é utilizado na extremidade da saída da câmara de expansão para reter as partículas produzidas no processo (52).

Figura 4: Diagrama esquemático do processo RESS-SC.

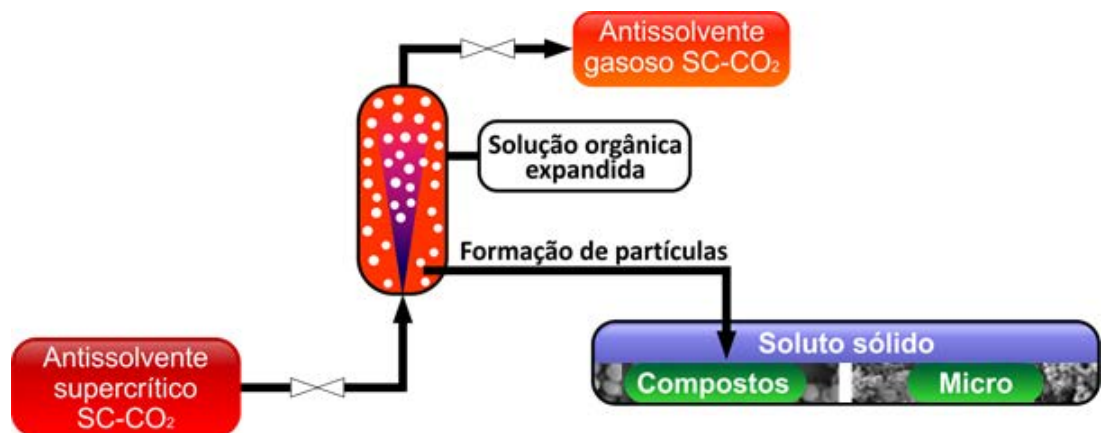


Fonte do esquema no bocal (a): Thakur e Gupta (2006b).

### 2.1.5 Supercritical Solvent Impregnation (SSI)

No processo SSI (Figura 5) o ativo farmacêutico é transportado por um FSC e adsorvido em um carreador poroso. Os polímeros podem ser impregnados através da dissolução do fármaco em FSC e, na sequência, ocorre o contato resultante da mistura do fluido com as partículas de polímeros. O interesse na impregnação de material polimérico por FSC decorre da oportunidade para utilizar difusividade alta, tensão superficial baixa e facilidade na recuperação do solvente para preparação de novos materiais poliméricos (65).

Figura 5: Diagrama esquemático do processo SSI.



## 2.2 FSC usado como antissolvente

A aplicação do FSC como antissolvente é uma alternativa à técnica de recristalização para processar sólidos insolúveis no FSC. Este método explora a capacidade dos gases dissolverem-se em líquidos orgânicos, diminuindo o “poder solvente” do solvente para os componentes em solução, o que causa a precipitação dos sólidos dissolvidos (66,5,50).

Os processos que usam gás antissolvente (SAS; GAS; ASES; SAS-DEM; SAS-EM; SEDS; AS AIS; PCA; SFEE) diferem na forma como é obtido o contato entre a solução e o antissolvente (66,5,67).

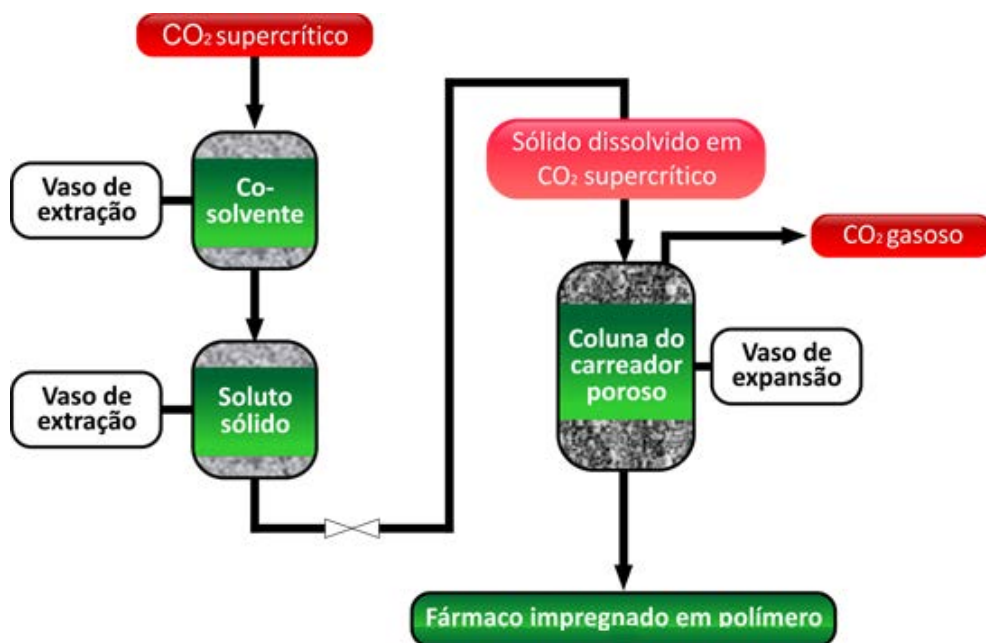
### 2.2.1 Supercritical AntiSolvent (SAS)

O processo denominado SAS está baseado na diminuição da potência solvente de um solvente orgânico polar, no qual o ativo farmacêutico e/ou polímero é dissolvido. Na sequência, esta solução saturada com o FSC provoca a precipitação e recristalização do substrato de interesse. Desta forma, o FSC é utilizado para extrair o solvente desta solução (68,48,5,50) (Figura 6).

O processo SAS é facilmente escalonado e tem sido largamente estudado devido ao seu potencial de produção de partículas micro e nanométricas, com controle do tamanho e da morfologia de partículas (69,70,50).

O processo é normalmente realizado a temperaturas que variam entre 308,15K e 333,15K, sendo útil quando compostos termolábeis precisam ser micronizados (71).

Figura 6: Diagrama esquemático do processo SAS.



O processo SAS, com pequenas alterações, é também conhecido como o sistema de extração de aerossol solvente (ASES) ou precipitação com um antissolvente comprimido (PCA). Nestas técnicas, um FSC atua como antissolvente para soluções de polímero, tal como no processo GAS, mas o mecanismo de contato é diferente do que daquele utilizado no processo GAS. O polímero é dissolvido num solvente líquido e a solução é pulverizada para uma câmara, em que FSC (antissolvente) já existe, causando o rápido contato entre os dois meios. Isto gera maior razão de supersaturação da solução, resultando em nucleação e crescimento rápido e, conseqüentemente, originando partículas menores. Uma vantagem especial desta técnica é a sua adaptabilidade para operações contínuas, o que é importante para produção em larga escala (72).

### **2.2.2 Gas Anti-Solvent (GAS)**

O processo de recristalização GAS ou GASR (*Gas Anti-Solvent Recrystallization*) foi patenteado por Krukonis, Gallacher e Coffey (73) e apresentado como um método para a recristalização de materiais sólidos a partir de sistemas compostos por um soluto, um solvente líquido adequado e um componente gasoso solúvel no solvente, cuja presença faz com que o solvente se aproxime ou atinja um estado sobressaturado, precipitando (recristalizando) o soluto.

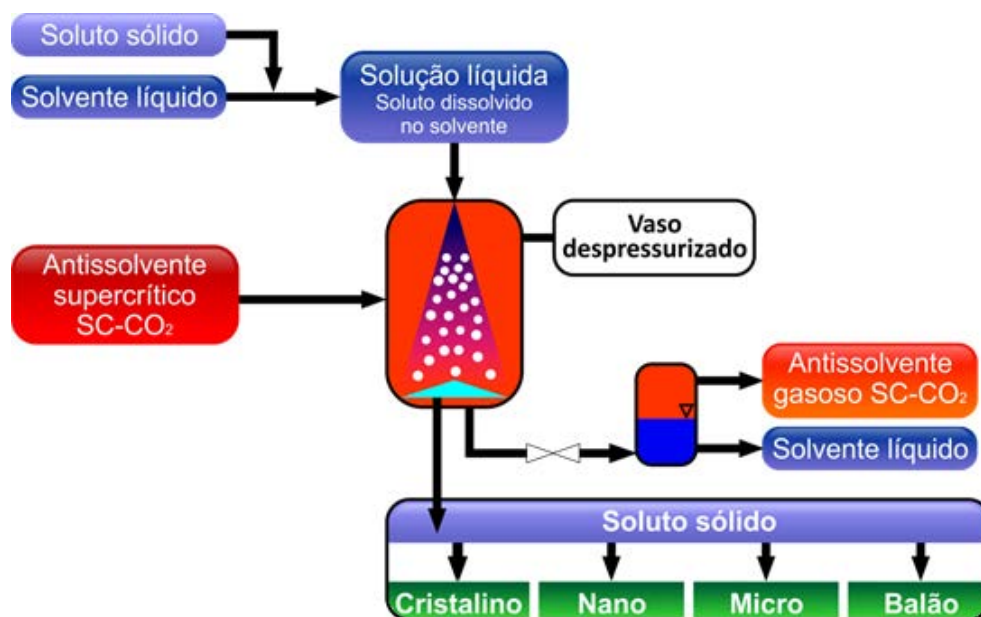
As propriedades do material recristalizado podem ser controladas pelos parâmetros adotados no processo, entre eles, pressão, temperatura, tempo e fluxo de injeção de gás.

Um dos parâmetros chave do processo de cristalização antissolvente é a solubilidade do composto de cristalização no solvente orgânico (74). O processo GAS foi originalmente projetado para recristalizar compostos que são insolúveis em FSC. O princípio do processo de GAS é baseado na supersaturação da solução, induzido pelo contato da solução e o gás antissolvente supercrítico. O papel do antissolvente é reduzir a solubilidade dos compostos dissolvidos na solução e promover a sobressaturação, a nucleação e o crescimento do cristal (75,76,77).

No processo, após a introdução do gás antissolvente, os limites do fluido-sólidos e da fase líquido-líquido são deslocados, respectivamente, para temperatura mais alta ou pressões mais elevadas. Como resultado, o sistema que foi inicialmente uma região de fase homogênea encontra-se numa região de duas fases, que sofre separação, conduzindo à formação das partículas. Uma diferença significativa entre os processos GAS e RESS é que o processo RESS trabalha com um sistema binário de polímero e FSC, enquanto que no processo GAS temos um sistema ternário de polímero, solvente orgânico e gás antissolvente (78).



Figura 7: Diagrama esquemático do processo GAS.



A solubilidade está diretamente relacionada com o poder dissolvente de um dado solvente para o composto de cristalização, que pode afetar o grau de sobressaturação e da razão de nucleação quando o antissolvente é adicionado à solução. A solubilidade de um soluto num solvente particular é determinada pelas propriedades físico-químicas do soluto e do solvente, tais como, momento de dipolo, constante dielétrica e coeficiente de solubilidade (79).

### 2.2.3 Aerosol Solvent Extraction System (ASES)

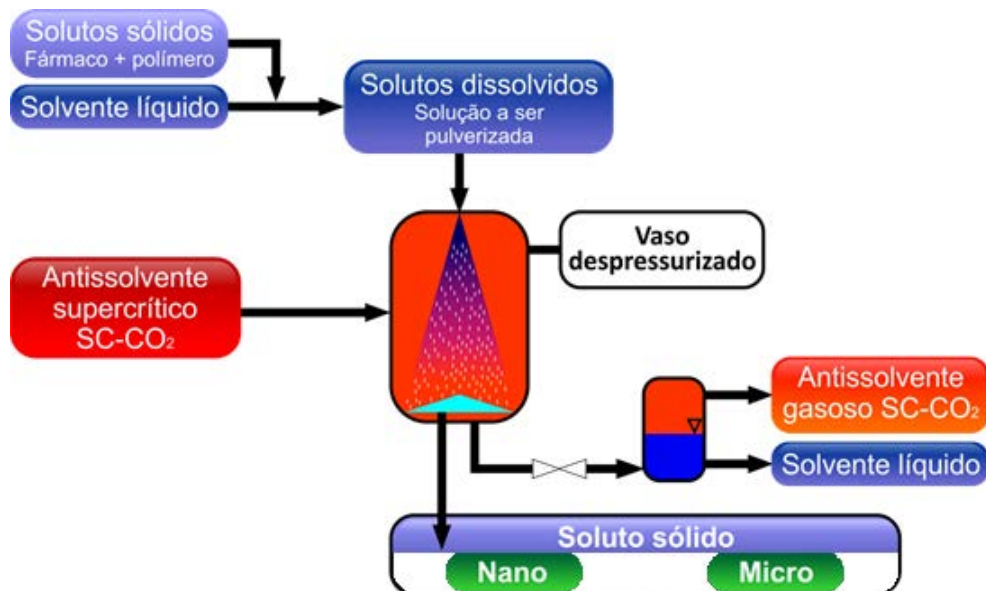
Müller e Fischer (80) patentaram o processo ASES que utiliza as propriedades de extração de solventes orgânicos dos gases supercríticos. O CO<sub>2</sub> líquido é introduzido em um condensador arrefecido e é bombeado através de um aquecedor para uma coluna de alta pressão, a temperatura da coluna pode ser ajustada com outro aquecedor e é controlada por um termoelemento, no meio da coluna a pressão é regulada por uma válvula magnética controlada por um manômetro de pressão. Nestas condições o CO<sub>2</sub> é expandido em condições subcríticas para dentro do recipiente de separação, onde se evapora e é transferido para o condensador, onde é novamente liquefeito (81) (Figura 8).

Durante o tempo de pulverização é possível trabalhar com CO<sub>2</sub> em corrente contínua ou em fase estática. Para produzir micropartículas, fármaco e polímero são dissolvidos ou dispersos num solvente orgânico e pulverizados através de um bico de atomização como gotículas finas dentro da coluna com SC-CO<sub>2</sub>. O solvente orgânico solúvel no SC-CO<sub>2</sub> é extraído, levando à formação das micropartículas.



A dissolução do FSC nas gotículas de líquido atomizado é acompanhada por uma grande expansão de volume e, por consequência, uma redução do poder solvente do líquido, fazendo com que haja supersaturação e formação de micropartículas, submicropartículas e lipossomas uniformes (81,82,83).

Figura 8: Diagrama esquemático do processo ASES.

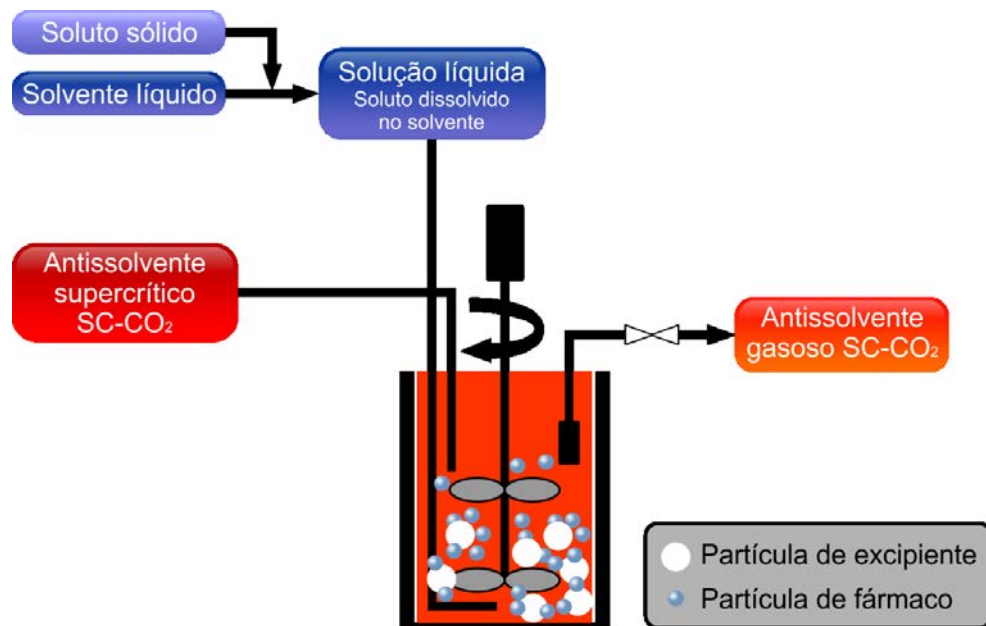


Muitas variantes da técnica ASES foram propostas a fim de controlar a morfologia e o tamanho das partículas pelo uso bicos especiais. A preparação de partículas finas para administração pulmonar abre um futuro para “engenharia” de novos tipos de materiais. Nanopartículas (50-500 nm), micropartículas (500-5000 nm) ou “nanobalões” ocos (5-50µm), possibilitaram um aumento muito significativo na biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água ou preparação de microesferas com fármacos para liberação sustentada (84,50).

#### 2.2.4 SAS–Drug Excipient Mixing (SAS-DEM)

No processo SAS-DEM as partículas do fármaco são precipitadas em SC-CO<sub>2</sub> para dentro de um vaso coletor. Neste processo as partículas do excipiente são suspensas juntamente com o fármaco, sob agitação contínua. As partículas podem ser facilmente ressuspensas em SC-CO<sub>2</sub> devido à densidade alta do fluido (85,86).

Figura 9: Diagrama esquemático do processo SAS-DEM.

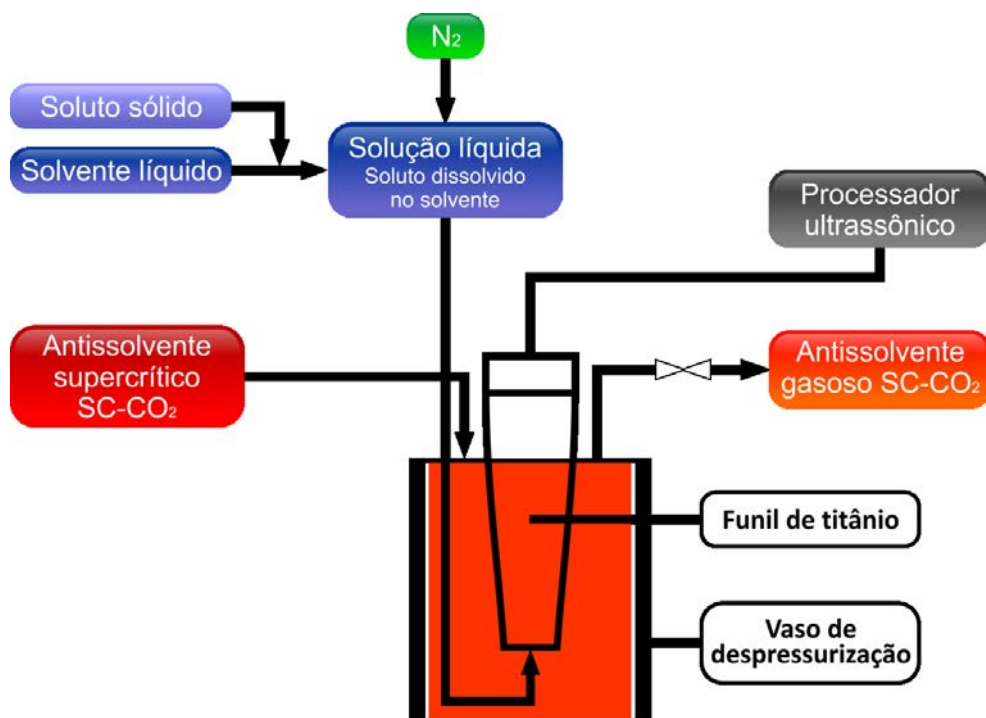


### 2.2.5 Supercritical Antisolvent with Enhanced Mass Transfer (SAS-EM)

A principal modificação na técnica em relação ao SAS é a utilização de uma superfície de deflexão, que vibra a uma frequência ultrassônica capaz de atomizar a solução injetada no sistema em micro gotas. O campo de ultrassom gerado pela superfície do funil no vaso coletor proporciona um componente de velocidade perpendicular à superfície do funil, que aumenta a turbulência e a mistura na fase supercrítica resultando numa transferência alta de massa entre a solução e o gás antissolvente. O efeito combinado da mistura rápida origina partículas 10 vezes menores que aquelas obtidas a partir do processo SAS (CHATTOPADHYAY; GUPTA, 2001).

O processo SAS-EM foi proposto por Gupta e Chattopadhyay em 2000 e patenteada em 2003 (87,88,16). O aumento da transferência de massa do sistema é utilizado para fabricar partículas nas dimensões nano e micrométricas, com polidispersidade baixa.

Figura 10: Diagrama esquemático do processo SAS-EM.



### 2.2.6 Solution Enhanced Dispersion with Supercritical fluid (SEDS)

No processo SEDS o FSC é usado como agente antissolvente para soluções de polímero e agentes de dispersão. O processo SEDS é semelhante ao processo SAS. No entanto, o desenho do bico injetor de ambos os processos é diferente. O bico injetor SEDS apresenta uma concepção coaxial com uma extensão de mistura que melhorar a transferência de massa e na liberação simultânea da mistura (89).

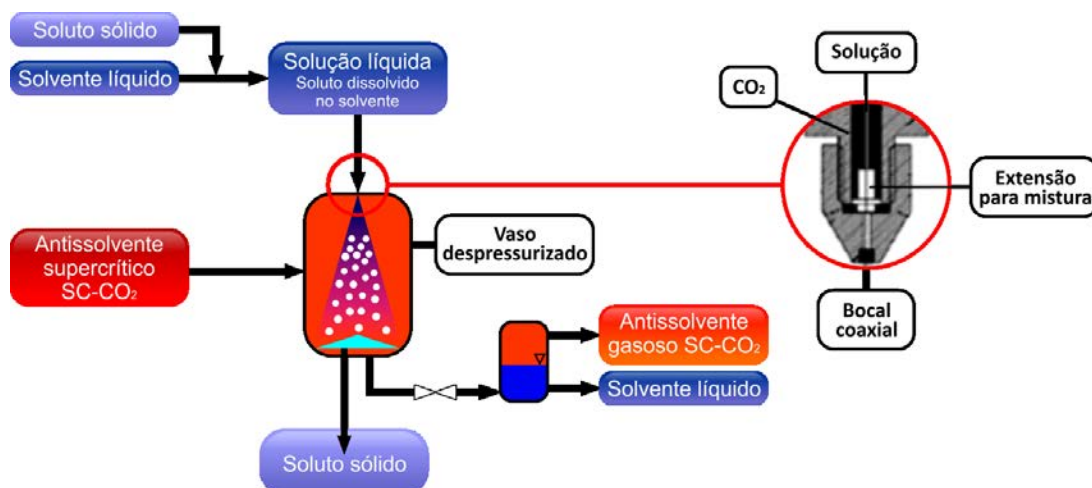
O processo SEDS apresenta três características principais (90): (i) a solução e o FSC são co-introduzida num jato com a alta velocidade, (ii) o fluxo turbulento de FSC acelera os processos de formação tanto de mistura quanto de partículas, (iii) a composição do solvente e do material de FSC precipitante no fluxo do jato, é fixo a partir do ponto inicial de mistura, proporcionando condições de formação de partículas em processo uniforme e contínuo.

O processo SEDS também envolve a aplicação da solução orgânica em SC-CO<sub>2</sub> para precipitar o soluto. Neste processo, o CO<sub>2</sub> é liquefeito através do sistema de arrefecimento e em seguida bombeado para dentro do vaso de precipitação através duto externo do bico coaxial. A pressão do vaso é regulada e quando a taxa de fluxo de SC-CO<sub>2</sub>, atinge os valores desejados, a solução do fármaco é liberada no vaso de precipitação através do duto interno do bico coaxial (91,92,93,94,95).

No processo SEDS é importante considerar os diferentes aspectos teóricos e experimentais, tais como equilíbrio de fases, cinética de nucleação, dinâmica do fluido e transferência de

massa (96,97). Neste processo, o comportamento de fase do sistema sólido-solvente-antissolvente deve ser conhecido para determinar as condições da mistura, as quais podem ser monofásica (fase supercrítica) ou binária (líquido-vapor) (98,99).

Figura 11: Diagrama esquemático de fluxo do processo SEDS.



Fonte do desenho do bocal: Tabernero, Valle e Galán (94).

### 2.2.7 Atomization of Supercritical Antisolvent Induced Suspensions (ASAIS)

No processo ASAIS, o FSC é usado como agente antissolvente e agente de dispersão. Rodrigues e colaboradores (100) desenvolveram o processo ASAIS, que é caracterizado pela dissolução *in-line* do antissolvente (CO<sub>2</sub>).

O CO<sub>2</sub> é misturado com a solução de soluto contida num misturador de pequeno volume, localizado antes do orifício do bico injetor, estas condições causam a precipitação dos solutos (Figura 12). A suspensão gerada é então tratada por *spray-dried* para a separação de solvente. Em comparação com outras técnicas produtoras de partícula, esta modificação da técnica permite um controle mais eficaz do processo antissolvente. Nestas condições, o volume do vaso precipitador de alta pressão pode ser reduzido em várias ordens de magnitude.

Fonte dos detalhes do bocal: Rodrigues e colaboradores (100).

### 2.2.8 Precipitation with Compressed Antisolvents (PCA)

No processo PCA o FSC é usado como antissolvente e agente de dispersão. O fármaco é primeiramente dissolvido em solvente orgânico e em seguida a solução é pulverizada para dentro do vaso contendo SC-CO<sub>2</sub>. O solvente orgânico dissolve no CO<sub>2</sub> e o fármaco precipita na forma de micropartículas (101).

A fim de controlar a cinética da transição de fase e produzir distribuição uniforme do tamanho de partícula duas condições devem ser satisfeitas. Primeiro, deve haver condições uniformes

dentro do meio de nucleação, que pode ser realizada por mistura perfeita do fluido resultando em um nível de supersaturação único e numa taxa de nucleação homogênea. Em segundo, cada núcleo crítico formado deve ser submetido à mesma quantidade de tempo para o crescimento das partículas.

Figura 12: Diagrama esquemático de fluxo do processo AS AIS.

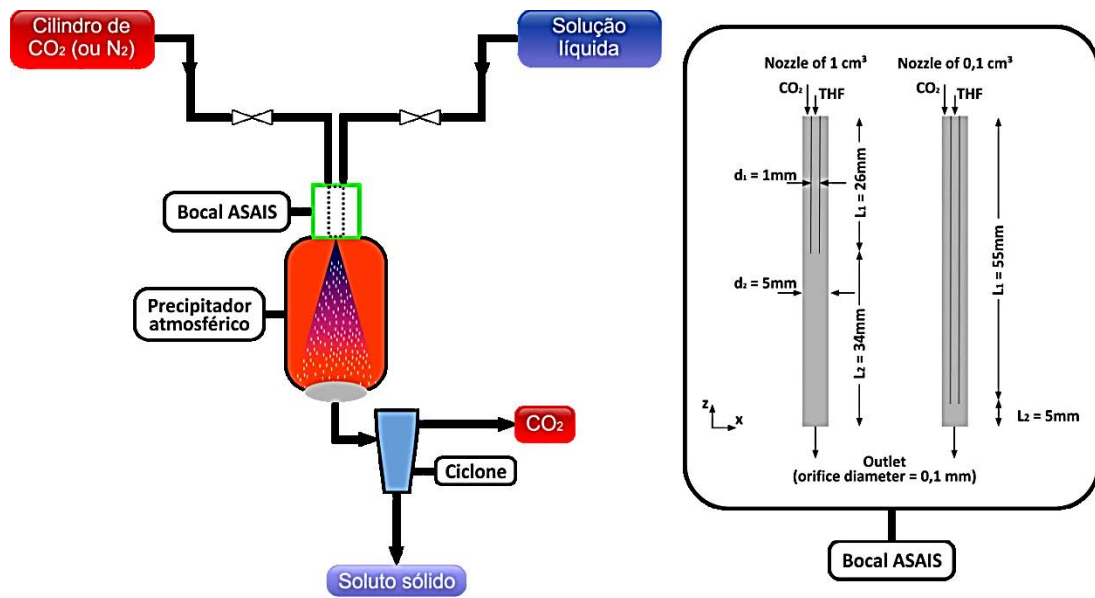
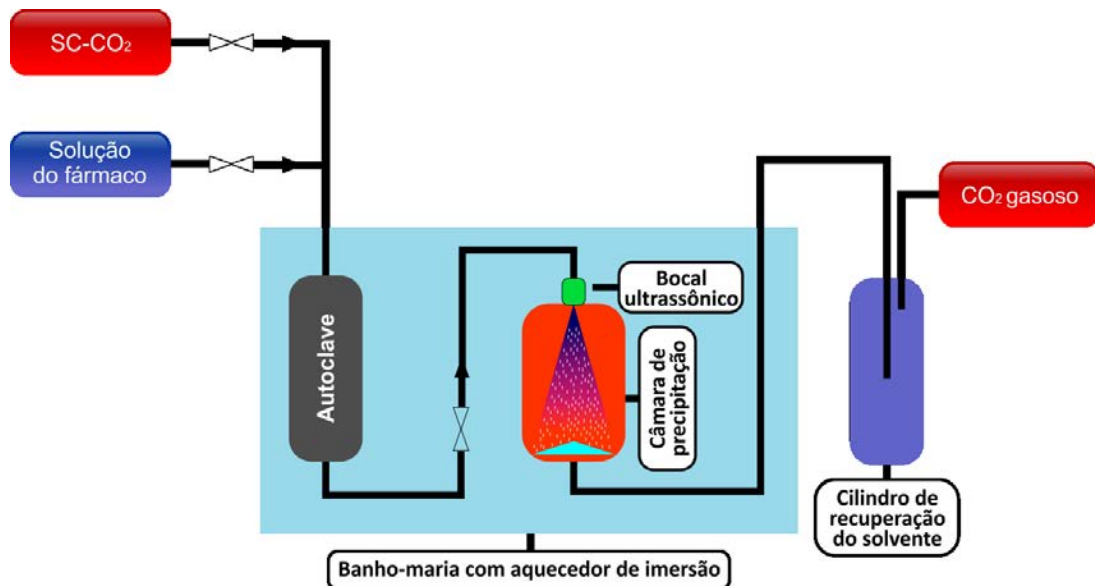


Figura 13: Diagrama esquemático de fluxo do processo PCA.



Variações nos tempos de permanência das partículas resultam em polidispersidade, devido a diferentes tempos de crescimento da partícula após a nucleação primária. A concepção do bico injetor como característica chave deste processo foi descrita por Jamer e colaboradores (2003) como uma combinação única de um atomizador pressurizado com bocal normal e um atomizador pressurizado redemoinho.

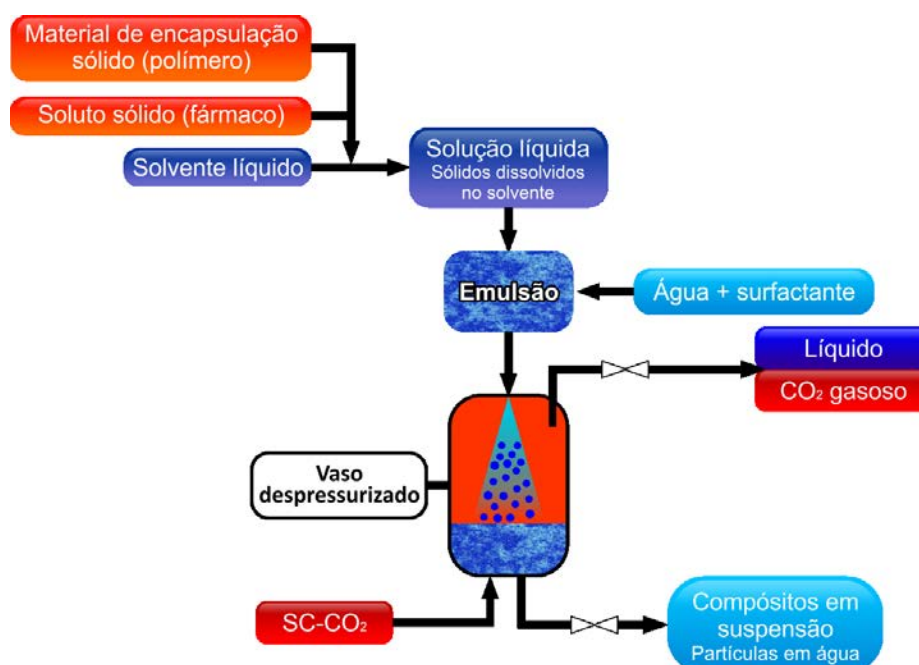
### 2.2.9 Supercritical Fluid Extraction of Emulsions (SFEE)

No processo SFEE o FSC é usado como antissolvente e agente de dispersão e produz suspensão nanoparticulada de fármaco (102,46).

A tecnologia SFEE combina as vantagens da utilização de emulsão com o processo de extração contínuo por FSC, controlando o tamanho e as propriedades de superfície das partículas.

Uma vez que os principais parâmetros de controle são as propriedades físicas da emulsão, e não as características dos fármacos, cuidados no desenvolvimento da formulação devem ser adotados para garantir uma emulsão estável (19).

Figura 14: Diagrama esquemático de fluxo do processo SFEE.



## 2.3 Processos que não dependem do poder solvente do CO<sub>2</sub>

Esta categoria compreende todas as operações que não dependem da potência solvente do CO<sub>2</sub>. No entanto, obtém vantagens da expansão de volume grande e do efeito de arrefecimento produzido quando o CO<sub>2</sub> é despressurizado, isto é, passa das condições de operação para a pressão ambiente.

### 2.3.1 Particles from Gas Saturated Solutions (PGSS)

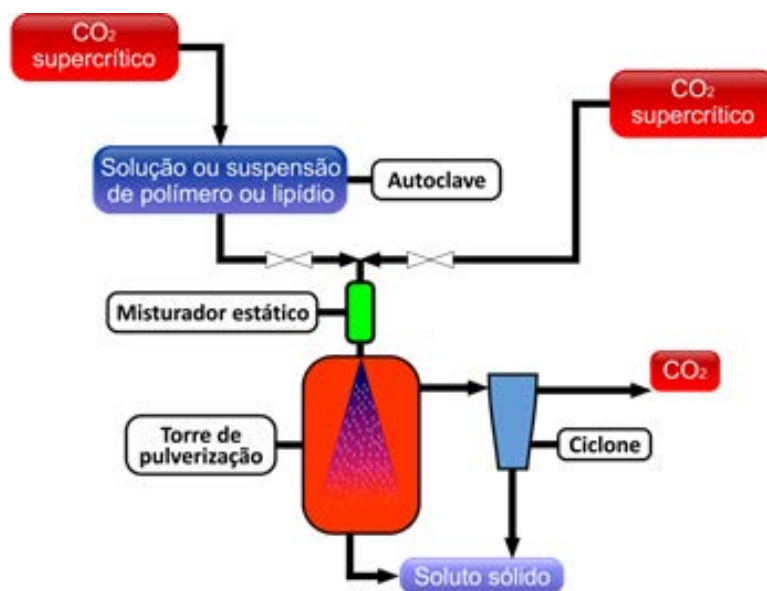
Weidner, Knez, Novak (103) patentearam o processo PGSS no qual FSC exerce a função de co-soluto. Este processo consiste na dissolução do gás comprimido em um material fundido dentro de um reator sob alta pressão e agitação até que a saturação do sistema seja alcançada.

A solução formada pelo gás saturado, contendo entre 5-50 % de gás comprimido é expandida através de um bico injetor (Figura 15). As partículas sólidas são formadas devido à redução extremamente rápida da temperatura causada pela expansão do fluido. Este fenômeno é conhecido comumente como efeito Joule-Thomson (104,48).

O processo PGSS oferece perspectivas muito promissoras de desenvolvimento industrial, no qual o SC-CO<sub>2</sub> é usado como um agente de redução de viscosidade (45). É de conhecimento que um aumento na viscosidade e uma distribuição de tamanho desigual de um material de revestimento levam a formação de partículas com polidespersidade (46).

As vantagens das técnicas baseadas especialmente em SAS e PGSS são a produção de nano ou micropartículas esféricas com superfícies lisas e com distribuição de tamanho estreita (48).

Figura 15: Diagrama esquemático de fluxo dos processos PGSS.



### 2.3.2 PGSS drying

Em uma abordagem diferente chamada PGSS *drying* (105), onde o FSC exerce a função de co-soluto e gás propelente (106), as partículas não precisam ser secas por meio de um fluxo de N<sub>2</sub> aquecido como nos processos CAN-BD e SAA. Neste caso, o solvente é removido a partir da torre de pulverização junto com o gás. Devido às temperaturas baixas (30-60 °C) um pó de fluxo livre precipita em uma atmosfera livre de oxigênio, o que é particularmente importante no processamento de substâncias sensíveis à oxidação (105,106).

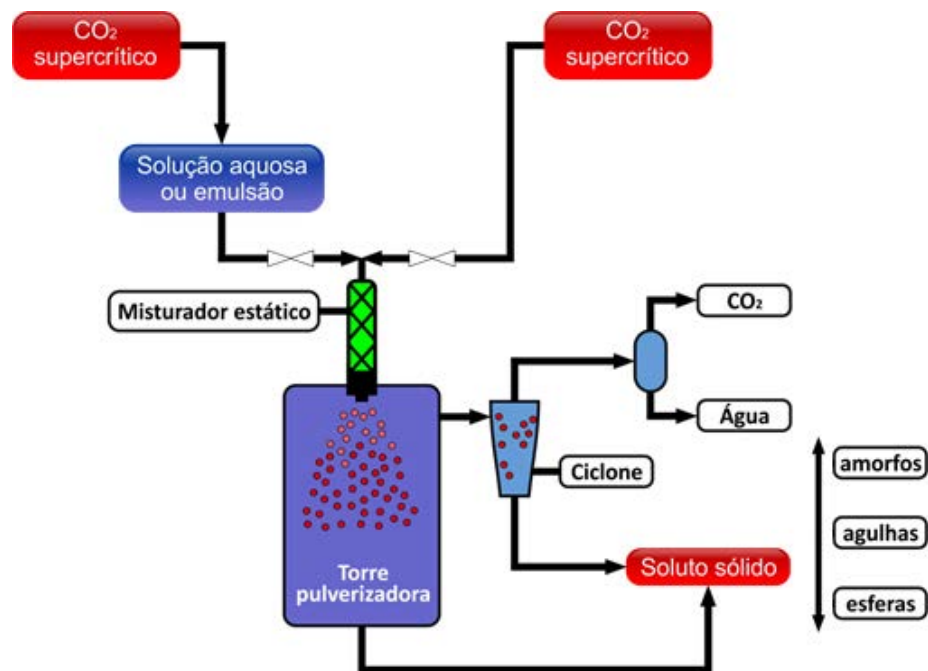
Como no processo PGSS a solução líquida a ser seca é intensamente misturada com SC-CO<sub>2</sub>, utilizando misturador estático à temperatura e pressão desejadas. No entanto, nesta fase, não obstante a dissolução de CO<sub>2</sub> na solução, uma quantidade considerável do solvente é



removida pelo gás. Esta mistura bifásica é então pulverizada através de um bico injetor para a torre de pulverização, onde gotículas finas são formadas devido à expansão de CO<sub>2</sub>. Além disso, a evaporação do solvente residual ocorre devido às condições pré-selecionadas de temperatura na coluna de pulverização (107).

Para atingir esta fase gasosa homogênea, a temperatura pós-expansão deve ser maior do que o ponto de orvalho dos gases do sistema binário (108,109).

Figura 16: Diagrama esquemático de fluxo do processo PGSS-*drying*.



### 2.3.3 Concentrated Powder Form(CPF)

Em 1997, o processo Concentrated Powder Form (CPF) foi proposto por Weidner e colaboradores (110,111) para a geração de pós secos, de fluxo livre a partir de dispersões contendo um teor elevado de líquidos.

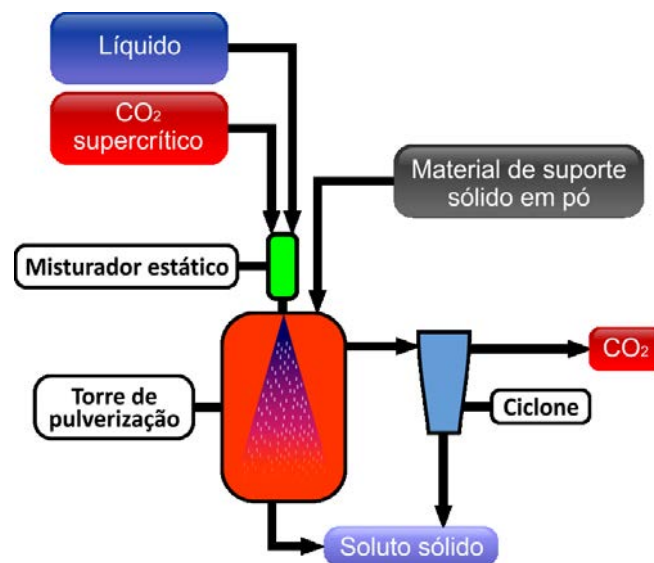
O líquido a ser transformado em pó entra em contato com o gás pressurizado e é expandido através do bico injetor formando gotículas de líquido dispersas. Um carreador sólido, com propriedade absorvente, é injetado para dentro do pulverizador por meio de um gás inerte, para facilitar o processo de secagem. O gás em expansão provoca uma zona de turbulência elevada em que às gotículas e carreador sólido são intensamente misturados. Nessas condições o carreador é aglomerado pelas gotículas do líquido (107).



Quando a coluna de pulverização é suficientemente alta, os aglomerados são formados antes de chegar ao fundo ou na parede. Mesmo contendo 90 % (m/m) ou mais de líquido, os aglomerados são retirados continuamente a partir do fundo da coluna de pulverização (107).

O processo CPF foi aplicado a mais de 100 líquidos e aproximadamente 60 carreadores sólidos diferentes (112,113). As propriedades dos aglomerados dependem fortemente das propriedades do carreador e do líquido, tais como, composição química e física. A absorção de líquidos pelos carreadores tem sido investigada em detalhes do ponto de vista teórico e experimental (114,115).

Figura 17: Diagrama esquemático de fluxo do processo CPF®.



Um procedimento para selecionar o carreador adequado foi desenvolvido por Otto, Gruner e Weinreich (116). A densidade do carreador é um parâmetro quantitativo adequado para correlacionar as experiências sobre absorção do líquido. A sílica altamente dispersa, com densidade aparente de  $50 \text{ kg.m}^{-3}$  pode se ligar a mais de 90 % da massa de líquido, enquanto que a sílica com densidade aparente de  $200 \text{ kg.m}^{-3}$ , pode se ligar somente a 60 % em massa (116,117).

Outras propriedades do produto, correlacionadas com os parâmetros do processo são: (i) o efeito Joule-Thomson na coluna de pulverização; (ii) os gases inertes aplicados sem oxigenação na coluna de pulverização e (iii) os produtos selecionados (gorduras insaturadas) *versus* estabilidade (117). Outros parâmetros, tais como, os processos que ocorrem no misturador estático, formação de gotas, processo pulverização e aglomeração na coluna e o desenvolvimento das propriedades do produto durante o armazenamento de longo prazo (*stress*) precisam ser melhor estudados (107).

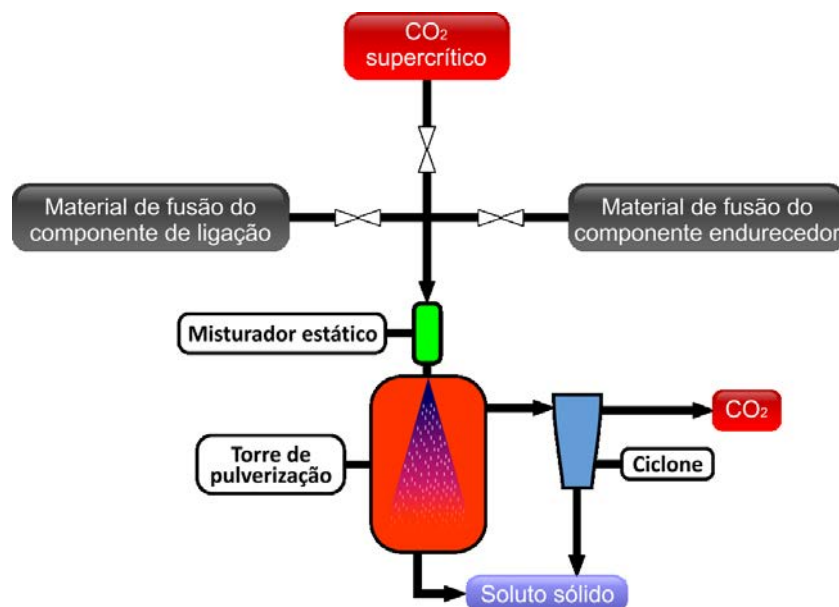
### 2.3.4 Continuous Powder Coating Spraying Process (CPCSP)

O CPCSP é outro processo derivado do PGSS proposto por Weidner e colaboradores (1999) como uma técnica alternativa para revestimento de pós (118).

A técnica de revestimento convencional envolve tratamentos em temperaturas elevadas, bem como, tempos longos de residência, os quais podem causar reação de degradação prematura do material revestido (119).

No CPCSP o ligante e o solidificador são fundidos em recipientes separados para evitar a reação prematura dos polímeros. Ambos os componentes são fundidos em misturador estático e homogeneizados com CO<sub>2</sub> comprimido, neste caso o gás denso tem a função de soluto. Devido à dissolução do CO<sub>2</sub>, o ponto de fusão da mistura diminui e, assim, é possível realizar homogeneização a temperaturas muito baixas, utilizando tempos de residência muito curtos evitando a reação de degradação. A solução formada no misturador é expandida por meio de um bico injetor para dentro da coluna de pulverização, promovendo a expansão do volume de CO<sub>2</sub>. Consequente à redução drástica de temperatura um revestimento em pó fino é formado. O gás é retirado da coluna de pulverização e por meio de ciclone e de filtragem as partículas finas são separadas dos gases (119).

Figura 18: Diagrama esquemático de fluxo do processo CPFSP.

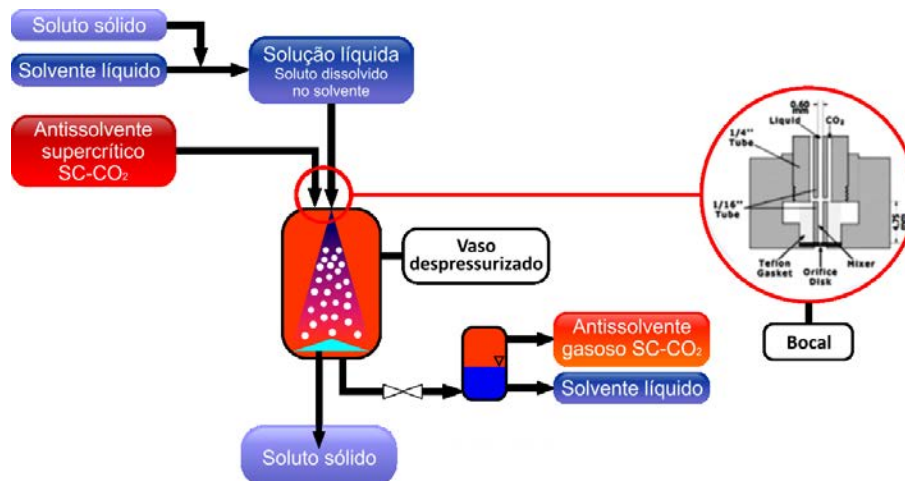


### 2.3.5 Supercritical Enhanced Atomization (SEA)

O processo SEA (Figura 19) explora basicamente o melhoramento da atomização do CO<sub>2</sub> no processo de secagem por aspersão. O efeito está baseado na capacidade dos FSC aprimorar a

dissolução dos jatos de líquido em gotas finas quando despressurizado, simultaneamente, com soluções líquidas (120).

Figura 19: Diagrama esquemático de fluxo do processo SEA.



Fonte dos detalhes do bocal: Padrela e colaboradores (2010)

### 2.3.6 Supercritical fluid-Assisted Atomization (SAA)

O SAA foi descrito por vários investigadores (121,122,123,124,125,126) como um processo onde o SC-CO<sub>2</sub> e uma solução do fármaco em água ou solvente orgânico, são injetados para dentro de um vaso precipitador mantido em condições próximas da pressão atmosférica. As partículas são obtidas após a evaporação das gotículas em atmosfera de nitrogênio aquecido (Figura 20).

No processo SAA um misturador de alta pressão é usado para obter uma solubilização contínua de quase-equilíbrio da solução líquida no SC-CO<sub>2</sub>. A solução formada entra rapidamente em contato com o misturador de alta pressão e é imediatamente atomizada para o interior do precipitador mantido à pressão atmosférica (126).

A atomização para o interior do precipitador ocorre em duas etapas: as gotículas da solução líquida na saída do injetor são subdivididas em gotículas secundárias devido à expansão SC-CO<sub>2</sub>. Este processo foi utilizado como alternativa para melhorar a micronização de fármacos (126).

### 2.3.7 Carbon Dioxide Assisted Nebulization with a Bubble Dryer (CAN-BD)

O SAA deu origem ao processo CAN-BD patenteado por Sievers, Sellers e Carpenter (125). O CAN-BD demonstrou ter ampla aplicabilidade para molécula pequena e macromolécula, incluindo proteínas terapêuticas, para obtenção de pós secos suficientemente finos para ser inalado e alcançar o pulmão (127). Neste processo, o fármaco, dissolvido em água ou álcool

(ou ambos), é misturado intimamente com CO<sub>2</sub> quase-crítico ou supercrítico em um pequeno tubo no formato de um 'T'. As microbolhas e microgotículas formadas são descomprimidas em uma câmara de baixa temperatura de secagem, em ambiente de nitrogênio, onde a névoa de aerossol seca em poucos segundos. Para uma câmara com capacidade de 750 mL o tempo de residência das partículas no interior da câmara de secagem (25-80 °C) é inferior a 3 s (128,129,130).

As principais vantagens deste processo são maior estabilidade para fármacos termicamente lábeis, a polidispersidade baixa e granulometria adequada para a liberação pulmonar nos alvéolos.

Figura 20: Diagrama esquemático de fluxo do processo SAA.

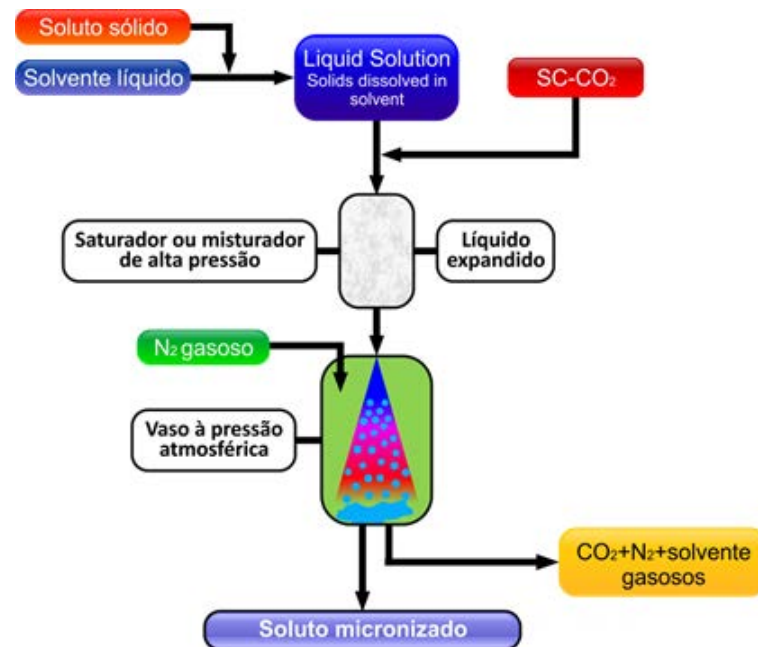
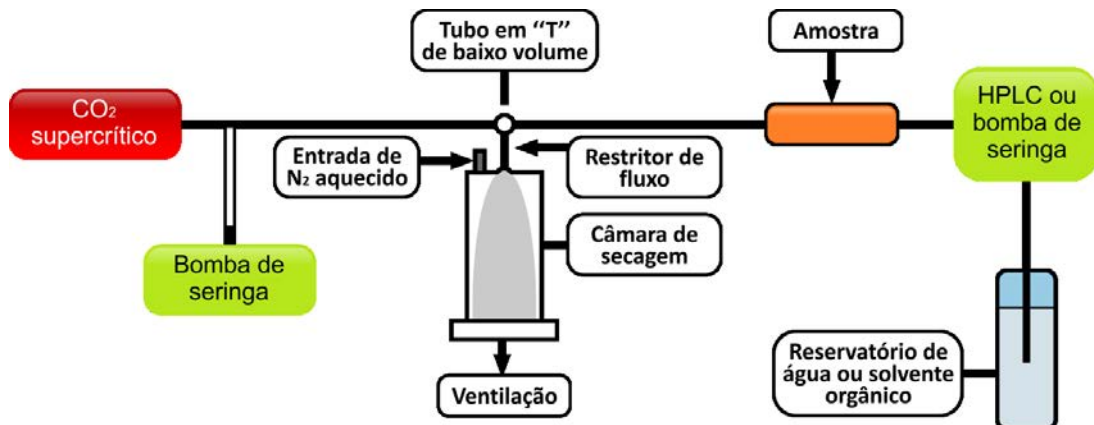


Figura 21: Diagrama esquemático de fluxo do processo CAN-BD.

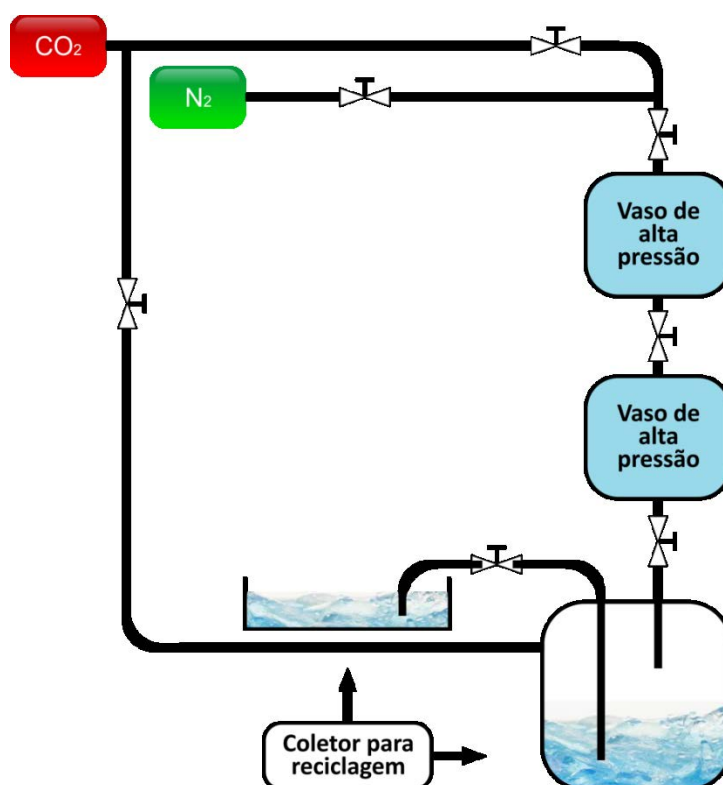


### 2.3.8 Depressurization of an Expanded Liquid Organic Solution (DELOS)

O processo DELOS é um processo de etapa única, sendo empregado na produção direta de partículas cristalinas micro- ou submicrométricas. A solução orgânica previamente expandida como um fluido comprimido promove, quando despressurizada, uma redução rápida e homogênea da temperatura. Através deste processo DELOS, é possível alcançar a redução de tamanho de diferentes tipos de compostos orgânicos que são de difícil pulverização por meio de técnicas convencionais (131).

Neste processo patenteado por Ventosa e colaboradores (132) o papel do FSC é produzir um subarrefecimento homogêneo da solução causando a precipitação de partículas sólidas. O processo DELOS difere das técnicas de cristalização nas quais o FSC age como cossolvente da solução orgânica do soluto a ser cristalizado.

Figura 22: Diagrama esquemático de fluxo do processo DELOS.



O processo DELOS compreende três etapas: (i) dissolução do soluto no solvente, à pressão atmosférica e temperatura ambiente para formar solução concentrada inferior ao limite de saturação; (ii) adição de FSC (CO<sub>2</sub>) na solução orgânica para obter uma solução líquida expandida na temperatura e pressão de trabalho contendo uma fração molar conhecida do FSC. A concentração de soluto nesta etapa deve ficar abaixo do limite de saturação na mistura expandida do solvente e do FSC; (iii) a redução rápida da pressão da solução expandida, a partir da pressão atmosférica de trabalho (133).

Como consequência, ocorre um aumento pronunciado e homogêneo da razão de supersaturação e o fenômeno de nucleação ocorre causando a precipitação de partículas cristalinas micro ou submicrométrica com baixa polidispersidade.

A Tabela 2 mostra as subdivisões da tecnologia de FSC e foi sistematizado para apontar as categorias, os nomes e os tipos dos processos, o uso ou não de solvente orgânico os principais fatores críticos e a granulometria das partículas que podem ser produzidas.

### **3 Aplicações farmacêuticas da tecnologia de FSC nos processos de formação de partícula**

A tecnologia de FSC oferece oportunidades promissoras para produzir e modificar substâncias, com potencial para simplificar os processos de produção na indústria farmacêutica, através de procedimentos unitários para produção de partículas ou matérias-primas micronizadas (141,84) ou sistemas nanoestruturados para liberação de fármacos (142,23,19).

A tecnologia de FSC tem potencial para enfrentar os desafios dos processos de desenvolvimento de produtos farmacêuticos para o século 21 (141). A qual emerge como uma alternativa promissora à maioria das técnicas existentes para formação de partículas, tais como, *freeze-drying*, *spray-drying* e precipitação.

A tecnologia de FSC envolve o crescimento das partículas de forma controlada para obter morfologia e escala granulométrica de tamanho previamente determinado, sem necessidade de tratamentos posteriores (143,5).

Na formação de partículas, os estudos apresentados na Tabela 3 têm como objetivos alterar as características de superfície, tamanho e forma (143,144,23,19). No entanto, os processos de formação de micro e nanopartículas e a otimização das propriedades físico-químicas de fármacos, baseado no princípio do uso de fluido, em condições supercríticas, com propriedade solvente ou antissolvente, têm sido utilizados de forma isolada.

Na otimização das propriedades físico-químicas dos ativos farmacêuticos, os objetivos tem sido alterar as propriedades do estado sólido de cristalino para amorfo, controlar o polimorfismo, reduzir a granulometria e melhorar a solubilidade em água de fármacos pouco solúveis.

Tabela 2: Categoria do SC-CO<sub>2</sub>, nome do processo que utiliza FSC, uso de solvente orgânico, tipo de processo, fatores críticos no processo e tipos de partículas produzidas no desenvolvimento farmacêutico.

| <b>Categoria do FSC</b>                                       | <b>Nome do processo</b> | <b>Solvente orgânico</b> | <b>Processo</b>         | <b>Fatores críticos*</b> | <b>Tipo de partículas produzidas</b>                     | <b>Referência</b>   |
|---------------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------|
| SC-CO <sub>2</sub> como Solvente                              | RESS                    | Não                      | Contínuo                | a, b, c, d               | Micro ou nanopartículas e partículas compostas           | (6,41)              |
|                                                               | RESOLV                  | Não                      | Contínuo                | a, b, c, d, e, f         | Nanopartículas                                           | (108)               |
|                                                               | RESAS                   | Não                      | Contínuo                | a, b, c                  | Nanopartículas                                           | (62,63)             |
|                                                               | RESS-SC ou CSS          | Não                      | Descontínuo             | a, b, c, h, i            | Nanopartículas                                           | (52,53,134)         |
|                                                               | SSI                     | Não                      | Descontínuo             | a, b, c, h, i            | Partículas de polímero impregnada com fármaco            | (65)                |
| SC-CO <sub>2</sub> como Antissolvente                         | SAS                     | Sim                      | Semicontínuo            | a, i, j                  | Micro ou nanopartículas e partículas compostas           | (135,136,137,49,71) |
|                                                               | GAS                     | Sim                      | Contínuo                | a, i, j                  | Micro ou nanopartículas e partículas compostas           | (138,139)           |
|                                                               | ASES                    | Sim                      | Semicontínuo            | a, b, c, i, j            | Micro ou nanopartículas e partículas compostas           | (80)                |
|                                                               | SAS-DEM                 | Sim                      | Semicontínuo            | a, i, j, m               | Micro ou nanopartículas compostas                        | (85,86)             |
|                                                               | SAS-EM                  | Sim                      | Semicontínuo            | b, f, j                  | Nanopartículas ou nano-flakes                            | (87,88,140)         |
|                                                               | SEDS                    | Sim                      | Semicontínuo            | a, b, c, i, j            | Micropartículas e partículas compostas                   | (89)                |
|                                                               | AS AIS                  | Sim                      | Semicontínuo            | a, c, i, j               | Micropartículas e partículas compostas                   | (100)               |
|                                                               | PCA                     | Sim                      | Contínuo                | b, j                     | Micro ou nanopartículas e partículas compostas           | (101)               |
|                                                               | SFEE                    | Sim                      | Contínuo                | a, f, i, j               | Micropartículas e partículas compostas                   | (19)                |
| Outros – não dependem do poder solvente do SC-CO <sub>2</sub> | PGSS                    | Não                      | Contínuo ou Descontínuo | c, n                     | Micro ou nanopartículas e partículas compostas           | (103)               |
|                                                               | CPF                     | Sim                      | Contínuo                | b, f, j                  | Pós secos, de fluxo livre e com teor elevado de líquidos | (110)               |
|                                                               | CPCSP                   | Não                      | Contínuo ou Descontínuo | b, c, i, j, o            | Pós revestidos                                           | (119)               |
|                                                               | CAN-BD                  | Água e/ou álcool         | Contínuo                | b, c, e                  | Nanopartículas e partículas compostas                    | (129)               |
|                                                               | SAA                     | Sim                      | Contínuo                | c, e, i, j, n, o         | Micropartículas e partículas compostas                   | (49)                |
|                                                               | SEA                     | Não                      | Contínuo                | c, i, j                  | Micropartículas e partículas compostas                   | (120)               |
|                                                               | PGSS <i>drying</i>      | Sim                      | Contínuo                | f, l, o                  | Micropartículas                                          | (105,109,108)       |
|                                                               | DELOS                   | Sim                      | Descontínuo             | b, c, d, h, i            | Micro ou nanopartículas                                  | (133)               |

\*Fatores do FSC para produção de partículas: (a) solubilidade do material no FSC, (b) condições da pré-expansão, (c) dispositivo de pulverização, (d) agregação do material particulado, (e) tipo de solvente, (f) escolha do agente plasticização, (g) propriedade de difusão, (h) propriedades eutéticas, (i) extração solvente, (j) transferência de massa, (l) viscosidade, (m) propriedades do material de suporte e do líquido, (n) concentração da solução líquida, (o) escolha da temperatura.

O processo para obter tamanho e morfologia desejados das partículas é determinado por dois mecanismos, evaporação do solvente para a fase antissolvente e difusão do antissolvente na forma de pequenas gotas. No caso das preparações de dispersões sólidas para melhorar a solubilidade de fármacos pouco solúveis em água, os polímeros hidrofílicos ou substâncias mais hidrossolúveis são utilizados como intermediários (145,146,147). As características do estado sólido podem ser influenciadas pelos mesmos fatores e pela presença do intermediário (145). Em ambos os casos a densidade do CO<sub>2</sub>, que é influenciada pela temperatura e pressão em condições supercríticas, tem papel importante na transferência de massa entre o solvente orgânico e o CO<sub>2</sub>, durante a formação das partículas ou da dispersão sólida (148).

Knez e Weidner (67), em um artigo de revisão sobre modelagem e formação de partículas usando FSC, descreveram que o maior desafio tecnológico, no uso do FSC é garantir a miscibilidade completa do solvente com o FSC. A garantia desta interação plena entre FSC e o solvente depende da polaridade final da solução, da temperatura crítica e pressão crítica do sistema.

Na indústria farmacêutica, especialmente para a formulação de moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas, incluindo as biomoléculas (50), as partículas finas uniformes com variação estreita de tamanho são de grande interesse. Entre os muitos processos, utilizando a tecnologia de FSC, para a formação de partículas finas estão incluídos: RESS, RESOLV, RESAS, RESS-SC, SSI, SAS, GAS, ASES, SAS-DEM, SAS-EM, SEDS, AS AIS, PCA, SFEE, PGSS, CPF, CPF-SP, SAA, SEA, PGSS-drying e DELOS (67,149,150,141,48,104,20,84,50,19).

Entre as várias aplicações para formação de partícula através de FSC, a micronização, a co-precipitação e o encapsulamento ou revestimento serão discutidos a seguir considerando a influência do SC-CO<sub>2</sub> no processo.

### **3.1 Micronização**

A micronização ou redução granulométrica nos processos farmacêuticos é usada para aumentar a área de superfície das partículas, melhorar a velocidade de dissolução do fármaco, manter uma distribuição média de tamanho das partículas e, conseqüentemente, obtenção de mistura homogênea para a produção de formas farmacêuticas sólidas.

#### **3.1.1 Micronização por processos empregando SC-CO<sub>2</sub> como solvente**

As soluções saturadas de partículas no CO<sub>2</sub> constituem um dos métodos para processamento em alta pressão, a qual tem sido usada para a micronização de fármacos pouco solúveis ou



insolúveis em água (50,107). A precipitação a partir de soluções supercríticas em RESS e PGSS são exemplos de processos que empregam o SC-CO<sub>2</sub> como solvente.

Shinozaki e colaboradores (151) e Moribe e colaboradores (152) investigaram o efeito das condições de extração do processo RESS sobre a redução de tamanho de partícula e transformação polimórfica do barbitol e da tolbutamida, e de outros princípios ativos farmacêuticos por cristalização sem uso de solventes orgânicos (RESS e PGSS).

A pressão e a temperatura aplicadas ao SC-CO<sub>2</sub> na investigação de Moribe e colaboradores (152) influenciaram no polimorfismo das partículas micronizadas de fenilbutazona. Empregando o processo RESS, estes pesquisadores obtiveram partículas da forma cristalina meta-estável de fenilbutazona (forma  $\beta$ ), e estas mostraram melhor dispersibilidade e molhabilidade em água.

A ciclosporina A foi escolhida como fármaco de interesse por Tandy, Dehghani e Foster (153). O ponto de fusão da ciclosporina diminuiu de 150 °C para 25 °C, quando exposta ao CO<sub>2</sub> em pressão elevada (55 bar). A ciclosporina micronizada foi produzida com sucesso tanto por processo RESS quanto por PGSS. Após micronização, o tamanho médio de partícula de ciclosporina precipitada por ambas as técnicas foi menor que 1  $\mu$ m, o qual está relacionado com uma redução de 97% em comparação com a ciclosporina não transformada. Nenhuma mudança significativa na morfologia e tamanho das partículas foi observada em relação à temperatura de extração e pressão de pré-expansão, enquanto que um aumento no diâmetro do bico injetor resultou num ligeiro aumento na dimensão das partículas e diminuição no grau de agregação.

Hezave e Esmailzadeh (154) investigaram a importante influência da configuração do bico injetor no processo RESS e o efeito sobre o tamanho e morfologia das partículas precipitadas. Neste estudo foi investigado o efeito de outros parâmetros, incluindo a pressão de extração (140-220 bar), temperatura de extração (313-333 K), distância de pulverização (1-10 cm) e temperatura de pré-expansão (363-423 K) no tamanho e morfologia das partículas precipitadas de ácido mefenâmico. As imagens SEM mostraram que as partículas precipitadas tiveram ligeira modificação na morfologia. O aumento da temperatura de pré-expansão, o aumento no comprimento do bico injetor e na distância de pulverização aumentou o tamanho médio das partículas precipitadas. O tamanho das partículas aumentou com o aumento do diâmetro do bico injetor na temperatura de extração de 333 K, enquanto esta tendência não foi observada para o diâmetro do bico injetor na temperatura de extração de 313 K.

### 3.1.2 Micronização por processos empregando SC-CO<sub>2</sub> como antissolvente

Lobo e colaboradores (155) sugeriram possíveis vantagens da budesonida obtida pelo processo SEDS sobre a budesonida micronizada ou esferonizada para liberação passiva do pó seco em inaladores. Como tal, SEDS pode ser utilizado para melhorar o fluxo e desempenho da quantidade relativa de pó, carregado em cápsula, que deixa o dispositivo de inalação. Além de proporcionar características vantajosas do estado sólido, tais como a pureza cristalográfica, seleção do tipo de polimorfo e minimização de energia alta dos sítios amorfos. O processo SEDS pode ser particularmente útil na formulação de fármacos termolábeis ou moléculas difíceis de processar, para as quais outros métodos de processamento podem falhar.

### 3.1.3 Micronização por processos que não dependem do poder solvente do SC-CO<sub>2</sub>

A tecnologia de cristalização por fluido supercrítico (SFC; *Supercritical Fluid Crystallization*) têm ganhado atenção crescente na indústria farmacêutica devido sua capacidade e versatilidade de produzir micropartículas finas por especificações pré-determinadas. De um modo geral, a tecnologia SFC pode ser dividida em duas categorias: (i) precipitação a partir de soluções supercríticas, por exemplo, nos processos RESS e PGSS; (ii) precipitação usando fluidos supercríticos como não-solvente ou antissolvente, por exemplo, nos processos GAS, SAS, PCA, ASES ou SEDS (10).

A recristalização dos produtos farmacêuticos na tecnologia de FSC utiliza a sobressaturação como força motriz para a formação de partículas, que é o mesmo da cristalização tradicional; no processo antissolvente supercrítico (SAS), o poder de solubilização de um solvente é diminuído por adição de um FSC como um antissolvente no qual o soluto é insolúvel (156).

A nucleação e, conseqüentemente, o crescimento dos cristais a partir do sistema soluto-solvente orgânico-antissolvente são regulados pela difusão do antissolvente na fase orgânica e evaporação do solvente orgânico na fase de antissolvente (156).

### 3.1.4 Micronização por processos empregando SC-CO<sub>2</sub> como cossoluto

O processo CAN-BD pode secar e micronizar produtos farmacêuticos para administração de fármacos por via pulmonar (122,129,128,157,158). Através deste processo foram obtidos nanopartículas de anfotericina B, ovalbumina-trealose, naproxeno, ácido palmítico, manitol, tripsinogênio, lactose, lactato-desidrogenase, lisozima, desoxirribonuclease recombinante humana, cromoglicato de sódio, a ciclosporina, o sulfato de tobramicina, sulfato de albuterol, e cloridrato de ciprofloxacina (129).

O processo CAN-BD foi utilizado para gerar finas partículas secas de vacina da hepatite B, vacina de vírus atenuados (sarampo) e fármacos (rifampicina e zanamivir), de 1-3  $\mu\text{m}$  de diâmetro, que estão no intervalo de tamanho ótimo para a administração de medicamentos pulmonares (130).

O processo CAN-BD baseia-se na ampliação de uma solução quase-crítica ou SC-CO<sub>2</sub> (uma microemulsão de CO<sub>2</sub> ou uma solução), a uma pressão de 80-100 bar, e o aerossol rapidamente seca em segundos. A micronização e secagem de fármacos termolábeis (incluindo proteínas) podem ser, simultaneamente, realizadas a temperaturas inferiores a 80°C. O processo envolve um fluxo contínuo de uma solução de fármaco através de tubos de aço inoxidável de 1/16 polegadas para gerar pó seco, e não necessita de abrir e fechar vasos de alta pressão (129,130).

### **3.2 Co-precipitação**

Os processos que utilizam FSC são baseados em um princípio simples, no qual o fármaco e o polímero são co-precipitados usando as propriedades antissolvente do SC-CO<sub>2</sub>. Este método é mais factível quando as moléculas do carreador e do fármaco são capazes de formar uma solução sólida (7,11,10,9,8).

A co-precipitação de princípios ativos farmacêuticos com aditivos pode fornecer a capacidade de adicionar funcionalidades a estes em estágios iniciais da descoberta e de síntese de fármacos (159).

#### **3.2.1 Co-precipitação por processos empregando SC-CO<sub>2</sub> como solvente**

Padrela e colaboradores (134) produziram material puro co-cristalino de indometacina-sacarina (IND-SAC) que foram selecionados para investigar as propriedades solvente (SAS), antissolvente (CSS) e atomização melhorada (SAA) dos FSC. A capacidade do processo CSS foi limitada pela formação de co-cristais de IND-SAC. Devido à dissolução pobre de componentes puros no FSC foi obtida partícula de tamanho grande e aglomerada. No entanto, não foram observadas diferenças significativas em termos de formação de co-cristal em diferentes condições de processamento nos processos SAS e SAA, onde foram obtidas partículas em forma de agulhas em bloco e em forma esférica, respectivamente. A granulometria das partículas foi de 0,2-5  $\mu\text{m}$ . Esta pesquisa demonstrou o potencial das tecnologias SCF como métodos de rastreamento para co-cristais com possibilidades para a engenharia de partículas.

Rodrigues e colaboradores (160) demonstraram que o processo (SAA) de atomização assistida por SC-CO<sub>2</sub> produzem partículas por dois mecanismos diferentes, dependendo da pressão de pré-expansão (pressões entre 8 MPa e 25 MPa) da mistura de: (i) cristalização antissolvente, promovido pela dissolução de CO<sub>2</sub> na solução líquida, expandindo-o e, por conseguinte, reduzindo o seu poder solvente, (ii) secagem por pulverização de cristalização.

Apesar das nebulizações mais fortes promovidas pelas densidades maiores de CO<sub>2</sub> (em comparação com os de N<sub>2</sub>, nas mesmas condições de pressão e temperatura), os resultados obtidos por Rodrigues e colaboradores (160) mostraram que ambos os fluidos produziram distribuições de tamanho similar (0,1-5 µm). Por outro lado, o efeito de *Joule-Thompson* forte do CO<sub>2</sub> torna difícil controlar a temperatura no precipitador, que é crucial para a eficácia da extração do solvente.

Na investigação de Rodrigues e colaboradores (160) as partículas de lisozima revelaram ser resistente a altas composições de etanol e a consideravelmente altas pressões, no entanto, a sua atividade foi comprometida pelo poder antissolvente do CO<sub>2</sub>.

Portanto, a condição termodinâmica da mistura no estado inicial (antes do bico injetor) é uma abordagem mais abrangente do que considerar apenas algumas variáveis, tais como, a temperatura, pressão e taxa de fluxo, tanto mais que estas variáveis nem sempre podem ser controladas de forma independente e as mudanças modestas são capazes de comutação do mecanismo de precipitação (durante o processamento com CO<sub>2</sub>). No entanto, enquanto a atomização assistida por N<sub>2</sub> produziu esferas em todas as condições experimentais apresentadas por estes pesquisadores, a atomização assistida por SC-CO<sub>2</sub> produziu partículas de duas morfologias diferentes, dependendo das condições de pré-mistura.

Falk e colaboradores (161) investigaram a produção de compósito de microesfera pelo processo SAS. Em sua pesquisa uma solução homogênea de vários solutos e de polímero foi pulverizada em antissolvente SC-CO<sub>2</sub>. A coprecipitação dos solutos e polímero ocorreu e os compósitos de microesferas ou microcápsulas foram formados.

### **3.2.2 Co-precipitação por processos empregando SC-CO<sub>2</sub> como antissolvente**

Os resultados dos estudos RESS auxiliados com co-precipitação envolvendo misturas de fármaco-aditivo revelaram modificação do comportamento, aumento da solubilidade, redução de tamanho de partícula, formação de produto eutético, redução da cristalinidade, conversão para forma amorfa, formação de hidrato, conversão de polimorfo e extração seletiva, assim, sugerindo alteração das propriedades físico-química e mecânica dos princípios ativos farmacêuticos utilizando o FSC com co-precipitação (159).

Shinozaki e colaboradores (151) relataram que o processamento RESS foi aplicado com sucesso a tolbutamida e ao barbital para produzir partículas micronizadas com distribuição de tamanho estreita, sendo que o tamanho das partículas foi o mais afetado pelas condições de extração. Verificaram que para ambos os fármacos a baixa temperatura e a maior pressão na extração resultou em menor tamanho médio de partícula. Foi possível reduzir o tamanho médio de partícula de tolbutamida de 126  $\mu\text{m}$  para 1,64  $\mu\text{m}$  e barbital de 204  $\mu\text{m}$  para 0,69  $\mu\text{m}$ . O efeito de redução de tamanho foi ainda otimizada utilizando barbital através da variação das condições de expansão. O tamanho médio de partícula foi reduzido baixando a temperatura do bico de pulverização, ao reduzir a temperatura da câmara de expansão, aumentando a quantidade de  $\text{CO}_2$  por pulverização, e aumentando a taxa de fluxo dos gases de escape. O tamanho médio de partícula de barbital foi reduzido com êxito para 0,54  $\mu\text{m}$  pela otimização do processo.

### **3.3 Encapsulação e revestimento**

#### **3.3.1 Encapsulação e revestimento por processos empregando SC- $\text{CO}_2$ como solvente**

Kim e colaboradores (162) relataram a microencapsulação de naproxeno usando o processo RESS. O processo RESS também foi utilizado para revestir/encapsular partículas por Mishima e colaboradores (163). No revestimento empregando RESS, o material a ser revestido e o material de revestimento (polímero) são ambos dissolvidos em SC- $\text{CO}_2$  com ou sem um co-solvente. A solução é então liberada por um bico injetor (despressurizada), gerando micropartículas com um revestimento de polímero sobre a superfície.

O processo RESS foi utilizado por Fages e colaboradores (45) para produzir micropartículas poliméricas ou microesferas carregadas com fármacos para aplicações na liberação de fármacos. A velocidade de dissolução da griseofulvina produzida por RESS foi cerca de duas vezes maior do que o material comum micronizado.

Tandya e colaboradores (153) relataram que as partículas de ciclosporina formadas por processo RESS foram estabilizadas para concentrações de fármaco tão elevadas como 6,2 e 37,5  $\text{mg.mL}^{-1}$  em 1,0 e 5,0 % (m/m) de soluções de Tween-80.

Empregando RESS a rápida despressurização da solução supercrítica provoca uma redução substancial do poder dissolvente de  $\text{CO}_2$  levando a uma elevada supersaturação de soluto, precipitação, nucleação e crescimento da partícula. A aplicação do processo RESS é severamente limitada pelo fato dos polímeros, em geral, terem uma solubilidade muito limitada em SC- $\text{CO}_2$  a temperaturas inferiores a 80  $^{\circ}\text{C}$  (164). Além disso, a pressão de

operação no RESS é geralmente acima de 200 *bars* de modo que é menos atrativo economicamente.

Tsutsumi e colaboradores (165) e Wang e colaboradores (166) utilizaram uma combinação do processo RESS e um leito fluidizado de partículas de revestimento. Em suas pesquisas, uma solução do material de revestimento em SC-CO<sub>2</sub>, em vez do solvente orgânico, é pulverizada para o leito fluidizado de partículas a serem revestidas. No entanto, as partículas com menos de 30-50 µm estão na classificação de Geldart<sup>1</sup> (167) dos pós no grupo C, sendo assim difíceis de fluidizar. Assim, o método não pode ser usado para revestimento de partículas ultrafinas (168,18).

Pessey e colaboradores (169,170) também demonstraram o revestimento de partículas utilizando um processo de FSC. Suas investigações envolveram a decomposição térmica de um precursor orgânico e a deposição de cobre sobre a superfície das partículas em SC-CO<sub>2</sub> sob condições de temperatura de até 473 K e pressão de até 190 MPa. No entanto, os seus métodos são menos atraente sob o ponto de vista da segurança e de custo e, provavelmente, não pode ser aplicado para a indústria farmacêutica uma vez que a alta temperatura pode afetar negativamente ou mesmo destruir a maioria dos fármacos (168).

### **3.3.2 Encapsulação e revestimento por processos empregando SC-CO<sub>2</sub> como antissolvente**

A utilização de SC-CO<sub>2</sub> como um antissolvente (processo SAS) pode ser geralmente realizada a pressão inferior a 10 MPa e a temperatura pouco acima da temperatura crítica (304,1 K). Felizmente, o processo SAS é bastante flexível em termos de escolha solvente. Assim, a síntese de partículas ultrafinas revestidas usando SAS tem sido relatada em muitos estudos (47,171,161,172,168).

Uma característica importante do processo de SAS é que o solvente orgânico pode ser quase completamente removido simplesmente por descarga de CO<sub>2</sub> puro. Assim, as partículas secas são produzidas após um passo de extração de CO<sub>2</sub> (descarga) na sequência de alimentação da solução orgânica (173).

Um glicocorticóide foi micronizado pelo processo ASES usando SC-CO<sub>2</sub>, resultando em partículas muito finas. O estudo mostrou a viabilidade de reformular propionato de fluticasona

---

<sup>1</sup> O comportamento de um sólido fluidizado por gases se encaixa em quatro grupos na classificação de Geldart, caracterizados por diferença de densidade e tamanho médio de partícula. As características mais facilmente reconhecíveis dos grupos são: pós do grupo A apresentam expansão da fase densa após exposição à fluidização mínima e antes do ponto de borbulhagem, os do grupo B na borbulhagem à velocidade de fluidização mínima, os do grupo C são todos difíceis de fluidificar e os do grupo D podem formar leitos de jorro estáveis (167).

com o propelente alternativo HFA-227, desse modo, indicando que o tratamento de esteróides, utilizando SC-CO<sub>2</sub> provou ser uma técnica útil para a micronização e revestimento de superfície com um agente tensoativo em etapa única de processo (174).

Young e colaboradores (172) investigaram o encapsulamento de lisozima com um polímero biodegradável por precipitação com um antissolvente de vapor-sobre-líquido, que é uma precipitação modificada com um processo de antissolvente comprimido. Em suas pesquisas, o processo vapor-sobre-líquido de revestimento antissolvente foi usado para encapsular partículas de lisozima de 1-10 µm.

Zordi e colaboradores (68) relataram a melhoria da biodisponibilidade *in vitro* de furosemida, através da redução de tamanho de partícula, bem como a formação de dispersões sólidas (DS), utilizando o Crospovidona como polímero hidrofílico. O SC-CO<sub>2</sub> foi usado como o meio de processamento para estas experiências. A fim de conseguir projetar um processo de CO<sub>2</sub> antissolvente, estudos preliminares de geração de micropartículas de furosemida foram realizadas utilizando a equação de Estado de *Peng Robinson*. Assim, usando a acetona como solvente a pressões de 100 e 200 *bar* e temperatura de 313 *K* produziram as DS.

Apesar da furosemida se recrystalizar por SAS a 100 *bar*, a micronização por meio de SAS a 200 *bar* resultou numa redução significativa do tamanho de partícula dos cristalitos, bem como velocidade de dissolução melhorada em comparação com o fármaco não tratado. Além disso, alterações na forma polimórfica foram observadas nas amostras de 200 *bar*.

A caracterização físico-química das DS de furosemida:crospovidona (1:1 e 1:2 m/m, respectivamente) gerado por SAS revelou a presença do fármaco disperso na forma amorfa na amostra 1:2 (m/m) a 100 *bar* ainda mantendo-se estável após 6 meses. Esta amostra exibe o melhor desempenho na dissolução *in vitro* no fluido gástrico simulado (pH 1,2), em comparação com a mesma DS obtida pelo método tradicional de evaporação solvente.

As interações entre fármaco e polímero não foram observados por Zordi e colaboradores (68). Estes resultados, juntamente com a presença do transportador selecionado, confirmam que o uso da tecnologia de SAS é um meio válido para aumentar a velocidade de dissolução *in vivo* de fármacos fracamente solúveis.

Tabela 3: Obtenção de partículas farmacêuticas utilizando tecnologia FSC.

| Ref.      | Substância                                                                                                                                                     | Formulação                                                                                                                                              | Cossolvente                                                    | Tamanho da partícula                        | FSC                              | Processo           | Escala        |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------|--------------------|---------------|
| (175)     | Linestrenol                                                                                                                                                    | -                                                                                                                                                       | Mentol                                                         | 58-326 nm                                   | CO <sub>2</sub>                  | RESS-SD            | Lab           |
| (176)     | Ácido glicirrízico (AG)                                                                                                                                        | Solução etanólica de AG 20 mg mL <sup>-1</sup>                                                                                                          | Etanol                                                         | ± 128 nm                                    | CO <sub>2</sub>                  | SAS                | Lab           |
| (68)      | Furosemida                                                                                                                                                     | Furosemida, Crospovidona                                                                                                                                | Acetona                                                        | ≤ 6 µm                                      | CO <sub>2</sub>                  | SAS                | Lab           |
| (140)     | Talidomida                                                                                                                                                     | -                                                                                                                                                       | DMSO e acetona                                                 | 1-8µm/<br>0,4-4µm                           | CO <sub>2</sub>                  | SAS-EM             | Lab           |
| (177)     | Sirolimus                                                                                                                                                      | PVP K30, Sirolimus, surfactante                                                                                                                         | Etanol ou etanol:diclorometano                                 | ± 400 nm                                    | CO <sub>2</sub>                  | SAS                | Lab           |
| (178,179) | Ampicilina                                                                                                                                                     | N-metilpirrolidona (NMP)                                                                                                                                | -                                                              | 218-363 nm                                  | CO <sub>2</sub>                  | SAS                | Planta piloto |
| (180)     | Óleo essencial de <i>Atractylodes macrocephala</i> Koidz                                                                                                       | Óleo essencial: lipossomas (1:20)<br>lipossomas (fosfatidilcolina:colesterol; 3:1)                                                                      | Etanol                                                         | ± 173 nm                                    | CO <sub>2</sub>                  | RESS               | Lab           |
| (181)     | Indometacina (IDMC)                                                                                                                                            | IDMC, álcool polivinílico                                                                                                                               | Etanol                                                         | 300-500 nm                                  | CO <sub>2</sub>                  | RESAS              | Lab           |
| (182)     | IDMC                                                                                                                                                           | IDMC, polivinilpirrolidona                                                                                                                              | Acetona:diclorometano (80:20)                                  | ± 100 µm                                    | CO <sub>2</sub>                  | SAS                | Lab           |
| (134)     | IDMC e sacarina                                                                                                                                                | -                                                                                                                                                       | Etanol, acetato de etila, metanol, acetona, THF                | 0,2-5 µm                                    | N <sub>2</sub> e CO <sub>2</sub> | CSS, SAS e ASS     | Lab           |
| (159)     | Aspirina, cafeína, cloranfenicol, clorpropamida, IDMC, α-naftaleno, ácido acético, naproxeno, fenitoína, piroxicam, ácido salicílico, teobromina, tolbutamida. | Doze misturas diferentes de fármaco-aditivo                                                                                                             | -                                                              | -                                           | CO <sub>2</sub>                  | RESS               | Lab           |
| (183)     | Acetaminofen                                                                                                                                                   | Acetaminofen, copolímero acrilato e metacrilato                                                                                                         | Acetona                                                        | -                                           | CO <sub>2</sub>                  | SAS                | Lab           |
| (184)     | Puerarin                                                                                                                                                       | 1° Puerarin (0,4% m/v) + etanol +DCM<br>2° Nanopartículas de puerarin + solução poli(L-lático) (PLLA):DCM; [PLLA 0.5% (m/v), puerarin:PLLA = 1:4 (m/m)] | 1° Etanol:DCM (1:3)<br>2° DCM                                  | ± 675 nm                                    | CO <sub>2</sub>                  | 1° SEDS<br>2° SEDS | Lab           |
| (185)     | Luteína                                                                                                                                                        | Luteína, Ftalato de hidroxipropilmetil celulose (HPMCP)                                                                                                 | Acetona                                                        | 163-219 nm                                  | CO <sub>2</sub>                  | SAS                | Lab           |
| (186)     | Piroxicam (PX)                                                                                                                                                 | Emulsão O/A [poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) + PX + água + AE]+(água + PVA + AE)                                                        | Acetato de etila (AE) foi extraído pela técnica SAS            | 1-3 µm                                      | CO <sub>2</sub>                  | SAS                | Lab           |
| (187)     | Insulina                                                                                                                                                       | Insulina:N-trimetil quitosana                                                                                                                           | Solução ácida de água:DMSO                                     | 6-10 µm                                     | CO <sub>2</sub>                  | SAS                | Lab           |
| (188,79)  | Rifampicina                                                                                                                                                    | Rifampicina, Poli (L-ácido láctico)                                                                                                                     | Cloreto de metileno                                            | < 5 µm                                      | CO <sub>2</sub>                  | SAS                | Lab           |
| (49)      | Acetatos de ítrio (AI), acetato samário (AS), acetato de celulose (AE), rifampicina (Rif), amoxicilina (Amo), dextran-40, Álcool polivinílico (PVA)            | AE:DMSO, AI:DMSO, Dextran-40:DMSO, AS:DMSO, Amo:NMP, Rif:DMSO, PVA:DMSO                                                                                 | Dimetil sulfoxido (DMSO), acetona, N-metil 2-pirrolidona (NMP) | Diâmetros médios variando entre 45 e 150 nm | CO <sub>2</sub>                  | SAS                | Planta piloto |



| Ref.  | Substância                                                                   | Formulação                                                                                             | Cossolvente                                | Tamanho da partícula                       | FSC                                              | Processo     | Escala             |
|-------|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------|--------------------|
| (153) | Ciclosporina A                                                               | -                                                                                                      | -                                          | > 1 µm                                     | CO <sub>2</sub>                                  | RESS e PGSS  | Lab                |
| (151) | Tolbutamida (TOL) e barbitol (BAR)                                           | -                                                                                                      | Etanol                                     | TOL 1,64µm<br>BAR 0,69µm                   | CO <sub>2</sub>                                  | RESS         | Lab                |
| (83)  | Miconazol                                                                    | Fosfatidilcolina, colesterol, Poloxamer 407                                                            | Cloreto de metileno, metanol, água         | 2,7–9,4 µm                                 | CO <sub>2</sub>                                  | ASES         | Lab                |
| (52)  | Fenitoína                                                                    | -                                                                                                      | Mentol                                     | 75-120 nm                                  | CO <sub>2</sub>                                  | RESS-SC      | Lab                |
| (53)  | Acido 2-aminobenzoico                                                        | -                                                                                                      | Mentol                                     | ~80 nm                                     | CO <sub>2</sub>                                  | RESS-SC      | Lab                |
| (46)  | Indometacina e cetoprofeno                                                   | Ácido poli(ácido láctico/glicólico) ou Eudragit RS:Fármaco: água saturada de acetato de etilo:PVA      | -                                          | 0,2–1,0 µm                                 | CO <sub>2</sub>                                  | SFEE         | Lab                |
| (189) | Paclitaxel                                                                   | Nanossomas fosfolipídicos de fosfatidilcolina, colesterol e paclitaxel, Taxosomes. <sup>TM</sup>       | Etanol                                     | 62-69 nm                                   | NO <sub>2</sub><br>C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> | SFS-CFN      | Non clinical phase |
| (190) | Dicloridrato de cetirizina                                                   | β-ciclodextrina, Cetirizina                                                                            | DMSO                                       | 0,3–4,2 µm                                 | CO <sub>2</sub>                                  | SAS          | Lab                |
| (155) | Budesonida                                                                   | -                                                                                                      | Acetona                                    | 1–2 µm                                     | CO <sub>2</sub>                                  | SEDS         | Lab                |
| (18)  | Nanopartículas de sílica de diferentes tamanhos, hidrofílicas e hidrofóbicas | Eudragit <sup>®</sup> RL 100, Sílicas (COSMO 55, Aerosil <sup>®</sup> 90 e Aerosil <sup>®</sup> R 972) | Acetona                                    | 16–20 nm                                   | CO <sub>2</sub>                                  | SAS          | Lab                |
| (51)  | Eflucimibe                                                                   | Eflucimibe:etanol,<br>Eflucimibe:DMSO                                                                  | Etanol, DMSO                               | -                                          | CO <sub>2</sub>                                  | RESS,<br>SAS | Lab                |
| (126) | Griseofulvina                                                                | -                                                                                                      | Água, metanol e acetona                    | 0,5-2,5µm                                  | CO <sub>2</sub>                                  | SAA          | Lab                |
| (191) | Artemisinin                                                                  | PVPK25: Artemisinin                                                                                    | Diclorometano                              | 4.1 ± 0.2 µm                               | CO <sub>2</sub>                                  | RESS         | Lab                |
| (192) | Poli(L-ácido láctico)                                                        | -                                                                                                      | Cloreto de metileno<br>Álcool isopropílico | 193 ± 22 nm                                | CO <sub>2</sub>                                  | PCA          | Lab                |
| (88)  | Lisozima                                                                     | Lisozima:DMSO                                                                                          | DMSO                                       | 0,36-2,0 µm                                | CO <sub>2</sub>                                  | SAS          | Lab                |
| (193) | Hidrocortisona                                                               | -                                                                                                      | Acetona ou metanol                         | -                                          | CO <sub>2</sub>                                  | SEDS         | Lab                |
| (101) | Insulina                                                                     | -                                                                                                      | DMSO                                       | 2-3µm                                      | CO <sub>2</sub>                                  | PCA          | Lab                |
| (194) | Rifampicina                                                                  | Rifampicina/DMSO (10 mg/mL)                                                                            | DMSO                                       | 0,4-1 µm (≥ 12 MPa)<br>2,5-5 µm (9-11 MPa) | CO <sub>2</sub>                                  | SAS          | Lab                |
| (87)  | Griseofulvina                                                                | -                                                                                                      | Diclorometano ou Tetrahydrofurano          | ± 130 nm                                   | CO <sub>2</sub>                                  | SAS-EM       | Lab                |

## Conclusão

A tecnologia de fluido supercrítico tem muito a contribuir com a obtenção de partículas farmacêuticas em relação aos processos atualmente utilizados, proporcionando processos produtivos com menor número de etapas e diminuição ou eliminação do uso de solventes orgânicos podendo ser chamada de tecnologia verde. As modificações nos processos SAS e RESS trazem grande contribuição para a otimização dos processos. A área farmacêutica na obtenção de partículas sólidas e sistemas de liberação de fármacos podem ser beneficiados com os processos utilizando fluido supercrítico.

## Referências

1. Berche B, Henkel M, Kenna R. Critical phenomena: 150 years since Cagniard de la Tour. *J. Phys. Studies*. 2009; 13: p. 3201.
2. Hannay JB, Horgarth J. On the solubility of solids in gases. *Proc. R. Soc. London*. 1879; 30: p. 178-188.
3. Worthy W. Supercritical fluids offer improved separations. *Chemical and Engineering News*. 1981; 59(31): p. 16-17.
4. DeSimone JM. Practical approaches to green solvents. *Science*. 2002 Aug; 297: p. 799–803.
5. Jung J, Perrut M. Particle design using supercritical fluids: literature and patent survey. *J. Supercrit. Fluids*. 2001; 20: p. 179-219.
6. Krukonis VJ. Supercritical Fluid Nucleation of Difficult-to-Comminute Solids. In *Annual Meeting AIChE*; 1984 Nov; San Francisco: Annual Meeting AIChE. p. 11.
7. Smith RD, Wash R, inventors; Supercritical fluid molecular spray film deposition and powder formation. patent US Patent 4,582,731. 1986 Abr 15.
8. Petersen RC, Matson DW, Smith RD. Rapid precipitation of low vapor pressure solids from supercritical fluid solutions: the formation of thin films and powders. *J. Am. Chem. Soc.* 1986: p. 2100–2102.
9. Matson DW, Fulton JL, Petersen RC, Smith RD. Rapid expansion of supercritical fluid solutions: Solute formation of powders, thin films, and fibers. *Nnd. Eng. Chem. Res.* 1987; 26: p. 2298–2306.
10. Matson DW, Petersen RC, Smith RD. Production of powders and films from supercritical solutions. *J. Mater. Sci.* 1987; 22: p. 1919–1928.
11. Smith RD, Wash R, inventors; Supercritical fluid molecular spray thin films and fine powders. patent US Patent 4,734,451. 1988 Mar 29.
12. Castor TP, Hong GT, inventors; Supercritical fluid disruption of and extraction from microbial cells. patent US Patent 5,380,826. 1995 Jan 10.

13. Subramaniam B, Saim S, Rajewski RA, Stella V, inventors; Methods for a particle precipitation and coating using near-critical and supercritical antisolvents. patent US Patent 5,833,891. 1998 Nov 10.
14. Rouanet SF, McGovern WE, Cao W, Moses JM, Carrillo AL, Klotz IM, inventors; Methods for forming particles using a supercritical fluid. patent US Patent 5,864,923. 1999 Feb 2.
15. Subramaniam B, Saim S, Rajewski RA, Stella V, inventors; Methods for particle micronization and nanonization by recrystallization from organic. patent US Patent 5,874,029. 1999 Feb 23.
16. Gupta RB, Chattopadhyay P, inventors; Method of forming nanoparticles and microparticles of controllable size using supercritical fluids with enhanced mass transfer. patent US Patent 6,620,351 B2. 2003 Set 16.
17. Shekunov BY, Chattopadhyay P, Seitzinger JS, inventors; Methods and apparatus for producing composite particles using supercritical fluid as plasticizing and extracting agent. patent US Patent 7,449,136 B2. 2008 Nov 11.
18. Wang Y, Pfeffer R, Dave R, inventors; Polymer coating encapsulation of nanoparticles using a supercritical anti-solvent process. patent US Patent 7,537,803 B2. 2009 Mai 26.
19. Yasuji T, Takeuchi H, Kawashima Y. Particle design of poorly water-soluble drug substances using supercritical fluid technologies. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2008; 60: p. 388–398.
20. Moribe K, Tozuka Y, Yamamoto K. Supercritical carbon dioxide processing of active pharmaceutical ingredients for polymorphic control and for complex formation. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2008; 60: p. 328-338.
21. Chrastil J. Solubility of solids and liquids in supercritical gases. *J. Phys. Chem.* 1982; 86(15): p. 3016-3021.
22. Maul AA. Fluidos supercríticos - Situação atual e futuro da extração supercrítica. *Biotecnologia Cienc. Desenvolv.* 1999; 11: p. 42–46.
23. Chan HK, Kwok PCL. Production methods for nanodrug particles using the bottom-up approach. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2011; 63: p. 406–416.
24. Weber LA. Some vapor pressure and P,V,T data on nitrogen in the range 65 to 140 K. *J. Chem. Thermodyn.* 1970; 2: p. 839-846.
25. Jacobsen RT, Stewart RB, Jahangiri M. Thermodynamic properties of nitrogen from the freezing line to 2000 K at pressures to 1000 MPa. *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 1986; 15(2): p. 735-909.
26. NIST. NIST Chemistry Webbook. [Online].; 2012 [cited 2012 12 28. Available from: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>.
27. Carrilho E, Tavares MCH, Lanças FM. Supercritical fluid in analytical chemistry. I. Supercritical fluid chromatography: Thermodynamic definitions. *Quim. Nova.* 2001; 24(4): p. 509-515.
28. Ohgaki K, Umezono S, Katayama T. Pressure-density-temperature (p-ρ-T) relations of

- fluoroform, nitrous oxide, and propene in the critical region. *J. Supercrit. Fluids*. 1990; 3: p. 78-84.
29. Reid RC, Prausnitz JM, Poling BE. *The Properties of Gases and Liquids*. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 1987.
  30. Bominaar SARC, Biswas SN, Trappeniers NJ, Ten Seldam CA. (p, Vm, T) properties of methyl fluoride in the (gas + liquid) critical region. *J. Chem. Thermodyn.* 1987; 19: p. 959.
  31. Brunner E. Fluid Mixtures at high pressures VI. Phase separation and critical phenomena in 18 (n-alkane + ammonia) and 4 (n-alkane \_methanol) mixtures. *J. Chem. Thermodyn.* 1988; 20: p. 273.
  32. Green DW, Perry RH. *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. [Online]. New York: McGraw-Hill; 2008 [cited 2012 12 29. Available from: [http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?\\_EXT\\_KNOVEL\\_DISPLAY\\_bookid=2203&VerticalID=0](http://www.knovel.com/web/portal/browse/display?_EXT_KNOVEL_DISPLAY_bookid=2203&VerticalID=0).
  33. da Silva FM, de Lacerda SB, Jones Junior J. Desenvolvimento sustentável e química verde. *Quim. Nova*. 2005; 28: p. 103-110.
  34. Yaws CL. *Chemical properties handbook: Physical, thermodynamic, environmental, transport, safety, and health related properties for organic and inorganic chemicals*. 1st ed. New York: McGraw-Hill; 1999.
  35. Anastas PT, Warner J. *Green Chemistry Theory and Practice* Oxford: Oxford University Press; 1998.
  36. Poliakoff M, Fitzpatrick JM, Farren TR, Anastas PT. Green Chemistry: Science and Politics of Change. *Science*. 2002; 297: p. 807-810.
  37. Phillips EM, Stella VJ. Rapid expansion from supercritical solutions application to pharmaceutical processes. *Int. J. Pharm.* 1993; 94: p. 1-10.
  38. das Neves J, Amiji MM, Bahia MF, Sarmiento B. Nanotechnology-based systems for the treatment and prevention of HIV/AIDS. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2010; 62: p. 458-477.
  39. McHugh M, Krukonis V. *Supercritical Fluid Extraction Principles and Practice*. 2nd ed. Boston: Butterworth-Heinemann; 1994.
  40. Türk M. Formation of small organic particles by RESS: experimental and theoretical investigations. *J. Supercrit. Fluids*. 1999; 15: p. 79-89.
  41. Türk M, Hils P, Helfgen B, Schaber K, Martin HJ, Wahl MA. Micronization of pharmaceutical substances by rapid expansion of supercritical solutions (RESS): a promising method to improve bioavailability of poorly soluble pharmaceutical agents. *J. Supercrit. Fluids*. 2002; 22: p. 75-84.
  42. Kayrak D, Akman U, Hortaçsu Ö. Micronization of ibuprofen by RESS. *J. Supercrit. Fluids*. 2003; 26: p. 17-31.
  43. Huang Z, Sun GB, Chiew YC, Kawi S. Formation of ultrafine aspirin through rapid expansion of supercritical solutions (RESS). *Powder Technol.* 2005; 160: p. 127-134.

44. Huang J, Moriyoshi T. Fabrication of fine powders by RESS with a clearance nozzle. *J. Supercrit. Fluids*. 2006; 37: p. 292-297.
45. Fages J, Lochard H, Letourneau JJ, Sauceau M, Rodier E. Particle generation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology. *Powder Technology*. 2004; 141: p. 219-226.
46. Chattopadhyay P, Huff R, Shekunov BY. Drug encapsulation using supercritical fluid extraction of emulsions. 2006; 95(3): p. 667-679.
47. Reverchon E, Della Porta G, De Rosa I, Subra P, Letourneur D. Supercritical antisolvent micronization of some biopolymers. *J. Supercrit. Fluids*. 2000; 18: p. 239-245.
48. Sheth P, Sandhu H, Singhal D, Malick W, Shah N, Kislalioglu MS. Nanoparticles in the pharmaceutical industry and the use of supercritical fluid technologies for nanoparticle production. *Curr. Drug Deliv.* 2012 May; 9(3): p. 269-284.
49. Reverchon E, De Marco I, Torino E. Nanoparticles production by supercritical antisolvent precipitation: A general interpretation. *J. Supercrit. Fluids*. 2007: p. p. 126–138.
50. Perrut M, Clavier JY. Supercritical fluid formulation: process choice and scale-up. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2003; 42: p. 6375-6383.
51. Sauceau M, Letourneau JJ, Freiss B, Richon D, Fages J. Solubility of eflucimibe in supercritical carbon dioxide with or without a co-solvent. *J. Supercrit. Fluids*. 2004; 31: p. 133-140.
52. Thakur R, Gupta RB. Formation of phenytoin nanoparticles using rapid expansion of supercritical solution with solid cosolvent (RESS-SC) process. *Int. J. Pharm.* 2006a; 308: p. 190-199.
53. Thakur R, Gupta RB. Rapid expansion of supercritical solution with solid cosolvent (RESS-SC) process: Formation of 2-aminobenzoic acid nanoparticle. *J. Supercrit. Fluids*. 2006b; 37: p. 307-315.
54. Sun YP, Rollins HW. Preparation of polymer-protected semiconductor nanoparticles through the rapid expansion of supercritical fluid solution. *Chem. Phys. Lett.* 1998; 288: p. 585-588.
55. Sun YP, Guduru R, Lin F, Whiteside T. Preparation of nanoscale semiconductors through the rapid expansion of supercritical solution (RESS) into liquid solution. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2000; 39: p. 4663-4669.
56. Sun YP, Rollins HW, Bandara J, Meziani MJ, Bunker CE. Preparation and processing of nanoscale materials by supercritical fluid technology. In Sun YP, editor. *Supercritical Fluid Technology in Materials Science and Engineering: Synthesis, Properties, and Applications*. New York: Marcel Dekker; 2002. p. 491.
57. Sun YP, Meziani MJ, Pathak P, Qu L. Polymeric nanoparticles from rapid expansion of supercritical fluid solution. *Chem. Eur. J.* 2005; 11: p. 1366-1373.
58. Meziani MJ, Pathak P, Beacham F, Allard LF, Sun YP. Nanoparticle formation in rapid expansion of water-in-supercritical carbon dioxide microemulsion into liquid solution.

- J. Supercrit. Fluids. 2005; 34: p. 91-97.
59. Pathak P, Meziani MJ, Desai T, Sun YP. Formation and stabilization of ibuprofen nanoparticles in supercritical fluid processing. J. Supercrit. Fluids. 2006; 37: p. 279-286.
  60. Pathak P, Meziani MJ, Desai T, Sun YP. Nanosizing drug particles in supercritical fluid processing. J. Am. Chem. Soc. 2004; 126: p. 10842-10843.
  61. Pathak P, Meziani MJ, Sun YP. Supercritical fluid technology for enhanced drug delivery. Expert Opin. Drug Deliv. 2005; 2: p. 747-761.
  62. Young TJ, Mawson S, Johnston KP. Rapid expansion from supercritical to aqueous solution to produce submicron suspensions of water-insoluble drugs. Biotechnol. Prog. 2000; 16: p. 402-407.
  63. Young TJ, Johnston KP, Pace GW, Mishra AK. Phospholipid-stabilized nanoparticles of cyclosporine A by rapid expansion from supercritical to aqueous solution. AAPS Pharm. Sci. Tech. 2003; 5(1): p. 70-85.
  64. Debenedetti PG. Supercritical Fluids as Particle Formation Media. In Kiran E, Levelt Sengers JMH, editors. Supercritical Fluids: Fundamentals for Application. 719729th ed. Boston: Kluwer Academic Publisher; 1994.
  65. Kikic I, Vecchione F. Supercritical impregnation of polymers. Curr. Opin. Solid State Mater. Sci. 2003; 7(4-5): p. 399-405.
  66. Knez Z. Particle formation using supercritical fluids: A short review. CI&CEQ. 2006; 12(3): p. 141-146.
  67. Knez Z, Weidner E. Particles formation and particle design using supercritical fluids. Curr. Opin. Solid State Mater. Sci. 2003; 7: p. 353-361.
  68. De Zordi N, Moneghin M, Kikic I, Grassi M, Castillo AEDR, Solinas D, *et al.* Applications of supercritical fluids to enhance the dissolution behaviors of furosemide by generation of microparticles and solid dispersions. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2012; 81: p. 131-141.
  69. Shariati A, Peters CJ. Recent developments in particle design using supercritical fluids. Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.. 2003; 7: p. 371-383.
  70. Reverchon E, Adami R. Nanomaterials and supercritical fluids. J. Supercrit. Fluids. 2006; 37: p. 1-22.
  71. Reverchon E, Torino E, Dowdy S, Brauer A, Leipertz A. Interactions of phase equilibria, jet fluid dynamics and mass transfer during supercritical antisolvent micronization. Chem. Eng. J. 2010; 156: p. 446-458.
  72. Yeo SD, Kiran E. Formation of polymer particles with supercritical fluids: a review. J. Supercrit. Fluids. 2005; 34 : p. 287-308.
  73. Krukonis VJ, Gallagher PM, Coffey MP, inventors; Gas anti-solvent recrystallization process. patent US Patente 5,360,478. 1994 Nov 1.
  74. Park SJ, Jeon SY, Yeo SD. Recrystallization of a pharmaceutical compound using

- liquid and supercritical antisolvents. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2006; 45: p. 2287-2293.
75. Sacha GA, Schmitt WJ, Nail SL. Identification of critical process variables affecting particle size following precipitation using a supercritical fluid. *Pharm. Dev. Technol.* 2006; 11: p. 187-194.
  76. Miguel F, Martin A, Gamse T, Cocero MJ. Supercritical anti-solvent precipitation of lycopene effect of the operating parameters. *J. Supercrit. Fluids.* 2006; 36: p. 225-235.
  77. Reverchon E, De Marco I. Supercritical antisolvent precipitation of cephalosporins. *Powder Technol.* 2006; 164: p. 139-146.
  78. Yeo SD, Kiran E. Formation of polymer particles with supercritical fluids: a review. *J. Supercrit. Fluids.* 2005; 34: p. 287-308.
  79. Park SJ, Yeo SD. Recrystallization of caffeine using gas antisolvent process. *J. Supercrit. Fluids.* 2008; 47: p. 85-92.
  80. Müller BW, Fischer W, inventors; Verfahren zur Herstellung einer mindestens einen Wirkstoff und einen Träger umfassenden Zubereitung. patent German Patent Appl. No. DE 3,744,329. 1989.
  81. Bleich J, Müller BW, Waßmus W. Aerosol solvent extraction system - a new microparticle production technique. *Int. J. Pharm.* 1993; 97: p. 111-117.
  82. Yu W, Xia F, Jin H, Lin C, Zhao Y, Jiang S, *et al.* Production of submicroparticles of  $\beta$ -sitosterol using an aerosol solvent extraction system. *Chin. J. Chem. Eng.* 2008 December; 16(6): p. 956-960.
  83. Kunastitchai S, Pichert L, Sarisuta N, Müller BW. Application of aerosol solvent extraction system (ASES) process for preparation of liposomes in a dry and reconstitutable form. *Int. J. Pharm.* 2006 Jun; 316(1-2): p. 93-101.
  84. Perrut M. Supercritical fluid applications: industrial developments and economic issue. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2000; 39: p. 4531-4535.
  85. Sanganwar GP, Sathigari S, Babu RJ, Gupta RB. Simultaneous production and co-mixing of microparticles of nevirapine with excipients by supercritical antisolvent method for dissolution enhancement. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2010; 39: p. 164-174.
  86. Sathigari SK, Ober CA, Sanganwar GP, Gupta RB, Babu RJ. Single-step preparation and deagglomeration of itraconazole microflakes by supercritical antisolvent method for dissolution enhancement. *J. Pharm. Sci.* 2011 Jul; 100(7): p. 2952-2965.
  87. Chattopadhyay P, Gupta RB. Production of griseofulvin nanoparticles using supercritical CO<sub>2</sub> antisolvent with enhanced mass transfer. *Int. J. Pharm.* 2001; 228: p. 19-31.
  88. Chattopadhyay P, Gupta RB. Protein nanoparticles formation by supercritical antisolvent with enhanced mass transfer. 2002; 48(2): p. 235-243.
  89. Hanna MH, York P, inventors; Method and apparatus for the formation of particles. patent US Patent 20020073511A1. 2002 Jun 20.
  90. York P, Hanna MH. Particle engineering by supercritical fluid technologies for powder inhalation drug delivery. In *Respiratory Drug Delivery V. Proceedings of the*

- Conference on Respiratory Drug Delivery; 1996; Phoenix: Arizona. p. 231–239.
91. Palakodaty S, York P. Phase behavioral effects on particle formation processes using supercritical fluids. *Pharm. Res.* 1999; 16: p. 976-985.
  92. Edward AD, Shekunov BY, Kordikowski A, Forbes RT, York P. Crystallization of pure anhydrous polymorphs of carbamazepin by solution enhanced dispersion with supercritical fluids (SEDS). *J. Pharm. Sci.* 2001; 90: p. 1115-1124.
  93. Juppo AM, Boissier C, Khoo C. Evaluation of solid dispersion particles prepared with SEDS. *Int. J. Pharm.* 2003; 250: p. 385-401.
  94. Tabernero A, del Valle EMM, Galán MA. Precipitation of tretinoin and acetaminophen with solution enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS). Role of phase equilibria to optimize particle diameter. *Powder Technology.* 2012 Feb; 217: p. 177-188.
  95. Kang Y, Yin G, Ouyang P, Huang Z, Yao Y, Liao X, *et al.* Preparation, characterization, and in vitro release investigation of lutein/zein nanoparticles via solution enhanced dispersion by supercritical fluids. *J. Colloid Interface Sci.* 2008 Jun; 322(1): p. 87-94.
  96. Martín A, Cocero MJ. Numerical modelling of jet hydrodynamics, mass transfer and crystallization kinetics in the supercritical antisolvent (SAS) process. *J. Supercrit. Fluids.* 2004; 32: p. 203-219.
  97. Reverchon E, Torino E, Dowy S, Brauer A, Leipertz A. Interactions of phase equilibria, jet fluid dynamics and mass transfer during supercritical antisolvent micronization. *Chem. Eng. J.* 2010; 156: p. 446-458.
  98. Reverchon E, De Marco I. Supercritical antisolvent micronization of Cefonicid: thermodynamic interpretation of results. *J. Supercrit. Fluids.* 2004a; 31: p. 207-215.
  99. Franceschi E, Kunita MH, Tres MV, Rubira AF, Muniz EC, Corazza ML, *et al.* Phase behaviour and process parameters effects on the characteristics of precipitated theophylline using carbon dioxide as antisolvent. *J. Supercrit. Fluids.* 2008; 44: p. 8-20.
  100. Rodrigues MA, Padrela L, Geraldés V, Santos J, Matos HA, Azevedo EG. Theophylline polymorphs by atomization of supercritical antisolvent induced suspensions. *J. Supercrit. Fluids.* 2011; 58: p. 303-312.
  101. Snavely WK, Subramaniam B, Rajewski RA, Defelippis MR. Micronization of insulin from halogenated alcohol solution using supercritical carbon dioxide as an antisolvent. *J. Pharm. Sci.* 2002; 91: p. 2026-2039.
  102. Shekunov BY, Chattopadhyay P, Seitzinger J, Huff R. Nanoparticles of poorly water-soluble drugs prepared by supercritical fluid extraction of emulsions. *Pharm. Res.* 2006; 23: p. 196-204.
  103. Weidner E, Knez Z, Novak Z, inventors; A Process and Equipment for Production and Fractionation of Fine Particles from Gas Saturated Solutions. patent WO 95/21688. 1994.
  104. Brunner G. Applications of supercritical fluids. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2010;



- 1: p. 321-342.
105. Weidner E, Kilzer A, Petermann M, Prob A, Lucas K, Stepanski R, inventors; Verfahren zur Erzeugung von Polyurethanpartikeln. patent Deutsches Patent DE 10040551.7. 2000 Aug. 15.
  106. Nunes AVM, Duarte CMM. Dense CO<sub>2</sub> as a solute, co-solute or co-solvent in particle formation processes: A review. *Materials*. 2011; 4(11): p. 2017-2041.
  107. Weidner E. High pressure micronization for food applications. *J. Supercrit. Fluids*. 2009; 47: p. 556-565.
  108. Meterc D, Petermann M, Weidner E. Drying of aqueous green tea extracts using a supercritical fluid spray process. *J. Supercrit. Fluids*. 2008; 45: p. 253-259.
  109. Meterc D, Petermann M, Weidner E. Extraction of green tea and drying with a high pressure spray process. *Hem. Ind.* 2007; 61: p. 222-228.
  110. Weidner E, Steiner R, Dirscherl H, Weinreich B, inventors; Verfahren zur Herstellung eines pulverförmigen Produktes aus einem flüssigen Stoff oder Stoffgemisch. patent European Patent EP 9705484. 1997 Out 6.
  111. Petermann M, Weidner E, Grüner S, Weinreich B. CPF - Concentrated powder form - A high pressure spray agglomeration technique. In *Proceedings of the Spray Drying '01 and Related Processes*; 2001; Dortmund: Germany.
  112. Grüner S. Entwicklung eines Hochdrucksprühverfahrens zur Herstellung hochkonzentrierter, flüssigkeitsbeladener Pulver. Versailles: PhD thesis, University of Erlangen; 1999.
  113. Grüner S, Otto F, Weinreich B. CPF-technology—a new cryogenic spraying process for pulverization of liquid. In *Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids*; 2003 ; Versailles. p. 1935.
  114. Lankes H, Sommer K, B. Weinreich. Sprühbeladung bis ans Maximum. *Lebensmittel technik*. 2001; 6: p. 50-52.
  115. Lankes H. Maximale Flüssigkeitsaufnahmekapazität von dispersen Trägerstoffen beim Beladen und Tränken. Munich: PhD thesis, University of Munich; 2002.
  116. Otto F, Grüner S, Weinreich B. Optimization of CPF-technology for the pulverization of flavours. In *Posterpräsentation, in: Eurocaft 2001 – European Conference on Advanced Technology for Safe and High Quality Foods*; 2001; Berlin.
  117. Grüner-Richter S. Pulverförmige Fette und Öle. In *Fachsymposium – Neue Sprühverfahren zur Partikelherstellung in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie*; 2007; Oberhausen : Fraunhofer Institut Umsicht.
  118. Petermann M, Weidner E, Blatter K, Simmrock HU. Manufacture of powder coatings by spraying of gas saturated melts. In *Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids*; 2003; Versailles: France. p. 28-30.
  119. Weidner E, Petermann M, Blatter K, Rekowski V. Manufacture of powder coatings by spraying of gas-enriched melts. *Chem. Eng. Technol.* 2001; 24: p. 529-533.

120. Padrela L, Rodrigues MA, Velaga SP, Fernandes AC, Matos HA, de Azevedo EG. Screening for pharmaceutical cocrystals using the supercritical fluid enhanced atomization process. *J. Supercrit. Fluids*. 2010; 53: p. 156-164.
121. Sievers RE, Miles BA, Sellers SP, Milewski PD, Kusek KD. New process for manufacture of 1-micron spherical drug particles by CO<sub>2</sub>-assisted nebulization of aqueous solutions. *Resp. Drug Deliv*. VI. 1998; 1: p. 417-420.
122. Sievers RE, Huang ETS, Villa JA, Kawamoto JK, Evans MM, Brauner PR. Low temperature manufacturing of fine pharmaceutical powders with supercritical fluid aerosolization in bubble dryer. *Pure Appl. Chem*. 2001; 73: p. 1299-1303.
123. Sievers RE, Huang ETS, Villa JA, Walsh TR, Meresman HV, Liang CD, *et al*. Rapid gentle drying using dense carbon dioxide to form fine dry powders. *Resp. Drug Deliv*. VIII. 2002; 2: p. 675-678.
124. Sellers SP, Clark GS, Sievers RE, Carpenter JF. Dry powders of stable protein formulations from aqueous solutions prepared using supercritical CO<sub>2</sub>-assisted aerosolization. *J. Pharm. Sci*. 2001; 90: p. 785-797.
125. Sievers RE, Sellers SP, Carpenter JF, inventors; Supercritical fluid-assisted nebulization and bubble drying. patent US Patent 6,630,121. 2003 Oct 7.
126. Reverchon E, Della Porta G, Spada A, Antonacci A. Griseofulvin micronization and dissolution rate improvement by supercritical assisted atomization. *J. Pharm. Pharmacol*. 2004b Nov; 56(11): p. 1379-1387.
127. Cape SP, Villa JA, Huang ETS, Yang TH, Carpenter JF. Preparation of active proteins, vaccines and pharmaceuticals as fine powders using supercritical or near-critical fluids. *Pharm. Res*. 2008 Sep; 25(9): p. 1967-1990.
128. Sievers RE, Sellers SP, Carpenter JF, inventors; Supercritical fluid-assisted nebulization and bubble drying. patent US Patent 6,630,121. 2003 Oct 7.
129. Sievers RE, Huang ETS, Villa JA, Engling G, Brauer PR. Micronization of water-soluble or alcohol-soluble pharmaceuticals and model compounds with a low-temperature Bubble Dryer®. *J. Supercrit. Fluids*. 2003; 26: p. 9-16.
130. Sievers RE, Quinn BP, Cape SP, Searles JA, Braun CS, Bhagwat P, *et al*. Near-critical fluid micronization of stabilized vaccines, antibiotics and anti-virals. *J. Supercrit. Fluids*. 2007: p. p. 385-391.
131. Ventosa N, Sala S, Veciana J. Depressurization of an expanded liquid organic solution (DELOS): A new procedure for obtaining submicron- or micron-sized crystalline particles. *Cryst. Growth Des*. 2001; 1: p. 299-303.
132. Ventosa N, Veciana J, Rovira C, Sala S, inventors; Procedimiento para la precipitacion de particulas solidas. patent Spanish Patent 2170008 B1. 2000 Aug 25.
133. Ventosa N, Sala S, Veciana J. Depressurization of an expanded liquid organic solution (DELOS): a new procedure for obtaining submicron- or micron-sized crystalline particles. *Cryst. Growth Des*. 2001; 1: p. 299-303.
134. Padrela L, Rodrigues MA, Velaga SP, Matos HA, Azevedo EGd. Formation of indomethacin-saccharin cocrystals using supercritical fluid technology. *Eur. J. Pharm.*

- Sci. 2009; 38: p. 9-17.
135. Yeo SD, Lim GB, Debenedetti PG, Bernstein H. Formation of micro-particulate protein powders using a supercritical fluid antisolvent. *Biotechnol. Bioeng.* 1993; 41: p. 341-346.
  136. Reverchon E, De Marco I, Caputo G, Della Porta G. Pilot scale micronization of amoxicillin by supercritical antisolvent precipitation. *J. Supercrit. Fluids.* 2003a; 26: p. 1-7.
  137. Reverchon E, Caputo G, Corraera S, Cesti P. Synthesis of titanium hydroxide nanoparticles in supercritical carbon dioxide on the pilot scale. *J. Supercrit. Fluids.* 2003b; 26: p. 253-261.
  138. Warwick B, Dehghani F, Foster NR, Biffin JR, Regtop HL. Synthesis, purification, and micronisation of pharmaceuticals using the gas anti-solvent technique. *J. Ind. Eng. Chem. Res.* 2000; 39(12): p. 4571-4579.
  139. Warwick B, Dehghani F, Foster NR, Biffin JR, Regtop HL. Micronisation of copper indomethacin using gas anti-solvent processes. *J. Ind. Eng. Chem. Res.* 2002; 41(8): p. 1993-2004.
  140. Jin H, Hemingway M, Gupta RB, Fei Xia YZ. Preparation of thalidomide nano-flakes by supercritical antisolvent with enhanced mass transfer. *Particuology.* 2012 Feb; 10: p. 17-23.
  141. Sekhon BS. Supercritical fluid technology: An overview of pharmaceutical applications. *Int. J. PharmTech Res.* 2010; 2(1): p. 810-826.
  142. Bakhbakhi Y, Charpentier PA, Rohani S. Experimental study of the GAS process for producing microparticles of beclomethasone-17,21-dipropionate suitable for pulmonary delivery. *Int. J. Pharm.* 2006; 309: p. 71-80.
  143. Byrappa K, Ohara S, Adschiri T. Nanoparticles synthesis using supercritical fluid technology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008; 60: p. 299-327.
  144. Cansell F, Aumonier C. Design of functional nanostructured materials using supercritical fluids. *J. Supercrit. Fluids.* 2009; 47: p. 508-516.
  145. Chaud MV, Tamascia P, Lima AC, Paganelli MO, Gremião MPD, Freitas Od. Solid dispersion with hydrogenated castor oil increase solubility, dissolution rate and intestinal absorption of praziquantel. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2010; 46: p. 474-481.
  146. Srinarong P, de Waard H, Frijlink HW, Hinrichs WLJ. Improved dissolution behavior of lipophilic drugs by solid dispersions: the production process as starting point for formulation considerations. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2011; 8(9): p. 1121-1140.
  147. Mishima K. Biodegradable particle formation for drug and gene delivery using supercritical fluid and dense gas. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2008; 60: p. 411-432.
  148. Machida H, Takesue M, Smith Jr RL. Green chemical processes with supercritical fluids. *J. Supercrit. Fluids.* 2011; 60: p. 2-15.
  149. Davies OR, Lewis AL, Whitaker MJ, Tai H, Shakesheff KM, Howdle SM. Applications of supercritical CO<sub>2</sub> in the fabrication of polymer systems for drug delivery and tissue

- engineering. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2008; 60: p. 373-387.
150. Pasquali I, Bettini R. Are pharmaceuticals really going supercritical? *Int. J. Pharm.* 2008; 364: p. 176-187.
  151. Shinozaki H, Oguchi T, Suzuki S, Aoki K, Sako T, Morishita S, *et al.* Micronization and polymorphic conversion of tolbutamide and barbitol by rapid expansion of supercritical solutions. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2006; 32: p. 877-891.
  152. Moribe K, Tsutsumi S, Morishita S, Shinozaki H, Tozuka Y, Oguchi T, *et al.* Micronization of phenylbutazone by rapid expansion of supercritical CO<sub>2</sub> solution. *Chem. Pharm. Bull.* 2005; 53: p. 1025-1028.
  153. Tandia A, Dehghani F, Foster NR. Micronization of cyclosporine using dense gas techniques. *J. Supercrit. Fluids.* 2006; 37: p. 272-278.
  154. Hezave AZ, Esmailzadeh F. Micronization of drug particles via RESS process. *J. Supercrit. Fluids.* 2010; 52: p. 84-98.
  155. Lobo JM, Schiavone H, Palakodaty S, York P, Clark A, Tzannis ST. SCF-engineered powders for delivery of budesonide from passive DPI devices. *J. Pharm. Sci.* 2005; 94(10): p. 2276-2288.
  156. Pasquali I, Bettini R, Giordano F. Supercritical fluid technologies: An innovative approach for manipulating the solid-state of pharmaceuticals. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2008; 60(3): p. 399-410.
  157. Sievers RE, Huang ETS, Villa JA, Walsh TR, Meresman HV, Liang CD, *et al.* Rapid gentle drying using dense carbon dioxide to form fine dry powders. *Resp. Drug Deliv. VIII.* 2002: p. 675-678.
  158. Sievers RE, Miles BA, Sellers SP, Milewski PD, Kusek KD. New process for manufacture of 1-micron spherical drug particles by CO<sub>2</sub>-assisted nebulization of aqueous solutions. *Resp. Drug Deliv. VI.* 1998: p. 417-420.
  159. Vemavarapu C, Mollan MJ, Needham TE. Coprecipitation of pharmaceutical actives and their structurally related additives by the RESS process. *Powder Technology.* 2009; 189: p. 444-453.
  160. Rodrigues MA, Li J, Padrela L, Almeida A, Matos HA, Azevedo EGd. Anti-solvent effect in the production of lysozyme nanoparticles by supercritical fluid-assisted atomization processes. *J. Supercrit. Fluids.* 2009; 48: p. 253-260.
  161. Falk R, Randolph TW, Meyer JD, Kelly RM, Manning MC. Controlled release of ionic compounds from poly (L-lactide) microspheres produced by precipitation with a compressed antisolvent. *J. Control. Release.* 1997; 44: p. 77-85.
  162. Kim JH, Paxton TE, Tamasko DL. Microencapsulation of naproxen using rapid expansion of supercritical solutions. *Biotechnol. Prog.* 1996; 12: p. 650-661.
  163. Mishima K, Matsuyama K, Tanabe D, Yamauchi S, Young TJ, Johnston KP. Microencapsulation of proteins by rapid expansion of supercritical solution with a nonsolvent. *AIChE J.* 2000; 46(4): p. 857-865.
  164. O'Neill ML, Cao Q, Fang M, Johnston KP, Wilkinson SP, Smith C, *et al.* Solubility of

- homopolymers and copolymers in carbon dioxide. *Ind. Eng. Chem. Res.* 1998; 37: p. 3067-3079.
165. Tsutsumi A, Nakamoto S, Mineo T, Yoshida K. A novel fluidized-bed coating of fine particles by rapid expansion of supercritical fluid solutions. *Powder Technol.* 1995; 85: p. 275-278.
  166. Wang TJ, Tsutsumi A, Hasegawa H, Mineo T. Mechanism of particle coating granulation with RESS process in a fluidized bed. *Powder Technol.* 2001; 118: p. 229-235.
  167. Geldart D. Types of gas fluidization. *Powder Technology.* 1973; 7: p. 285-292.
  168. Wang Y, Dave RN, Pfeffer R. Polymer coating/encapsulation of nanoparticles using a supercritical anti-solvent process. *J. Supercrit. Fluids.* 2004; 28: p. 85-99.
  169. Pessey V, Mateos D, Weill F, Cansell F, Etourneau J, Chevalier B. SmCo<sub>5</sub>/Cu particles elaboration using a supercritical fluid process. *J. Alloys Compounds.* 2001; 323: p. 412-416.
  170. Pessey V, Garriga R, Weill F, Chevalier B, Etourneau J, Cansell F. Core-shell materials elaboration in supercritical mixture CO<sub>2</sub>/ethano. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2000; 39(12): p. 4714-4719.
  171. Dixon DJ, Johnston KP, Bodmeier RA. Polymeric materials formed by precipitation with a compressed fluid anti-solvent. *AIChE J.* 1993; 39: p. 127-139.
  172. Young TJ, Johnston KP, Mishima K, Tanaka H. Encapsulation of lysozyme in a biodegradable polymer by precipitation with a vapor-over-liquid antisolvent. *J. Pharmaceut. Sci.* 1999; 88: p. 640-650.
  173. Randolph TW, Randolph AJ, Mebes M, Yeung S. Sub-micrometer-sized biodegradable particles of poly(l-lactic acid) via the gas antisolvent spray precipitation process. *Biotechnol. Progress.* 1993; 9: p. 429-435.
  174. Steckel H, Müller BW. Metered-dose inhaler formulation of fluticasone-17-propionate micronized with supercritical carbon dioxide using the alternative propellant HFA-227. *Int. J. Pharm.* 1998; 173: p. 25-33.
  175. Pourasghar M, Fatemi S, Vatanara A, Najafabadi AR. Production of ultrafine drug particles through rapid expansion of supercritical solution; a statistical approach. *Powder Technology.* 2012; 225: p. 21-26.
  176. Sui X, Wei W, Yang L, Zu Y, Zhao C, Zhang L, *et al.* Preparation, characterization and in vivo assessment of the bioavailability of glycyrrhizic acid microparticles by supercritical anti-solvent process. *Int. J. Pharm.* 2012; 423: p. 471-479.
  177. Kim MS, Kim JS, Park HJ, Cho WK, Cha KH, Hwang SJ. Enhanced bioavailability of sirolimus via preparation of solid dispersion nanoparticles using a supercritical antisolvent process. *Int. J. Nanomedicine.* 2011; 6: p. 2997-3009.
  178. Montes A, Tenorio AI, Gordillo MD, Pereyra CM, Ossa EJMdl. Supercritical antisolvent precipitation of ampicillin in complete miscibility conditions. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2011b; 50: p. 2343-2347.

179. Tenorio A, Gordillo MD, Pereyra CM, Martínez de la Ossa EM. Relative importance of the operating conditions involved in the formation of nanoparticles of ampicillin by supercritical antisolvent precipitation. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2007; 46: p. 114-123.
180. Wen Z, Liu B, Zheng Z, You X, Pua Y, Li Q. Preparation of liposomes entrapping essential oil from *Atractylodes macrocephala* Koidz by modified RESS technique. *Chem. Eng. Res. Des.* 2010; 88: p. 1102-1107.
181. Tozuka Y, Miyazaki Y, Takeuchi H. A combinational supercritical CO<sub>2</sub> system for nanoparticle preparation of indomethacin. *Int. J. Pharm.* 2010; 386: p. 243-248.
182. Lim RTY, Ng WK, Tan RBH. Amorphization of pharmaceutical compound by co-precipitation using supercritical anti-solvent (SAS) process (Part I). *J. Supercrit. Fluids.* 2010; 53: p. 179-183.
183. Chong GH, Yunus R, Abdullah N, Choong TSY, Spotar S. Coating and encapsulation of nanoparticles using supercritical antisolvent. *Am. J. Appl. Sci.* 2009; 6(7): p. 1352-1358.
184. Ai-Zheng C, Yi L, Foo-Tim C, Tsui-Yan L, Jun-Yan H, Zheng Z, *et al.* Microencapsulation of puerarin nanoparticles by poly(L-lactide) in a supercritical CO<sub>2</sub> process. *Acta Biomater.* 2009; 5: p. 2913-2919.
185. Heyang J, Fei X, Cuilan J, Yaping Z, Lin H. Nanoencapsulation of lutein with hydroxypropylmethyl cellulose phthalate by supercritical antisolvent. *Chin. J. Chem. Eng.* 2009; 17(4): p. 672-677.
186. Della Porta G, Reverchon E. Nanostructured microspheres produced by supercritical fluid extraction of emulsions. *Biotechnol. Bioeng.* 2008; 100(5): p. 1020-1033.
187. Amidi M, Pellikaan HC, Boer AHd, Crommelin DJA. Preparation and physicochemical characterization of supercritically dried insulin-loaded microparticles for pulmonary delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008; 68: p. 191-200.
188. Padrela L, Rodrigues MA, Velaga SP, Matos HA, Azevedo EGd. Formation of inhalable rifampicin-poly(L-lactide) microparticles by supercritical anti-solvent process. *AAPS PharmSciTech.* 2008 Dec; 9(4): p. 1119-1129.
189. Castor TP. Phospholipid nanosomes. *Curr. Drug Deliv.* 2005; 2: p. 329-340.
190. Lee S, Nam K, Kim MS, Jun SW, Park JS, Woo JS, *et al.* Preparation and characterization of solid dispersion of itraconazole by using aerosol solvent extraction system for improvement in drug solubility and bioavailability. *Arch. Pharm. Res.* 2005; 28: p. 866-874.
191. Nijlen TV, Brennan K, Mooter GVd, Blaton N, Kinget R, Augustijns P. Improvement of the dissolution rate of artemisinin by means of supercritical fluid technology and solid dispersions. *Int. J. Pharm.* 2003; 254: p. 173-181.
192. Jarmer DJ, Lengsfeld CS, Randolph TW. Manipulation of particle size distribution of PLA nanoparticles with a jet-swirl nozzle during precipitation with a compressed antisolvent. *J. Supercrit. Fluids.* 2003; 27: p. 317-336.
193. Velaga SP, Ghaderi R, Carlfors J. Preparation and characterisation of hydrocortisone particles using a supercritical fluids extraction process. *Int. J. Pharm.* 2002; 231: p. 155-

- 166.
194. Reverchon E, De Marco I, Della Porta G. Rifampicin microparticles production by supercritical antisolvent precipitation. *Int. J. Pharm.* 2002; 243: p. 83-91.
  195. Petermann M, Weidner E, Grüner S, Weinreich B. CPF - Concentrated powder form - A high pressure spray agglomeration technique. In *Proceedings of the Spray Drying '01 and Related Processes*; 2001; Dortmund: Germany.
  196. Petermann M, Weidner E, Blatter K, Simmrock HU. Manufacture of powder coatings by spraying of gas saturated melts. In *Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids*; April 2003; Versailles: France. p. 28–30.
  197. Martín Á, Cocero MJ. Numerical modelling of jet hydrodynamics, mass transfer and crystallization kinetics in the supercritical antisolvent (SAS) process. *J. Supercrit. Fluids.* 2004; 32: p. 203-219.
  198. Koushik K, Kompella UD. Preparation of large porous deslorelin-PLGA microparticles with reduced residual solvent and cellular uptake using a supercritical carbon dioxide process. *Pharm. Res.* 2004; 11: p. 524-535.
  199. Cattani VB, Fiel LA, Jager A, Jager E, Colone LM, Uchoa F, *et al.* Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2010; 39: p. 116-124.
  200. Kimura K, Hirayama F, Uekama K. Characterization of tolbutamide polymorphs (Burger's Form II and IV) and polymorphic transition behavior. *J. Pharm. Sci.* 1999; 88: p. 385-391.

## APÊNDICE B – Artigo original preparado para submissão em revista

### AZT-PLLA solid dispersions prepared by supercritical antisolvent technique, to improve the intestinal permeation

Valquíria Miwa Hanai Yoshida<sup>1,2</sup>, Marco Vinícius Chaud<sup>1</sup>, Maria Palmira Daflon Gremião<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Biomaterial and nanotechnology laboratory of Sorocaba University, Sorocaba University - UNISO, Sorocaba, SP, Brazil.

<sup>2</sup> Pharmaceutical Sciences School of São Paulo State University - UNESP, Araraquara, SP, Brazil.

Corresponding author present address: Department of Pharmaceutical Sciences, Sorocaba University, Raposo Tavares Highway, Km 92.5 - Sorocaba, Brazil.

Tel.: +55 (19) 2101 7124 - e-mail address: marco.chaud@prof.uniso.br.

#### Abstract

This study was intended to obtain biodegradable solid dispersions prepared by supercritical antisolvent technique using carbon dioxide as antisolvent under supercritical conditions. Products from the experiment were compared through the process yield and macroscopic morphology of the particles. The product of the selected formulation was evaluated for the characteristic of the solid state, drug content in the solid dispersion, and intestinal permeation. These characteristics were evaluated by X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy and Fourier transform (FTIR), test of drug content in the solid dispersion, and intestinal permeation using everted intestinal sac model. The solid dispersion of AZT with PLLA revealed a high yield (91.54 %), a high content of AZT ( $99.27 \pm 0.14$  %) in crystalline form, permeation of AZT from solid dispersion ( $L3\ 9.87 \pm 0.47$  %) was higher than that of pure AZT ( $3.84 \pm 0.45$  %) and chemical properties of AZT were not changed during the manufacturing process of the solid dispersion and by the components of the formulations.

**Key-words:** supercritical fluid technology, supercritical antisolvent, zidovudine, PLLA.

#### 1 Introduction

In the treatment of Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) inhibiting the replication of the HIV virus is the limiting factor (DAS NEVES *et al.*, 2010). Conventional dosage forms have contributed to improve the quality life and expectancy of patients with Viral Infection in



Human Immunodeficiency Virus (HIV), but numerous factors hinder the best use of the available therapeutic arsenal (VON BRIESEN; RAMGE; KREUTER, 2000; OJEWOLE *et al.*, 2008).

Among controlled drug delivery there are systems such as polymeric nanoparticles, solid lipid nanoparticles, liposomes, nanoemulsions, dendrimers, conjugated drugs, and hollow microspheres (LANAO; BRIONES; COLINO, 2007; SHAHIWALA; AMIJI, 2007; GOVENDER *et al.*, 2008; OJEWOLE *et al.*, 2008; MAINARDES *et al.*, 2006; MAINARDES *et al.*, 2009; YOSHIDA *et al.*, 2011).

The sound generation system in micro or nanoscale by conventional methods such as co-precipitation, coacervation, and solvent evaporation polymerization uses large amounts of organic solvents and/or surfactants which in general are pollutants and physiologically toxic (KAWASHIMA *et al.*, 1989; BENITA; BARKAI; PATHAK, 1990).

The methods mentioned above to obtain particles have commonly low rate of drug entrapment and difficulties in scaling, most often require further treatment for removal of particles from the solvent and/or impurities. Although the pharmaceutical industry shows interest in innovative technologies involving the production of micro and nanoparticles, disposal of solvents limits the industrial production, and generates increased costs (PERRUT, 2000).

New efforts to find other technologies that minimize the problems related to pollution, toxicity and ease of production scale has been the subject of several studies (LEE *et al.*, 2005; JOSEPH; SHARMA, 2008; ZHANG; ULUDAĞ, 2009; CATTANI *et al.*, 2010; MACHIDA; TAKESUE; SMITH JR, 2011).

Among the processes to achieve these goals the supercritical fluid (SCF) technology has a prominent place. The advantages of the SCF process are the simplicity of production steps, low temperature used in the process and the use of CO<sub>2</sub> (CHAN; KWOK, 2011).

The supercritical anti-solvent (SAS) process is based on the solvent power decrease of polar organic solvent, in which substrate of interest (pharmaceutical active ingredient and/or polymer) is dissolved. Following this saturated solution with FSC to cause precipitation and recrystallization of the substrate of interest. Thus, the FSC is used to extract the solvent from this solution (JUNG; PERRUT, 2001; PERRUT; CLAVIER, 2003; DE ZORDI *et al.*, 2012; SHETH *et al.*, 2012).

The SAS process is easily scaled and has been widely studied due to its potential to produce micro and nanoparticles with controlled particles size and morphology (PERRUT, 2000; SHARIATI; PETERS, 2003; REVERCHON; ADAMI, 2006).

The SAS process usually carried out at temperatures ranging from 308 to 333 K and is useful when thermolabile compounds need to be micronized (REVERCHON *et al.*, 2010).

The poly (L-lactic acid) (PLLA) is an aliphatic polyester which degrades in L-lactic acid, a natural metabolic product. The PLLA is an semi-crystalline with a melting point in the range of 175 ~ 185 °C, glass transition temperature (T<sub>g</sub>) in the range of 60 ~ 65 °C and molecular mass in the range of 5,000 ~ 700,000 (PIEDMONT; GIRONI, 2013).

The aliphatic polyesters are mainly used as biocompatible and biodegradable polymers for implantable controlled release systems (including rods, cylinders, tubes, films, fibers, beads and balls) and injection (including microcapsules, microspheres, nanoparticles and liquid injection) systems for drugs human and veterinary use. The rate of biodegradation and release characteristics of the drug from these controlled release systems with aliphatic polyesters can be controlled by altering the physical-chemical properties of polymers such as crystallinity, hydrophobicity, stereochemistry monomer, copolymer ratio, and molecular weight polymer (ROWE; SHESKEY; WELLER, 2009).

In this study was proposed a biocompatible solid dispersion containing zidovudine (AZT) and poly(L-lactic acid) (PLLA) prepared by the technique using supercritical CO<sub>2</sub> as antisolvent fluid, to attain a better permeation.

## 2 Materials and Methods

### 2.1 Materials

AZT was supplied by Cristalia (lot 0035/13, purity grade 99.849 %, Brazil), poly(L-lactic acid) manufactured by Biomaterials Group of Medical and Health Sciences at PUC-SP - PhD Eliana Aparecida de Rezende Duek, Polivinilpirrolidona K 30 was purchased from Henrifarma (lot 16829, Brazil). All chemicals used are reagent grade or pharmaceutical grade.

### 2.2 Experimental design

To reduce the number of runs needed to obtain the highest amount of information on product performance, the screening was planned using an experimental design. In particular, an randomized plan was employed, since two factors were evaluated each at three levels, and experimental trials were performed with all nine possible combinations.

The 3<sup>2</sup> factorial was used, where nine represents the number of runs. In the present study, the ratio of AZT:PLLA ( $X_1$ ) and the conditions of temperature and pressure ( $X_2$ ) were selected as independent variables. PLLA content of the mixture was 33, 50, and 67 % of the total weight

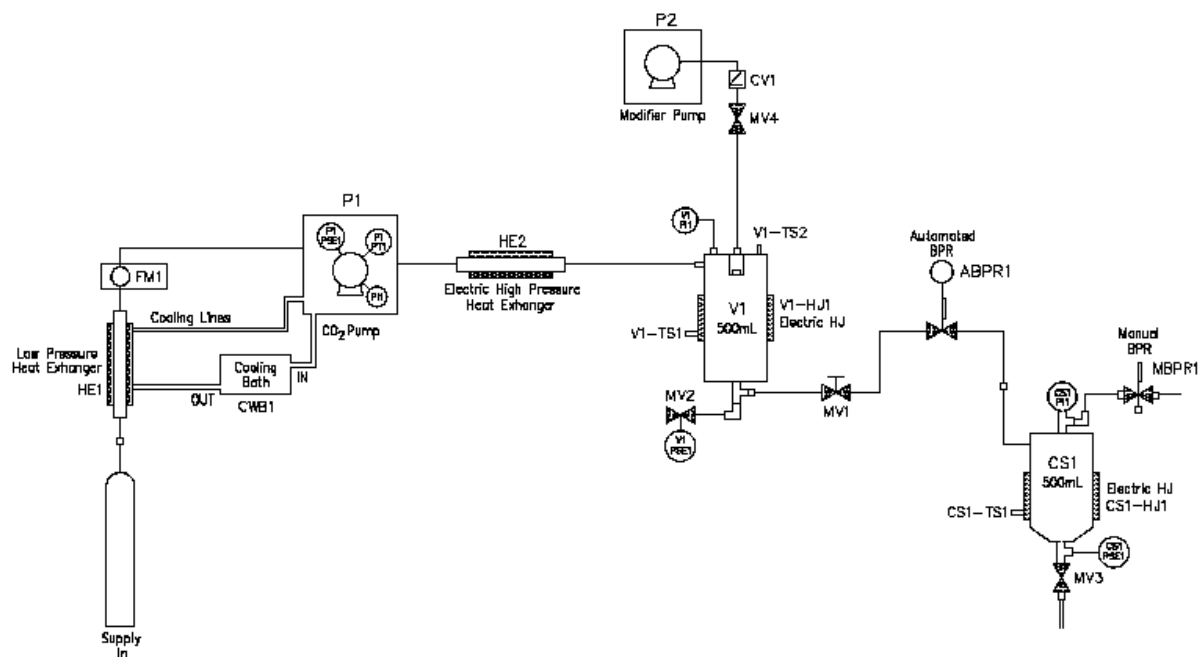
of the processed particles. Mixtures of AZT:PLLA were evaluated 2:1, 1:1, and 1:2, with all formulations were fed 0.5% PVP, while the temperature and pressure of the process were evaluated at 45 °C – 85 bar, 45 °C – 100 bar, and 45 °C – 135 bar.

### 2.3 Preparation of formulations to obtain the solid dispersions

The drug-polymer solution (20 mL) was prepared dissolving AZT and PLLA in predetermined proportions in dichloromethane to give the desired proportion in mass of polymer particles. An ultrasound bath was used to remove gases and mix the solution.

During the experiment, the temperature and pressure were maintained at 45 °C and 85 – 135bar, respectively. When steady state conditions were reached in the high-pressure vessel (V1), the solution was released to V1 by a high pressure pump (P2) at a flow rate of 0.75mL.min<sup>-1</sup> and sprayed through a stainless steel capillary type (101.6 mM DI). The spraying was continued for 27 min followed by another 20 min CO<sub>2</sub> flow for the resolution step. Thereafter, the CO<sub>2</sub> was supplied at a rate of 3.0 mL.min<sup>-1</sup> to remove any residual organic solvent for 15 min. When the cleaning step is completed, the high-pressure vessel was slowly depressurized and samples were collected for characterization. The SAS process scheme is shows in Fig. 1.

Figure 1: Diagrama esquemático do processo SAS para obtenção das partículas sólidas.



Where HE1 and HE2 represent heat exchangers one and two respectively; FM1 is flow meter; CWB1 is cooler, P1 is CO<sub>2</sub> flow pump, P2 represents the flow of the solution pump; ABPR1

automated back pressure; MBPR1 manual back pressure, V1 represents precipitation vessel; CS1 represents separator vessel CO<sub>2</sub> and solvent (cyclone).

## 2.4 AZT loading rate

The evaluation of AZT's loading rate was done over 30mg of AZT:PLLA solid dispersion. The samples were dispersed in water (100 mL) and the AZT was extracted during 24 h, at 37°C under agitation (150 rpm) in orbital shaker incubator (American Lab-AL140). The solution was filtered and the AZT amount was determined spectrophotometrically at  $\lambda_{\max}$  266nm (Spectrophotometer UV-Vis. Shimadzu-MultiSpec-1501). AZT concentrations of the samples were calculated using the Equation 1 for the line obtained from the analytical curve (n=3). The loading rate (%) of AZT was calculated by equation:

$$\text{Loading rate (\%)} = \frac{\text{obtained drug mass}}{\text{solid dispersion theoretical drug mass}} \times 100 \quad \text{Equation 1}$$

## 2.5 Dissolution test

The AZT release rate from the samples was examined *in vitro* at 0.25, 0.50, 1.0 – 10.0, 20.0, and 24.0 h, using the dissolution method described in USP 31 (Dissolutor American Lab, AL1000, Brazil). The dissolution medium contained 900 mL of simulated gastric fluid, without pepsin, at pH 1.2, and temperature maintained at  $37 \pm 0.5$  °C. At predetermined intervals, 5 mL samples were filtered. AZT dissolved concentration in the medium was determined by spectrophotometry (266 nm). The dissolution medium volume was kept constant by means of immediate reposition.

## 2.6 Drug release kinetic model

AZT release data obtained from the dissolution profiles were treated using the SigmaPlot 10.0 software in three mathematical models (Table 1) (COSTA; LOBO, 2001) for interpreting the dissolution kinetics, where  $Q_t$  is the drug dissolved amount in  $t$  time,  $Q_0$  is the initial drug amount in the solution,  $K$  is the constant.

Table 1. Mathematical models used to describe the release profiles.

| Model            | Equation                    |
|------------------|-----------------------------|
| First order      | $\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t$ |
| Higuchi          | $Q_t = Q_0 + K_H t^{1/2}$   |
| Korsmeyer-Peppas | $Q_t/Q_\infty = K_{KP} t^n$ |

## 2.7 Scanning Electron Microscopy

The particles' gold powder-coated external and internal topographic structure was analyzed using a Sputter Coater plating machine (model SC7620) and high-resolution scanning electron microscope (Leica, model Leo 440i - Cambridge, England). The samples were randomly scanned, microphotographed at 5 kV, and magnified at  $\times 500$  to  $\times 3,000$ .

## 2.8 Analysis by infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry, and X-ray diffraction

The infrared spectra of AZT, PLLA, and solid dispersion, were obtained from Thermo Scientific Nicolet 6700 (Madison, USA) using the conditions of analysis by ATR mode to measure taken with the accessory Omni Smart-Sampler. The spectra were obtained in the range  $4000\text{--}675\text{ cm}^{-1}$  with  $4\text{ cm}^{-1}$  resolution.

The samples were subjected to differential scanning calorimetry (DSC) analysis in a Differential Scanning Calorimeter, Shimadzu DSC-60 (Tokyo, Japan), equipped with an accessory flow controller FC model 60A; software and interface for control and data acquisition, model TA-60WS and system sealing crucible model SSC-30, in heating cycles from 30 to 350 °C. The samples weighing approximately 2mg were heated continuously at the rate of  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  under constant nitrogen flux.

The X-ray diffractograms were obtained in a Philips Analytical X-Ray diffractometer, model X'Pert-MPD (Almelo, Netherlands), purified with nickel and copper radiation (Cu Ka of  $\lambda=1.54060\text{ \AA}$ ). Analyses were performed with the diffraction angle  $2\theta$ , ranging from 4 to 40, step: 0.02 degrees, speed  $0.05\text{ deg}\cdot\text{sec}^{-1}$ . The voltage and current used were 40 kV and 40 pA, respectively.

## 2.9 Everted rat intestinal sacs *in vitro* model

The AZT intestinal permeation was evaluated using the everted rat intestinal sacs model. The everted intestinal sacs were obtained from adult male Wistar rats, weighing 250 to 300 g starved for 8 h. This period of fasting was established according to the literature related to the investigation of permeability of substances by the proposed model (FERRARI *et al.*, 2012; CORREA *et al.*, 2011; CHAUD *et al.*, 2010; ZANCHETTA *et al.*, 2008). After pre-anesthetic (halothane solution) and intraperitoneal anesthetic (pentobarbital), the small intestine was immediately dissected, washed with TC199 medium at 10 °C and placed in 20 mL of a TC199 medium for tissue at the same temperature, oxygenated ( $\text{O}_2\text{:CO}_2 - 95\text{:}5$ ). The intestine was then everted with the flexible rod with its end protected with a thin silk fabric (mini brush), one end was closed using suture and intestinal segment filled with TC199 solution.

The intestine segment (6 cm) was ligated at one extremity, and other segment extremity was closed. When the incubation medium was added neat solid dispersion AZT and AZT: PLLA (L3). Incubation was carried out at 37 ° C under gentle agitation system of the previously deoxygenated. After a period of 60 min incubation , the samples (n = 6), the inside ( in contact with the serous membrane) and the outside ( in contact with the mucous membrane) of the intestinal sac were filtered and analyzed by UV (  $\lambda$  = 266 nm). The TC199 medium was composed of 8.47 g NaCl, 0.34 g KCl, 0.126 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.595 g NaHPO<sub>4</sub>, and 0,018 g glucose, to repair a liter of solution at pH 7.4. Reagents and solvents were of analytical grade. The study protocol of intestinal drug permeation using everted rat intestinal sacs was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA), Federal University of São Carlos (UFSCAR) under n° 003/2011, catering to CFMV Res No 1000/2012.

### 3 Results and Discussion

#### 3.1. Parameters selection for preparation of solid dispersions under supercritical conditions

Table 2 shows results yield (%) and appearance of solid dispersions of AZT with PLLA. Lots of L1 to L9 correspond to the formulations obtained 3<sup>2</sup> factorial experimental design. In this study, the independent variable  $X_1$  – in three different levels (+1, 0, and -1) – and  $X_2$  independent variable – the three levels (+1, 0, and -1) – resulted in the obtaining of different solid precipitate aspects, except for the L1. These results guided the selection of samples for physical and chemical evaluations.

Whereas yield and appearance of the product, the solid dispersion L3 (91.54 %, solid particulate uniform appearance) was selected as the main sample for physicochemical evaluation and *ex vivo* study of intestinal permeation. However, considering the same dependent variables solid dispersions L5 (59.06 %, solid particulate and filamentous non-uniform aspect) and L9 (51.50 %, solid particulate and filamentous non-uniform aspect) were selected.

The formulation L3 corresponds to 1:2 AZT: PLLA (level +1) and temperature of 45 ° C and pressure of 85 bar (level -1). This sample showed a high degree of uniformity and free from lumps. The other formulations showed varying degree of uniformity with high lumps. The characteristics of the samples can be attributed to the proportion of AZT and PLLA or conditions of supercritical pressure in the system environment, since the conditions of temperature and CO<sub>2</sub> flow were kept constant for all formulations.

The components mass of the formulations that do not recovered in solid dispersions may have been charged together with the solvent during the removal of the vessel in a supercritical fluid precipitation of product.

The mass transfer behavior of the droplets is regarded as a critical factor in the process influences the particle morphology and size. The volume expansion of the solvent reduces the ability to promote the solvation, liquid phase supersaturation, and subsequent particles formation by drug coprecipitation with the carrier (MONTES *et al.*, 2011). Therefore, the components loss mass of the formulations in the process is related to insufficient volume expansion of the solvent and subsequent failure to reduce capacity of solvent solvation.

In the SAS process, the SC-CO<sub>2</sub> is used as antisolvent. The solution containing the solutes form small droplets produced by a nozzle through which the solution is sprayed into a vessel maintained at a pressure greater than 70 bar. When the drops come into contact with the SC-CO<sub>2</sub>, a very rapid diffusion takes place, including phase separation and solute precipitation (CHONG *et al.*, 2009). In the precipitation of particles, the mass transfer occurs between a droplet of organic solvent and a compressed antisolvent. In miscible conditions above the critical point of the mixture, there is no obvious way to define the interface between the two fluids (MONTES *et al.*, 2011).

Table 2: Results of 3<sup>2</sup> factorial design.

| Lot code | Coded values        |                     | Yield (%) | Appearance of product* |
|----------|---------------------|---------------------|-----------|------------------------|
|          | $X_1$<br>(AZT:PLLA) | $X_2$<br>( $T, P$ ) |           |                        |
| L1       | +1                  | +1                  | 0         | -                      |
| L2       | +1                  | 0                   | 51,50     | +++                    |
| L3       | +1                  | -1                  | 91,54     | +                      |
| L4       | 0                   | +1                  | 78,74     | +++                    |
| L5       | 0                   | 0                   | 59,06     | ++                     |
| L6       | 0                   | -1                  | 75,80     | +++                    |
| L7       | -1                  | +1                  | 77,29     | +++                    |
| L8       | -1                  | 0                   | 62,50     | +++                    |
| L9       | -1                  | -1                  | 51,50     | ++                     |

| Coded values | $X_1$ | $X_2$           |
|--------------|-------|-----------------|
| -1           | 2:1   | 45 °C – 85 bar  |
| 0            | 1:1   | 45 °C – 100 bar |
| +1           | 1:2   | 45 °C – 135 bar |

\* Legend: not obtain product (-); solid particles of uniform aspect (+), solid particulate and filamentous non-uniform aspect (++); solid non-particulate (+++).

Dukhin and collaborators (2003) showed the existence of droplets in transient conditions slightly above the mixture critical point, due to the existence of a dynamic interfacial tension. Consequently, the description of mass transfer from a droplet, even in miscible conditions appears reasonable.

### 3.2. Scanning Electron Microscopy

Figure 2 shows a pure AZT micrograph with increase of  $50\times$  and  $400\times$ , reveals the drug crystalline form as described in the literature. Figure 3 shows the PLLA micrograph with increases of  $50\times$  and  $400\times$ , and shows the PLLA filamentous structure.

Figure 4 shows a PLLA with AZT (L3) solid dispersion micrograph with increases of  $50\times$ ,  $400\times$ ,  $1000\times$ , and  $3000\times$ , where you can observe the crystals of AZT adhered to PLLA fibers. Figure 4 shows the physical structure change in both AZT and PLLA in the solid dispersion form, besides the size reduction. Is observed rearrangement of the polymer chains into smaller fractions and adhesion of AZT on the polymer surface after SAS processing. Further investigations to prove the inclusion of the drug from the polymer chains are required.

Figure 2: SEM photographs of pure AZT.

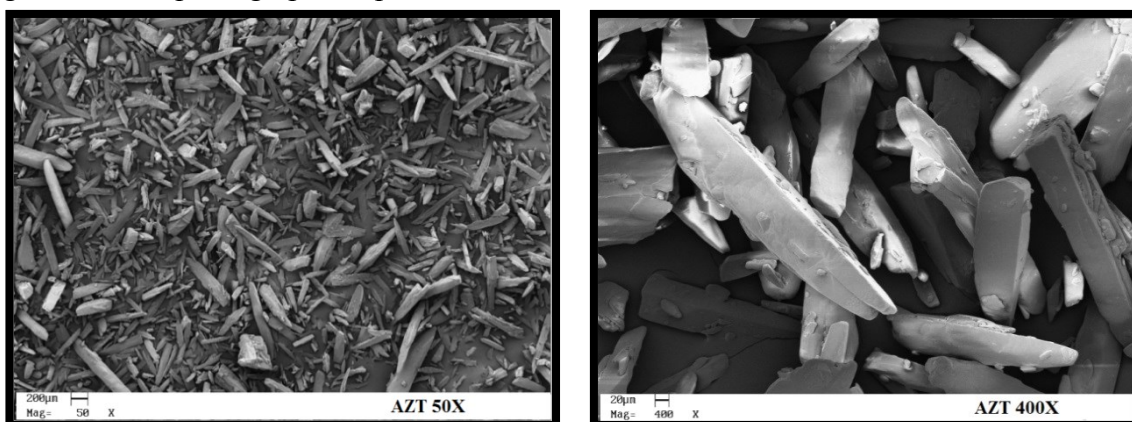
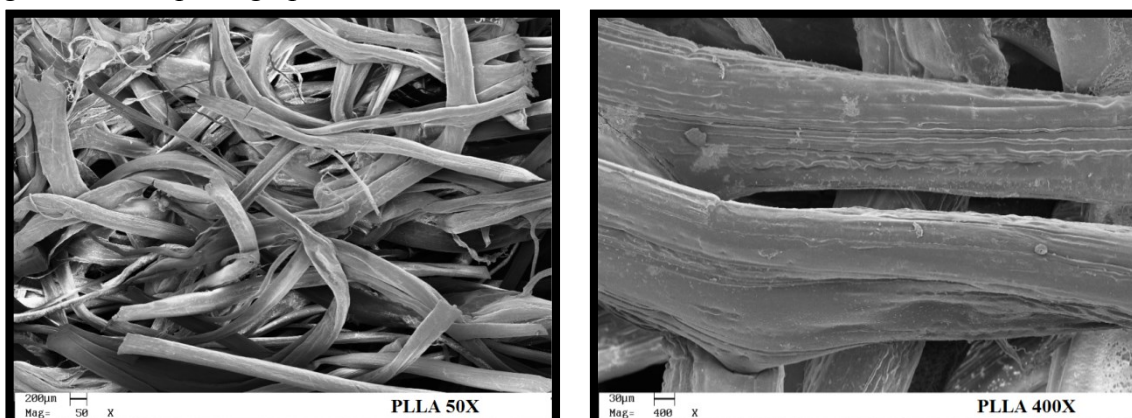


Figure 3: SEM photographs of PLLA.





### 3.3. Analysis by Differential Scanning Calorimetry

DSC curves of pure AZT, PLLA, and solid dispersions (L3, L5, and L9) are shown in Fig. 5. The DSC curve of AZT showed an endothermic peak in the range of 120 °C – 130 °C that corresponds to the AZT fusion point ( $T_{\text{onset}} = 122.98 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) described in literature (ARAÚJO *et al.*, 2003; RAO, 2005; YOSHIDA *et al.*, 2011). After the endothermic fusion event, two consecutive exothermic events (between 180 °C and 260 °C) and one endothermic event (between 274 °C and 320 °C) are evident. This result is similar to that obtained by Rodrigues *et al.* (2005) in study about application of thermal analytical techniques on characterization, purity determination, and degradation kinetic of AZT. PLLA DSC curve show the fusion endothermic peak ( $T_{\text{onset}} = 167.48 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) consistent with the range of 165~185 °C described in the literature (CHU; CAMPBELL, 1982). The same event at a lower intensity was observed in the thermograms of solid dispersions L3, L5, and L9. After fusion, the process of PLLA decomposition begins at a temperature of ~250 °C.

Figure 4: SEM photographs of obtend solid dispersion.

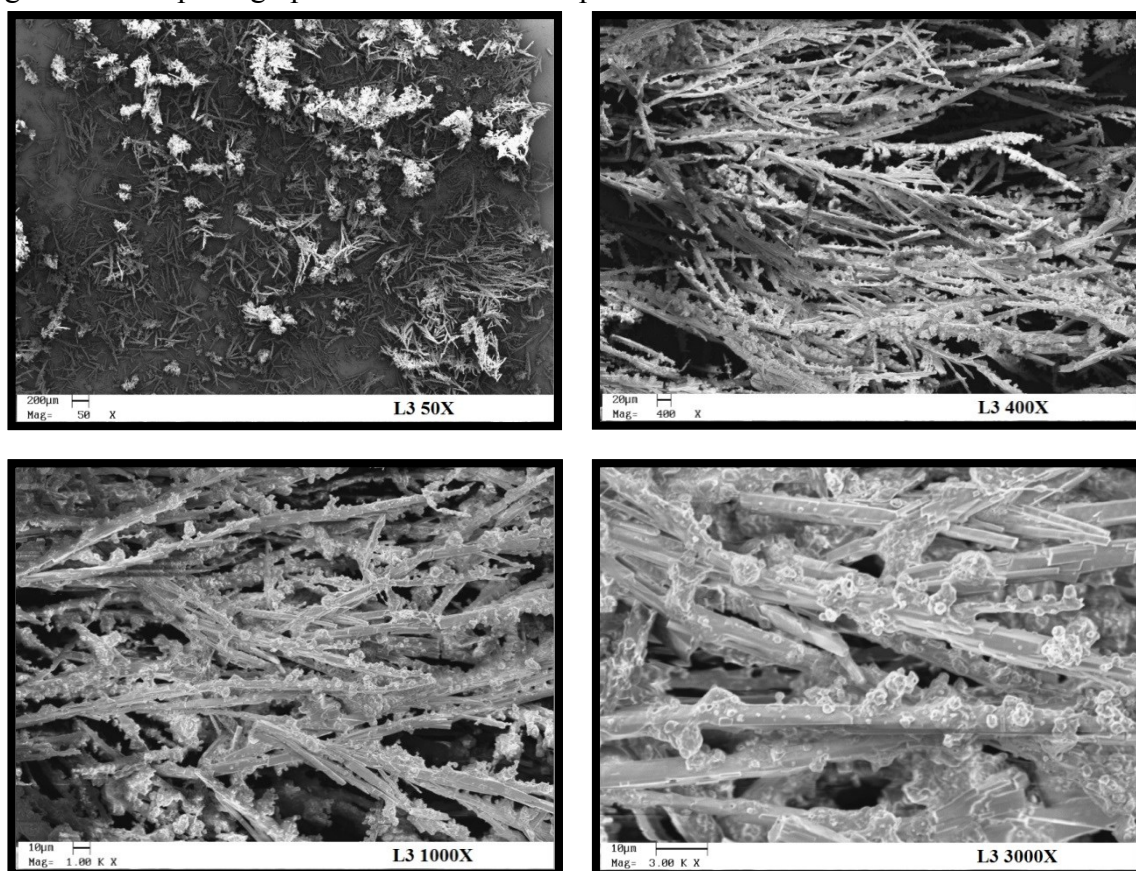
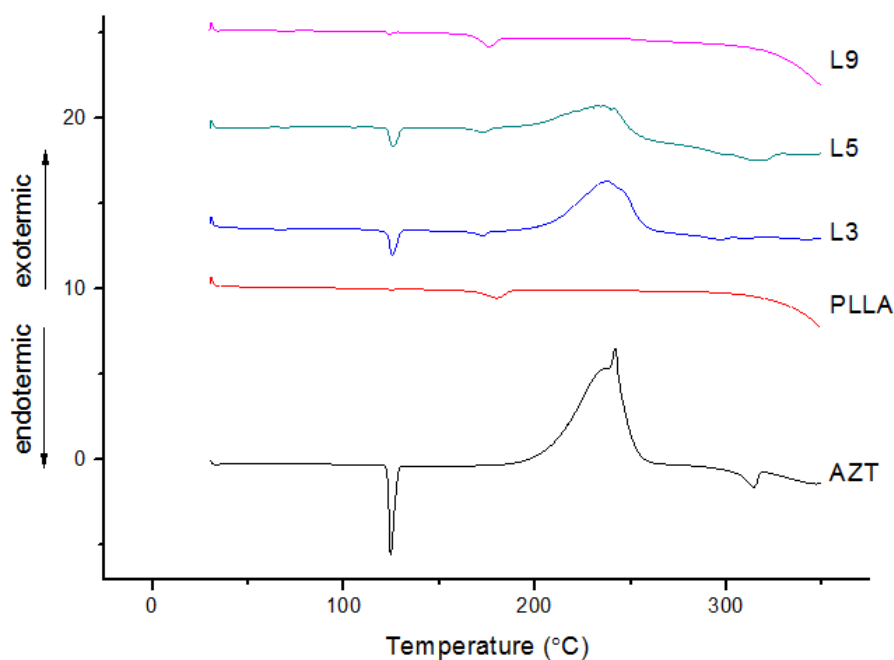


Figure 5: DSC curves of AZT, PLLA, L3, L5, and L9.



### 3.4. Analysis by X-ray diffraction

The crystalline state of AZT in the solid dispersions was confirmed by XRD. Figure 6 shows the diffractogram of pure AZT, PLLA, and solid dispersions (L3, L5, and L9). The diffractogram of pure AZT indicates the crystalline structure of the drug while solid dispersions diffractograms present the same pattern.

Figure 6: X-rays diffractograms from AZT, PLLA, L3, L5, and L9.

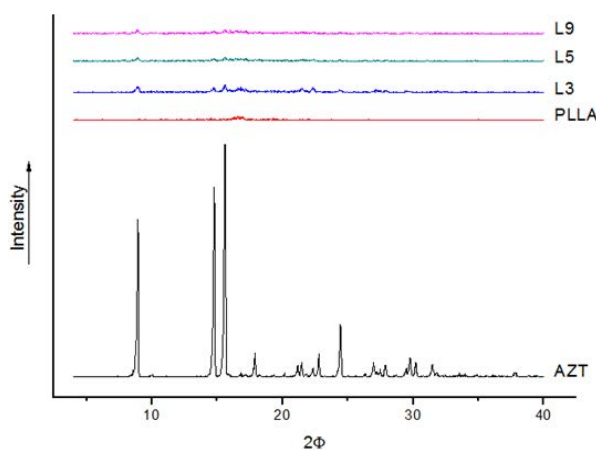
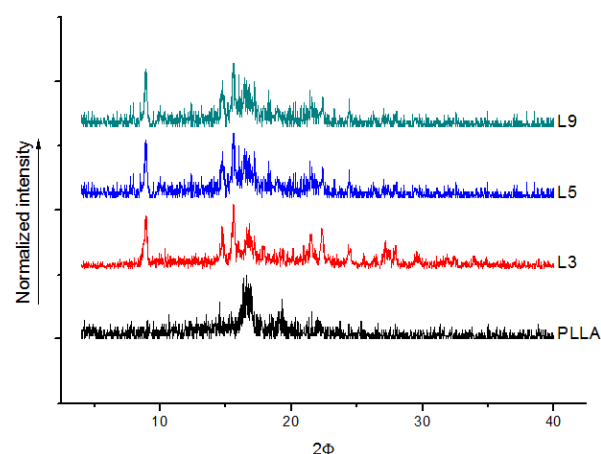


Figure 7: Normalized X-rays diffractograms from AZT, PLLA, L3, L5, and L9.



AZT, PLLA, L3, L5, and L9 diffractograms are shown in Figure 6 (without normalized intensity values) and Figure 7 (with normalized intensity values). AZT diffractogram exhibited several peaks, indicating that it is a solid compound. PLLA diffractogram showed a wide band characteristic of amorphous compound (without fine-tuned and peaks), except in the range of  $16.04 \leq 2\theta \leq 17.02$ , which showed small peaks indicating the crystalline residues

of PLLA this being a glassy amorphous polymer (PIEDMONT; GIRONI 2013), this interpretation is reinforced by the observation of similar peaks in all samples analyzed.

The maintenance of the AZT crystalline form in L3, L5, and L9 solid dispersions can be seen in diffractograms of Figure 6 and 7, which show sharp peaks related to AZT broadband referring to PLLA. Similar results were described in the literature (RAVIOLO; BRINON, 2011; GUPTA; PATHAK, 2008; CUI *et al*, 2003.).

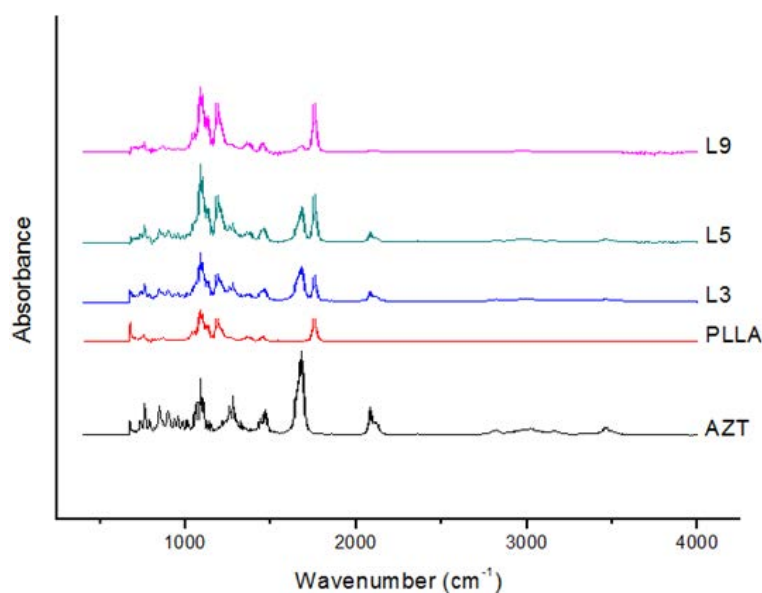
The normalization of the intensity values in diffractograms was made by converting the higher peak value of each diffraction pattern corresponding to one, allowing better show comparisons between them.

The X-DR and DSC analysis results of L3, L5, and L9 solid dispersions suggest that AZT is in crystalline form.

### 3.5. Analysis by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy

The FTIR spectra are shown in Fig. 8. The spectra of the pure AZT and solid dispersions (L3, L5, and L9) show the characteristic peaks of the carbonyl group in  $1683\text{cm}^{-1}$  and of the azide group in  $2083\text{cm}^{-1}$ . One band in  $1380\text{cm}^{-1}$  is attributed to  $\text{CH}_2$  and one band in  $1281\text{cm}^{-1}$  is assigned to the C-O-C e the C-OH groupings. The intervals of the stretching bands in this study were similar to those obtained by Araújo *et al.* (2003) and indicate the stable nature of the AZT during the solid dispersions production process.

Figure 8: FTIR spectra of AZT, PLLA, L3, L5, and L9.



### 3.6. Release behavior of AZT *in vitro*

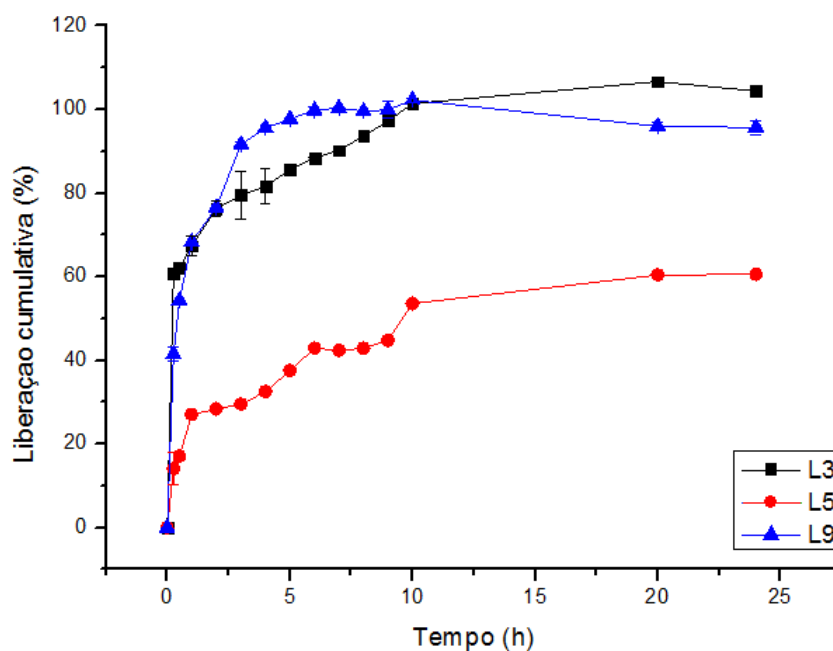
The AZT release from L3, L5, and L9 solid dispersions was evaluated at pH 1.2, are shown in Figure 9, and described a modified release profile.

According Severino, Santana and Malmonge (2011), PLLA, as an aliphatic polyester, is degraded in four consecutive stages: hydration, initial degradation, subsequent degradation and solubilization.

In PLLA hydration stage the aqueous medium in which the polymer is in the polymeric matrix penetrates, resulting in relaxation of the seats of the polymer is accompanied by the decrease of glass transition temperature. The initial degradation of PLLA region begins in hydrated polymer by hydrolysis of the ester linkage resulting in cleavage of the main chain of the polymer, the release of lactic acid and reduction of PLLA molecular mass. The hydrolysis continues inside the hydrated such that the molecular mass of the polymer matrix decreases continuously, while maintaining its integrity. In step further degradation of the polymer chain remains hydrolyzed and its molecular mass decreases to a point where it cannot maintain its integrity. Accordingly, it begins the mass loss of the polymer due to its solubility in the aqueous medium (SEVERINO; SANTANA; MALMONGE, 2011).

The release of AZT from solid dispersions is directly related to the stages of degradation of PLLA. AZT is characterized by being highly soluble (in Biopharmaceutical Classification System (AMIDON *et al.*, 1995)), while imprisoned in the solid dispersions was solubilized when PLLA hydration stage and released from solid dispersions in initial and subsequent PLLA degradation stages.

Figure 9: Release profile of AZT from the solid dispersions. The errors bar shows the standard deviation for n=3.



### 3.7. Release kinetics

The dissolution profile of AZT was modeled and compared in order to evaluate the release kinetics (COSTA; LOBO, 2001). The models evaluated were First order, Higuchi, and Korsmeyer-Peppas.

| Lot | First order |       | Higuchi |       | Korsmeyer-Peppas |       |       |
|-----|-------------|-------|---------|-------|------------------|-------|-------|
|     | $K_l$       | $r$   | $K_H$   | $r$   | $K_{KP}$         | $n$   | $r$   |
| L3  | 0,031       | 0,857 | 3,966   | 0     | 39,297           | 0,139 | 0,996 |
| L5  | 0,001       | 0,715 | 1,937   | 0,921 | 6,210            | 0,319 | 0,989 |
| L9  | 0,022       | 0,974 | 4,035   | 0     | 38,606           | 0,146 | 0,949 |

The first-order kinetic model describes the dissolution of drug from dosage forms, such as those containing water-soluble drugs in porous matrixes (COSTA; LOBO, 2001). In this model, for each formulation was plotted time *versus* ln undissolved amount of AZT in the immediately preceding time.

Higuchi model describes the dissolution of drug from various types of modified release dosage forms, such as in the case of some patches and matrix tablets with water-soluble drugs. In this model, each formulation was plotted graph of square root of time versus the amount dissolved in the immediately preceding time AZT.

Korsmeyer et al. (1983) have developed a semi-empirical simple model for exponentially drug release in time (t), which describes the drug release from a polymeric system model. And Peppas (1985) used the exponent release value (n) to characterize different release mechanisms, and concluded that by the values of the drug transport mechanism can be classified as either non-Fickian ou Ficknian diffusion.

L3 did not respond to Higuchi model and introduced r (0.857) with low linearity for the first order model. L3 and L5 showed r linearity to the Korsmeyer-Peppas model. The n values for both samples was less than 0.5, indicating drug diffusion through the polymer by ficknian diffusion mechanism.

Although the sample L5 have AZT released about 60 % within 24 h also showed r linearity for Higuchi model, reinforcing the suggestion of the release of AZT as a diffusion process based on Fick's law, and this model can be used to describe the drug dissolution for modified release (COSTA, LOBO, 2001).

L9 release kinetics showed linearity for First order model, confirming the AZT dissolution for release. However,  $r$  (0.949) for the Korsmeyer-Peppas model was very similar and if we consider  $n$ , the fickiana diffusion is suggested as a model of AZT transport.

The knowledge of PLLA stages of degradation, as proposed previously, added to the data obtained in the AZT release kinetics study, indicates that AZT was solubilized on PLLA hydration stage, and released from L3, L5, and L9 samples by diffusion in the initial stages of degradation of PLLA.

#### **4 Intestinal permeation *ex vivo* evaluation**

To minimize the number of animals used in the experiment, the data of L3 solid dispersion was selected from of physical and chemical characterization.

The test evaluated the permeation of AZT from AZT:PLLA solid dispersion (L3) and compared these values with the permeation of pure AZT.

Using the inverted rat intestinal sac model, pure AZT and AZT from L3 solid dispersion was permeated through the mucosa to serosa. The permeability of AZT from solid dispersion L3 ( $9.87 \pm 0.47$  %) was much higher than that of pure AZT ( $3.84 \pm 0.45$  %), indicating that processing using supercritical fluid (SAS process) promoted permeation of AZT. The intestinal cumulative permeation data for 60 min showed that the intestinal permeation of the solid dispersion is significantly different to L3 and pure AZT. This result is supported by the results of AZT release tests to L3 solid dispersion, where was found a modified drug release.

However, the AZT permeation depends on the intrinsic characteristics of solubility and permeability (ability to diffuse across the apical membrane of the lipophilic enterocytes) in an aqueous medium in the intestinal lumen.

It is recognized that AZT is a Class III drug in the Biopharmaceutical Classification System (Amidon *et al.*, 1995), thus, high solubility and low permeability, the AZT permeability from L3 was optimized in relation to pure drug should be further studied for a longer period of time (10 h) of the inverted rat intestinal sac model to generate more comparable to the dissolution test data.

#### **5 Conclusion**

This study has shown that it is possible to obtain modifield release systems by SAS process for drug class 3 (BCS) that are primarily absorbed in the stomach and in the duodenum. The results showed that the permeation properties were obtained as a consequence of PLLA

degradation stage. The AZT in a solid dispersion with PLLA permitted the control of the AZT liberation by diffusion.

#### Acknowledgments

The authors want to thank Cristalia (Brazil) for supply of the reference substance and Fapesp/Capes for the financial support.

#### Reference List

- AMIDON, G. L. *et al.* A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharm. Res.**, v. 12, p. 413-420, 1995.
- ARAÚJO, A. A. *et al.* Thermal analysis of the antiretroviral zidovudine (AZT) and evaluation of the compatibility with excipients used in solid dosage forms. **Int. J. Pharm.**, v. 260, n. 2, p. 303-314, Jul 2003.
- BENITA, S.; BARKAI, A.; PATHAK, Y. V. J. Effect of drug loading extent on the vitro release kinetic behaviour of nifedipine from polyacrylate microspheres. **J. Control. Release**, v. 12, n. 3, p. 213-222, 1990.
- CATTANI, V. B. *et al.* Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 39, p. 116-124, 2010.
- CHAN, H.-K.; KWOK, P. C. L. Production methods for nanodrug particles using the bottom-up approach. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 63, p. 406-416, 2011.
- CHAUD, M. V. *et al.* Solid dispersion with hydrogenated castor oil increase solubility, dissolution rate and intestinal absorption of praziquantel. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 46, p. 474-481, 2010.
- CHONG, G. H. *et al.* Coating and encapsulation of nanoparticles using supercritical antisolvent. **Am. J. Appl. Sci.**, v. 6, n. 7, p. 1352-1358, 2009.
- CHU, C. C.; CAMPBELL, N. D. Scanning electron microscopic study of the hydrolytic degradation of poly(glycolic acid) suture. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 16, n. 4, p. 417-430, Jul. 1982.
- CORREA, E. M. *et al.* Assessment of solubility and intestinal absorption in vitro of Praziquantel in solid dispersions of polyethylene glycol 6000. **Acta Farm. Bonaer.**, v. 30, p. 1910-1915, 2011.
- COSTA, P.; LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **Eur. J. Pharm. Sci.** v.13, p.123–133, 2001.
- CUI, F.; YANG, M.; JIANG, Y.; CUN, D.; LIN, W.; FAN, Y.; KAWASHIMA, Y. Design of sustained-release nitrendipine microspheres having solid dispersion structure by quasi-emulsion solvent diffusion method. **J. Control. Release**, v.91, p.375–384, 2003.
- DAS NEVES, J. *et al.* Nanotechnology-based systems for the treatment and prevention of HIV/AIDS. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, v. 62, p. 458-477, 2010.
- DE ZORDI, N. *et al.* Applications of supercritical fluids to enhance the dissolution behaviors of furosemide by generation of microparticles and solid dispersions. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 81, p. 131-141, 2012.
- DUKHIN, S. S. *et al.* Dynamic interfacial tension near critical point of a solvent–antisolvent mixture and laminar jet stabilization. **Physicochem. Eng. Aspects**, v. 229, p. 181-199, 2003.
- FERRARI, P. C. *et al.* In vitro drug permeation from chitosan pellets. **Carbohydr. Polym.**, v. 87, p. 2526-2531, 2012.

- GOVENDER, T. *et al.* Polymeric nanoparticles for enhancing antiretroviral drug therapy. **Drug Deliv.**, v. 15, n. 8, p. 493-501, Nov 2008.
- GUPTA, R.; PATHAK, K. Optimization studies on floating multiparticulate gastroretentive drug delivery system of famotidine. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.34, p.1201–1208, 2008.
- JOSEPH, N. M.; SHARMA, P. K. Nanoparticle: Drug delivery system for cancer therapy. **Asian J. Pharm.**, v. 2, n. 3, p. 139-140, 2008.
- JUNG, J.; PERRUT, M. Particle design using supercritical fluids: literature and patent survey. **J. Supercrit. Fluids**, v. 20, p. 179-219, 2001.
- KAWASHIMA, Y. *et al.* Preparation of controlled-release microspheres of Ibuprofen with acrylic polymers by a novel quasi-emulsion solvent diffusion method. **J. Pharm. Sci.**, v. 78, p. 68-72, 1989.
- LANAO, J. M.; BRIONES, E.; COLINO, C. I. Recent advances in delivery systems for anti-HIV1 therapy. **J. Drug Target.**, v. 15, p. 21-36, 2007.
- LEE, S. *et al.* Preparation and characterization of solid dispersion of itraconazole by using aerosol solvent extraction system for improvement in drug solubility and bioavailability. **Arch. Pharm. Res.**, v. 28, p. 866-874, 2005.
- MACHIDA, H.; TAKESUE, M.; SMITH JR, R. L. Green chemical processes with supercritical fluids. **J. Supercrit. Fluids**, v. 60, p. 2-15, 2011.
- MAINARDES, R. M. *et al.* Development of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles and evaluation of intestinal permeation by the everted gut sac model. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 6, p. 3057-3061, 2006.
- MAINARDES, R. M. *et al.* Zidovudine-loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. **J. Pharm. Sci.**, v. 98, p. 257-267, 2009.
- MONTES, A. *et al.* Particles formation using supercritical fluids. In: NAKAJIMA, H. **Mass Transfer - Advanced Aspects**. CC BY 3.0 license: InTech, 2011. Cap. 20, p. 824. ISBN 978-953-307-636-2.
- OJEWOLE, E. *et al.* Exploring the use of novel drug delivery systems for antiretroviral drugs. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 70, p. 697-710, 2008.
- PERRUT, M. Supercritical fluid applications: industrial developments and economic issue. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 39, p. 4531–4535, 2000.
- PERRUT, M.; CLAVIER, J. Y. Supercritical fluid formulation: process choice and scale-up. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 42, p. 6375-6383, 2003.
- PIEMONTE, V.; GIRONI, F. Lactic acid production by hydrolysis of poly(lactic acid) in aqueous solutions: An experimental and kinetic study. **J. Polym. Environ.**, v. 21, n. 1, p. 275-279, 2013.
- RAO, K.R.; SENAPATI, P.; DAS, M.K. Formulation and in vitro evaluation of ethyl cellulose microspheres containing zidovudine. **J. Microencapsulation**, v.22, n.8, p.863–876, 2005.
- RAVIOLO, M. A.; BRIÑÓN, M. C. Preformulation studies of zidovudine derivatives: Acid dissociation constants, differential scanning calorimetry, thermogravimetry, X-ray powder diffractometry and aqueous stability studies. **Sci. Pharm.**, v. 79, n. 3, p. 479-491, Sep 2011.
- REVERCHON, E. *et al.* Interactions of phase equilibria, jet fluid dynamics and mass transfer during supercritical antisolvent micronization. **Chem. Eng. J.**, v. 156, p. 446-458, 2010.
- REVERCHON, E.; ADAMI, R. Nanomaterials and supercritical fluids. **J. Supercrit. Fluids**, v. 37, p. 1-22, 2006.
- ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; WELLER, P. J. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6. ed. London/Washington: Pharmaceutical Press and American Pharmaceutical Association, v. 1, 2009. 2215 p.



- SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; MALMONGE, S. M. A. S. E. B. Polímeros usados como sistemas de transporte de princípios ativos. **Polímeros**, v. 21, n. 5, p. 361-368, Epub Nov. 2011. ISSN 0104-1428.
- SHAHIWALA, A.; AMIJI, M. M. Nanotechnology-based delivery systems in HIV/AIDS therapy. **Future HIV Ther.**, v. 1, p. 49-59, 2007.
- SHARIATI, A.; PETERS, C. J. Recent developments in particle design using supercritical fluids. **Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.**, v. 7, p. 371-383, 2003.
- SHETH, P. *et al.* Nanoparticles in the pharmaceutical industry and the use of supercritical fluid technologies for nanoparticle production. **Curr. Drug Deliv.**, v. 9, n. 3, p. 269-284, May 2012.
- VON BRIESEN, H.; RAMGE, P.; KREUTER, J. Controlled release of antiretroviral drugs. **AIDS Rev.**, v. 2, p. 31-38, 2000.
- YOSHIDA, V. M. H. *et al.* Development and evaluation of a floating multiparticulate gastroretentive system for modified release of AZT. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 2, p. 658-664, 2011.
- ZANCHETTA, B. *et al.* Estabilidade e absorção intestinal de medicamentos contendo isoniazida preparados extemporaneamente em farmácias institucionais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, p. 319-321, 2008.
- ZHANG, S.; ULUDAĞ, H. Nanoparticulate systems for growth factor delivery. **Pharm. Res.**, v. 26, n. 7, p. 1561-1580, 2009.