

**Andreia Sofia Martins Trino**

**ESTUDO SISTEMÁTICO DA FORMAÇÃO DE ESTRUTURA EM  
PROCESSOS DE MICROENCAPSULAÇÃO POR EVAPORAÇÃO DE  
SOLVENTE**

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Química Farmacêutica  
Industrial

Orientadores: Professor Doutor Fernando Pedro Martins Bernardo  
Professor Doutor Jorge António Ribeiro Salvador

Coimbra, Setembro de 2012



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Agradecimentos

A realização deste trabalho só se tornou possível com a colaboração e apoio de várias pessoas, tornando-o numa experiência enriquecedora. Deste modo quero expressar os meus sinceros agradecimentos a todos os que, de alguma forma, empenharam esforços na sua execução.

Antes de mais, o meu agradecimento aos orientadores, que proporcionaram todo o acompanhamento do trabalho desenvolvido. Ao Professor Doutor Fernando Bernardo pela presença constante e definição de linhas orientadoras, que me ampararam ao longo do percurso. Agradeço a motivação e o incansável empenho. Ao Professor Doutor Jorge Salvador pela sua perspicácia e dedicação à área farmacêutica, o que proporciona a ambição de desenvolvimento de projectos inovadores.

À Professora Doutora M. Graça Rasteiro pela dedicação e disponibilidade demonstrada ao longo do trabalho proposto. Agradeço a motivação e o incansável empenho.

Ao Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra, nomeadamente à Eng.<sup>a</sup> Maria João Bastos e Doutora Paula Calvino por toda a disponibilidade demonstrada.

Ao Laboratório de Resistência dos Materiais do Instituto Pedro Nunes, nomeadamente ao Eng.<sup>o</sup> Vitor Redondo que colaborou de modo empenhado na garantia da representatividade das amostras.

Ao Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Coimbra pela colaboração na análise de microscopia electrónica de varrimento, o que se veio a tornar uma importante mais-valia nos resultados alcançados.

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra por todo o afecto com que me receberam.

À colega de curso e amiga, Graça Rodrigues, por toda o apoio ao longo do trabalho e momentos de convívio, essenciais para o desenvolvimento deste.

A todos os amigos que me acompanharam no percurso académico e que fizeram dele uma viagem fantástica. Aos que sempre me apoiaram e contribuíram para o alcance de mais

um objectivo. A todos os professores que fizeram parte deste mesmo percurso pelo conhecimento.

A todos os familiares cujo apoio e confiança foram determinantes.

Aos meus pais, por todos os ensinamentos e princípios transmitidos e pela oportunidade e confiança em mim.

Ao Luís, pelo apoio incondicional, pela constante confiança depositada em mim, e por nunca me deixar desanimar. Obrigado por seres o meu pilar!

## Resumo

O processo de microencapsulação pela técnica de evaporação de solvente tem sido amplamente utilizado na área farmacêutica devido, principalmente, à sua simplicidade. O objectivo deste trabalho é desenvolver um estudo, de forma sistemática, da formação de microcápsulas pela técnica de microencapsulação por evaporação de solvente, em função da formulação inicial e das condições do processo de fabrico. Este trabalho insere-se num objectivo mais amplo, que é compreender a gama de microestruturas que é possível fabricar, e assim poder desenvolver novas formulações de forma mais sustentada e eficiente.

Numa primeira fase, estabeleceu-se um caso de estudo (encapsulação de aspirina em etilcelulose, usando acetato de etilo como solvente e partindo de uma emulsão do tipo o/w), respectiva formulação de base e procedimento detalhado de fabrico laboratorial. Seleccionou-se ainda um conjunto de técnicas de análise da composição e microestrutura das microcápsulas produzidas. Numa segunda fase, foram efectuados diversos testes, variando a formulação inicial do produto e condições do processo de fabrico.

A análise das microcápsulas produzidas revelou resultados importantes, principalmente quanto a características de superfície das partículas e à importância de algumas técnicas de análise para um estudo sistemático de formação de microcápsulas.

**Palavras-chave:** Microencapsulação, evaporação de solvente, emulsificação, aspirina, etilcelulose, microestrutura

## Abstract

Microencapsulation by solvent evaporation is a widely used process in pharmaceutical applications, mainly due to its simplicity. The purpose of this work is to develop a systematic study of microcapsules formation using this technique, as a function of initial product formulation and processing conditions. This work is grounded on a wider objective, which is to understand the range of microstructures that is possible to produce with a given technology and thus develop new formulations more efficiently.

In a first stage, a case study was established (encapsulation of aspirin in ethylcellulose, using ethyl acetate as solvent and an o/w emulsion-based process), as well as a corresponding base formulation and detailed lab-scale manufacturing procedure). Further, a set of analytical techniques was selected to determine microcapsules composition and microstructure. In a second stage, several tests were performed, varying initial product formulation and manufacturing process conditions.

The analysis of the produced microcapsules has revealed important results, mainly regarding surface characteristics of the particles and the importance of some analytical techniques to perform a systematic study of microcapsules formation.

**Keywords:** Microencapsulation, solvent evaporation, emulsification,  
aspirin, ethylcellulose, microstructure

# Índice

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>1.</b> | <b>APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA E OBJECTIVOS.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2.</b> | <b>ENQUADRAMENTO.....</b>   | <b>3</b>  |
| 2.1       | Projecto de produto, produtos estruturados e processos de criação de microestrutura ..... | 3         |
| 2.2       | Processos de microencapsulação.....   | 5         |
| 2.3       | Microencapsulação por evaporação de solvente .....  | 13        |
| 2.4       | Técnicas de análise .....   | 19        |
| 2.4.1     | Espectroscopia UV-vis .....   | 19        |
| 2.4.2     | Espectroscopia de difracção laser .....   | 21        |
| 2.4.3     | Potencial zeta.....   | 22        |
| <b>3.</b> | <b>MÉTODOS.....</b>   | <b>25</b> |
| 3.1       | Plano geral do estudo efectuado .....   | 25        |
| 3.2       | Caso de estudo .....  | 28        |
| 3.3       | Processo laboratorial de fabrico das microcápsulas.....                                   | 31        |
| 3.4       | Técnicas de análise .....   | 35        |
| 3.4.1     | Eficiência de encapsulação .....  | 35        |
| 3.4.2     | Distribuição de tamanhos.....   | 37        |
| 3.4.3     | Potencial zeta.....   | 37        |
| 3.4.4     | Microscopia óptica.....   | 38        |
| 3.4.5     | Microscopia electrónica de varrimento (MEV) .....   | 38        |
| 3.4.6     | Testes de libertação .....  | 38        |
| <b>4.</b> | <b>RESULTADOS .....</b>   | <b>40</b> |
| 4.1       | Teste base e outros resultados primários .....  | 41        |
| 4.2       | Resultados globais e análise comparativa.....   | 48        |
| <b>5.</b> | <b>CONCLUSÕES.....</b>  | <b>56</b> |
|           | <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>  | <b>58</b> |
|           | <b>ANEXO A.....</b>   | <b>62</b> |
|           | <b>ANEXO B.....</b>   | <b>65</b> |
|           | <b>ANEXO C.....</b>   | <b>66</b> |
|           | <b>ANEXO D.....</b>   | <b>72</b> |

## Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 – Dois tipos de microcápsulas: A – tipo núcleo/casca; B – tipo matriz (adaptado da ref. 3). .....  | 5  |
| Figura 2 – Exemplo de um processo de coacervação complexa (adaptado da ref. 3). .....   | 8  |
| Figura 3 Exemplo de um processo de microencapsulação baseado em incompatibilidade polímero-polímero (adaptado da ref. 3). .....                                       | 9  |
| Figura 4 – Formação da casca num processo de polimerização interfacial (adaptado da ref. 3). .....  | 10 |
| Figura 5 - Etapas básicas de microencapsulação por evaporação de solvente (adaptado da ref. 8). .....   | 14 |
| Figura 6 – Modo de funcionamento do UV-vis (adaptado de ref. 15 e 16). .....  | 20 |
| Figura 7 – Reacção de hidrólise do ácido acetilsalicílico. ....   | 21 |
| Figura 8 – Espectro característico de cada um dos compostos, ácido salicílico e ácido acetilsalicílico, em separado (em solução de etanol + água) <sup>17</sup> ..... | 21 |
| Figura 9 – Funcionamento da técnica de difracção de raios laser (adaptado da ref. 21). .....  | 22 |
| Figura 10 – Representação do potencial zeta (adaptado da ref. 24). .....  | 23 |
| Figura 11 - Distribuição do potencial zeta para uma amostra de AAS em meio aquoso (4 leituras consecutivas). .....  | 24 |
| Figura 12 – Diagrama de Gantt do processo de microencapsulação por evaporação de solvente. ....   | 32 |
| Figura 13 – Montagem experimental utilizada na etapa de emulsificação. ....   | 33 |
| Figura 14 – Geometria do sistema de agitação do processo <sup>37</sup> .....  | 34 |
| Figura 15 – Montagem experimental utilizada no teste de libertação. ....  | 39 |
| Figura 16 - Distribuição do potencial zeta para uma amostra de EC em meio aquoso (4 leituras consecutivas). .....   | 43 |
| Figura 17 – Distribuição do potencial zeta para uma amostra do teste base em meio aquoso (4 leituras consecutivas). .....   | 43 |
| Figura 18 – Distribuição de tamanhos de partículas do teste base (3 leituras) .....   | 44 |
| Figura 19 – Imagem de microscopia óptica (200 $\mu\text{m}$ ) de partículas do teste base. ....   | 44 |
| Figura 20 – Imagens obtidas por MEV das partículas do teste base: A) superfície externa (100 $\mu\text{m}$ ); B) interior das partículas (50 $\mu\text{m}$ ). .....   | 45 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 21 – Percentagem de AAS libertado em função do tempo, em horas (Teste de Libertação do teste base).....                | 46 |
| Figura 22 – Distribuição do tamanho das partículas dos testes base, SatAAS+, N+ e T+.....                                     | 49 |
| Figura 23 – Distribuição do tamanho das partículas dos testes base e AAS-.....  | 49 |
| Figura 24 – Imagens de microscopia óptica (200 $\mu\text{m}$ ) das partículas para os vários teste realizados. ....           | 50 |
| Figura 25 – Imagens obtidas por MEV da superfície das partículas dos vários testes realizados (100 $\mu\text{m}$ ). ....      | 52 |
| Figura 26 – Imagens obtidas por MEV do interior das partículas do teste base e do teste T+ (50 $\mu\text{m}$ ) .....          | 53 |
| Figura 27 – Testes de libertação para os testes base, SatAAS+ e T+ durante 24 horas. ....                                     | 54 |
| Figura 28 – Curva de calibração obtida para padrões de ácido acetilsalicílico em etanol puro, $\lambda = 275\text{nm}$ . .... | 67 |
| Figura 29 – Curva de calibração obtida para padrões de ácido salicílico em etanol puro, para $\lambda = 302\text{nm}$ . ....  | 69 |
| Figura 30 – Curva de calibração obtida para padrões de ácido salicílico em etanol puro, para $\lambda = 275\text{nm}$ . ....  | 70 |
| Figura 31 – Curva de calibração obtida para padrões de ácido acetilsalicílico .....   | 73 |

## Índice de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 – Principais características de alguns processos de microencapsulação. ....  | 6  |
| Tabela 2 - Materiais usados na microencapsulação, função básica e influência nas propriedades das microcápsulas .....                                     | 17 |
| Tabela 3 – Influência de alguns parâmetros do processo nas propriedades finais das microcápsulas. ....  | 18 |
| Tabela 4 – Parâmetros analisados e respectivas técnicas de análise .....  | 25 |
| Tabela 5 – Solventes alternativos e suas propriedades. ....   | 29 |
| Tabela 6 – Propriedades dos ingredientes utilizados. ....   | 29 |
| Tabela 7 – Formulação base. ....  | 30 |
| Tabela 8 – Fornecedor e especificações dos ingredientes utilizados. ....  | 30 |
| Tabela 9 – Lista dos equipamentos utilizados. ....  | 35 |
| Tabela 10 – Testes efectuados: teste base e quatro variantes, variando quatro parâmetros de entrada, um de cada vez (variação assinalada a negrito). .... | 40 |
| Tabela 11 – Valores de eficiência de encapsulação, concentração de AAS nas microcápsulas e eficiência global, para o teste base. ....                     | 41 |
| Tabela 12 – Balanço mássico ao AAS. ....  | 42 |
| Tabela 13 – Resultados de eficiência e distribuição de tamanhos para duas réplicas do teste base e do teste SatAAS . ....                                 | 47 |
| Tabela 14 – Tabela resumo dos principais resultados obtidos, pelas diversas técnicas de análise e para os diferentes testes efectuados. ....              | 48 |
| Tabela 15 – Concentração de acetato de etilo no extracto ao longo do tempo de evaporação. ....  | 65 |
| Tabela 16 – Valores de concentração dos padrões utilizados para construção da curva de calibração. ....   | 66 |
| Tabela 17 – Valores de absorvância, para $\lambda=275\text{nm}$ , obtidos na leitura dos padrões de ácido acetilsalicílico. ....                          | 67 |
| Tabela 18 – Valores de concentração dos padrões utilizados para construção da curva de calibração. ....   | 68 |
| Tabela 19 – Valores de absorvância, para $\lambda=302\text{nm}$ , obtidos na leitura dos padrões. ....  | 68 |
| Tabela 20 – Valores de absorvância, para $\lambda=275\text{nm}$ , obtidos na leitura dos padrões. ....  | 69 |
| Tabela 21 – Valores de concentração dos padrões utilizados para construção da curva de calibração .....   | 72 |
| Tabela 22 – Valores de absorvância, para $\lambda=296\text{nm}$ , obtidos na leitura dos padrões de ácido acetilsalicílico. ....                          | 73 |

## SIGLAS

3D – 3 Dimensões

AAS – Ácido acetilsalicílico

AS – Ácido salicílico

HLB – Balanço hidrófilo/lipófilo

EC – Etilcelulose

IA – Ingrediente activo

LD50 – Mediana da dose letal

MEV – Microscopia electrónica de varrimento

UV-vis – Espectrometria de absorção molecular do visível e ultravioleta

o/w – Óleo em água

w/o/w – Água/óleo/água

w/o – Água em óleo

ZP<sub>médio</sub> – Potencial zeta médio

## 1. Apresentação do problema e objectivos

A microencapsulação está presente em várias áreas, desempenhando um papel importante na área farmacêutica, como por exemplo na libertação controlada de fármacos para o organismo a partir de microcápsulas. O desempenho das microcápsulas em determinada aplicação depende naturalmente da sua composição, mas também de atributos estruturais, como o tamanho e a porosidade das microcápsulas. Neste trabalho, mais do que desenvolver uma aplicação específica, pretende-se estudar qual o leque de microestruturas que é possível fabricar e como os atributos estruturais obtidos dependem da formulação inicial do produto e das condições de fabrico. A técnica de fabrico escolhida é a microencapsulação por evaporação de solvente e o estudo de criação de estrutura é baseado num caso particular, que é a produção de microcápsulas de aspirina, usando etilcelulose como agente encapsulante. Tendo este caso de estudo em vista, definem-se então os objectivos mais específicos do trabalho: (i) estabelecer uma formulação-base do produto e respectivo protocolo de produção laboratorial; (ii) seleccionar um conjunto de técnicas de análise da composição e estrutura das microcápsulas produzidas; (iii) planear e executar um conjunto de testes de fabrico e análise de microcápsulas, no sentido de estudar a relação microestrutura *versus* formulação e condições de processamento.

O presente trabalho insere-se num objectivo mais abrangente, que é uma compreensão mais sistemática da relação entre a microestrutura do produto e as condições de processamento, e a utilização desse conhecimento para o desenvolvimento mais eficiente de novas formulações, cujo desempenho dependa fortemente da microestrutura. Esta perspectiva geral da relação processo-microestrutura é ainda rara na literatura, que na sua maioria se centra na optimização da formulação do produto e das condições de microencapsulação, para determinadas aplicações específicas, sendo muitas vezes difícil a extrapolação dos resultados para novas formulações. O caso de estudo aqui apresentado e o conjunto de técnicas propostas para caracterização das microcápsulas produzidas constituem um contributo relevante para este objectivo mais ambicioso de compreensão da relação processo-microestrutura.

Para além do presente capítulo, esta dissertação de mestrado está organizada como se segue. No capítulo 2, faz-se um enquadramento alargado do trabalho, focando diversos aspectos, do mais geral para o particular: (i) conceitos de produtos estruturados e processos de

criação de microestrutura; (ii) princípios fundamentais de diversos processos de microencapsulação; (iii) descrição mais detalhada do processo adoptado neste trabalho, que é a microencapsulação por evaporação de solvente; (iv) princípios básicos de algumas das técnicas utilizadas para analisar as microcápsulas produzidas. De seguida, no capítulo 3, apresenta-se a metodologia de trabalho adoptada, incluindo o plano geral do estudo, a construção do caso de estudo particular, o processo laboratorial de fabrico das microcápsulas e ainda os procedimentos adoptados no conjunto de técnicas de caracterização das microcápsulas. Em seguida, no capítulo 4, são apresentados os resultados obtidos, tanto no teste base como nos demais testes efectuados. Por fim, no capítulo 5, apresentam-se as principais conclusões deste estudo e propõem-se sugestões de trabalho futuro.

## 2. Enquadramento

### 2.1 Projecto de produto, produtos estruturados e processos de criação de microestrutura

O domínio dos produtos químicos é hoje entendido como englobando os químicos de base produzidos em grande escala, como seja várias moléculas da fileira petroquímica, e também produtos mais especializados, produzidos em menor quantidade, como produtos farmacêuticos, biológicos e alimentares, entre outros. O valor comercial destes produtos mais sofisticados é determinado pela satisfação do cliente, e não tanto pela sua composição ou grau de pureza, pelo que o conhecimento das necessidades dos clientes é um factor crítico de sucesso<sup>1,2</sup>.

Nos últimos anos e com a crescente importância deste leque alargado de produtos químicos, muitas vezes complexos, houve a necessidade de introduzir uma subdisciplina em engenharia química, designada projecto de produto. Trata-se essencialmente de, e em primeiro lugar, conceber e especificar o produto de acordo com as necessidades dos clientes, e só depois numa segunda fase, projectar o respectivo processo de fabrico.

Projecto de produto pode ser definido por uma série de etapas<sup>2</sup>:

1. Desenvolvimento de conceitos, onde a ideia do produto é criada e há uma selecção inicial de alternativas;
2. Nível de projecto do sistema, onde o produto é conceptualmente decomposto em subsistemas;
3. Projecto detalhado, com a primeira especificação do produto e respectivo processo de fabrico;
4. Testes e aperfeiçoamentos, realizados através de prototipagem e experiências;
5. Início da produção, onde a capacidade de produção é estabelecida;
6. Lançamento do produto e fabrico à escala comercial.

Os produtos químicos formulados, constituídos por vários ingredientes (tipicamente 10 a 20), podem classificar-se em produtos homogéneos e produtos estruturados. As

propriedades dos produtos homogêneos advêm exclusivamente dos seus componentes e suas quantidades, enquanto no caso dos produtos estruturados as propriedades são também definidas pela sua microestrutura. Alguns exemplos de produtos estruturados são a margarina, a manteiga, a maionese, o detergente, sabões e cremes. No caso da maionese, as propriedades não advêm só dos seus componentes, óleo, água, vinagre e ovo, mas essencialmente da forma como eles estão estruturados à escala do micrómetro (a maionese é essencialmente uma emulsão concentrada óleo-em-água, estabilizada por emulsionantes presentes no ovo) <sup>1</sup>.

Nos produtos estruturados, o projecto de produto e do respectivo processo de fabrico devem ser desenvolvidos em simultâneo, uma vez que a microestrutura é em grande parte determinada pelo processo de fabrico. Por exemplo, a microestrutura da maionese depende da agitação fornecida e da ordem de adição dos componentes. Na linguagem de projecto de produto, a relação entre a microestrutura e as condições de fabrico designa-se genericamente por função processo. É precisamente a função processo no caso do fabrico de microcápsulas, pequenas partículas contendo um ingrediente activo, com aplicações várias na área alimentar e farmacêutica, que nos propomos a estudar neste trabalho.

Seguidamente serão apresentados os principais métodos de microencapsulação.

## 2.2 Processos de microencapsulação

Microcápsulas são pequenas partículas contendo um material central, por vezes designado por ingrediente activo (IA), rodeado por um revestimento. Relativamente ao tamanho, são aceites os seguintes intervalos: caso a cápsula tenha um diâmetro inferior a 1  $\mu\text{m}$ , diz-se que é uma nanocápsula, ao passo que se o diâmetro foi superior a 1000  $\mu\text{m}$  <sup>3</sup> é considerada uma macrocápsula. As cápsulas que se encontram entre estes extremos designam-se por microcápsulas. A maioria das microcápsulas que se encontram no mercado têm entre 3 e 800  $\mu\text{m}$  e a massa do material central pode variar entre 10 a 90% da massa total. Há uma vasta gama de produtos que já foram encapsulados, tais como células vivas, enzimas activadas, sabores, perfumes, fármacos, entre outros. Os materiais mais utilizados no revestimento das cápsulas são polímeros <sup>3</sup>.

As microcápsulas podem ter várias estruturas, representando-se na Figura 1 dois casos extremos <sup>3</sup>. Podem ser esféricas, com um núcleo contendo o IA, envolto numa casca contínua, designando-se nesse caso por microcápsulas do tipo núcleo/casca, ou podem ser uma dispersão irregular do ingrediente activo numa matriz contínua do material encapsulante, sendo neste caso denominadas microcápsulas do tipo matriz.

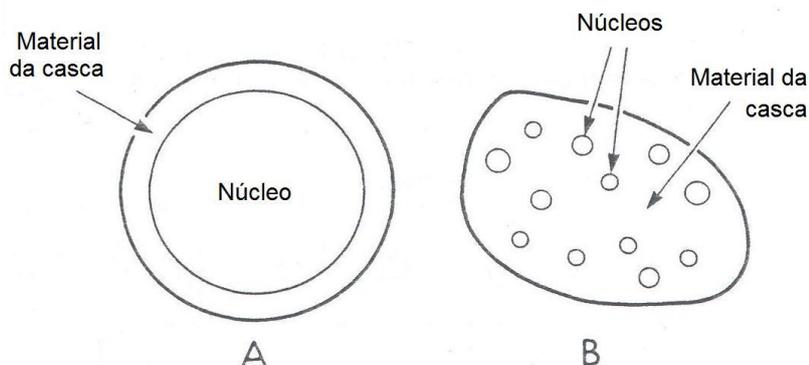


Figura 1 – Dois tipos de microcápsulas: A – tipo núcleo/casca; B – tipo matriz (adaptado da ref. 3).

As microcápsulas podem ser utilizadas com diferentes objectivos <sup>4</sup>. Por exemplo:

- *Imobilização ou aprisionamento* – quando se pretende limitar o contacto entre determinadas partes de um sistema. A encapsulação de um determinado ingrediente permite que ele permaneça isolado enquanto a microcápsula mantém a sua estrutura, e que contacte depois com o meio exterior, após a ruptura da microcápsula.

▪ *Protecção* – no caso de ingredientes frágeis que necessitam de ser protegidos de ambientes agrestes. As vitaminas, por exemplo, são desnaturadas pelo oxigénio e podem ser encapsuladas para serem protegidas de meios ricos em oxigénio.

▪ *Libertação controlada* – quando se pretende que um determinado ingrediente activo seja libertado em face de um determinado estímulo, que provoca a ruptura da microcápsula, ou quando se pretende a libertação com velocidade controlada.

A par de diversas aplicações e objectivos, há também diferentes processos de fabrico de microcápsulas. De seguida, apresentam-se os princípios fundamentais dos diferentes processos e as principais características das cápsulas obtidas. Esta informação encontra-se também resumida na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1 – Principais características de alguns processos de microencapsulação.

|  | <b>Princípios Gerais</b>   | <b>Material a encapsular</b>                       | <b>Principais características das cápsulas obtidas</b>  |
|--|--|--|---|
| <b>Coacervação Complexa</b>                | Precipitação de dois polímeros e adsorção do precipitado à superfície de uma fase dispersa                       | Líquidos imiscíveis em água                        | - 20-800 µm diâmetro<br>- Estrutura núcleo/casca<br>- Sensíveis à humidade                                      |
| <b>Incompatibilidade Polímero-Polímero</b> | Separação de duas fases, ricas em polímeros diferentes; adsorção de uma delas à superfície de partículas sólidas | Sólidos com um grau finito de solubilidade em água | - 200-800µm diâmetro<br>- Forma irregular   |
| <b>Polimerização Interfacial</b>           | Reacção química  | Líquidos   | - 20-30µm diâmetro<br>- Estrutura núcleo/casca<br>- Geometria esférica<br>- Superfície exterior lisa e uniforme |
| <b>Spray Drying</b>                        | Pulverização de dispersão/solução, seguida de evaporação de solvente   | Vários   | - 10-300µm diâmetro<br>- Geometria irregular<br>- Estrutura do tipo matriz                                      |
| <b>Evaporação de Solvente</b>              | Emulsificação, seguida de evaporação de solvente   | Vários   | Variável  |
| <b>Revestidores de Leito Fluidizado</b>    | Pulverização de líquido de revestimento, seguida de evaporação de solvente                                       | Partículas sólidas/porosas                         | Variável  |

### 2.2.1 Coacervação complexa

Este processo baseia-se em interações específicas entre dois polímeros, habitualmente solúveis em água, e que em determinadas condições apresentam cargas superficiais de sinal oposto. Geralmente, o polímero catiónico usado é a gelatina. Quanto ao polímero aniônico existem várias possibilidades.

A Figura 2 esquematiza um exemplo de um processo de microencapsulação por coacervação complexa<sup>3</sup>. O primeiro passo consiste em dispersar o material do núcleo numa solução aquosa de gelatina, a uma temperatura de 40 a 60 °C. De seguida, adiciona-se ao sistema um segundo polímero, como por exemplo a goma arábica, e ajusta-se o pH tal que os polímeros ficam carregados com cargas opostas. Os polímeros formam então aglomerados – chamados de coacervados complexos – que adsorvem preferencialmente à superfície do material disperso. A gama de pH para coacervação é tipicamente de 4,0 a 4,5. Após a formação do coacervado complexo, o sistema é arrefecido até à temperatura ambiente, ocorrendo gelificação do coacervado, constituindo este gel o revestimento da microcápsula. A fim de aumentar a resistência do revestimento e criar uma estrutura que não seja termicamente reversível, o sistema é ainda arrefecido até cerca de 10°C e tratado com glutaraldeído, que vai formar ligações cruzadas com o coacervado (*crosslinking*).

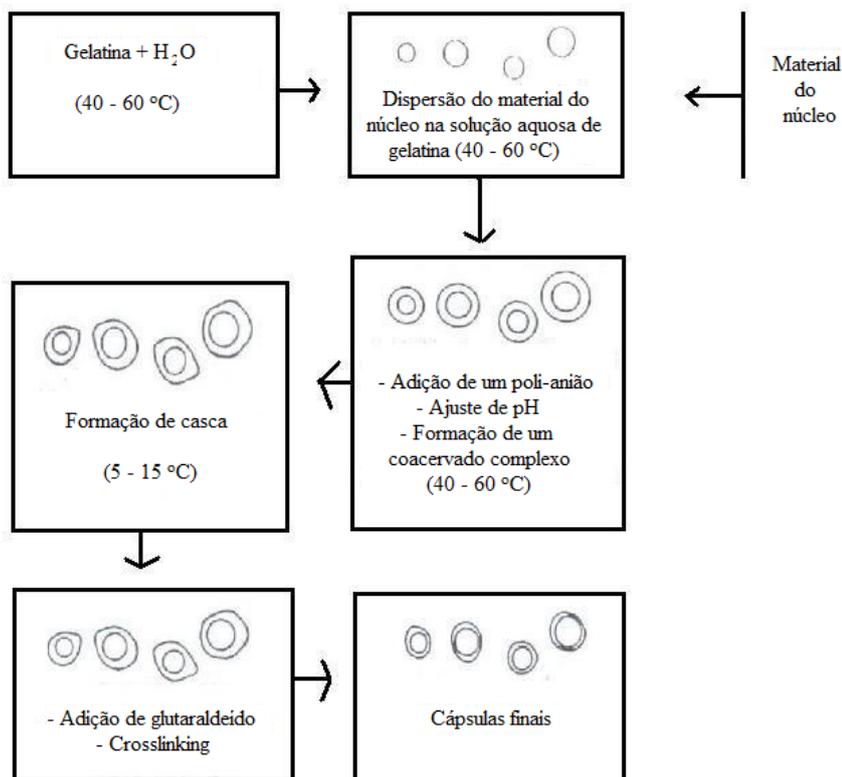


Figura 2 – Exemplo de um processo de coacervação complexa (adaptado da ref. 3).

O método de coacervação é usado principalmente para encapsular líquidos imiscíveis em água e forma cápsulas com 20 a 800 µm de diâmetro. A massa do material encapsulado pode ascender a 80 a 90% da massa total da microcápsula. A maioria das cápsulas produzidas por esta técnica têm uma estrutura de núcleo/casca, embora a casca não tenha uma espessura uniforme. Geralmente, estas cápsulas são sensíveis à humidade. Por vezes, para tentar reduzir a sensibilidade à humidade, trata-se as cápsulas com ureia e formaldeído em condições ácidas<sup>3</sup>.

### 2.2.2 Incompatibilidade polímero-polímero

Esta técnica baseia-se no fenómeno de separação de fases que ocorre quando se tem dois polímeros quimicamente diferentes, dissolvidos num mesmo solvente.

A Figura 3 exemplifica um processo deste tipo nas suas várias etapas<sup>3</sup>. O primeiro passo é dispersar o material do núcleo numa solução de etilcelulose em ciclo-hexano a cerca

de 80°C. De seguida, adiciona-se polietileno de baixo peso molecular, que é solúvel em ciclohexano quente mas que é incompatível com a etilcelulose. Induz-se assim a separação de fases, com a formação duma fase rica em etilcelulose e outra rica em polietileno. O material do núcleo vai ficar disperso neste sistema de duas fases. Uma vez que a etilcelulose é mais polar que o polietileno, vai adsorver preferencialmente à superfície do material do núcleo até formar uma fina camada que o envolve. Posteriormente arrefece-se o sistema até à temperatura ambiente, o que provoca a precipitação da etilcelulose e logo a formação das microcápsulas.

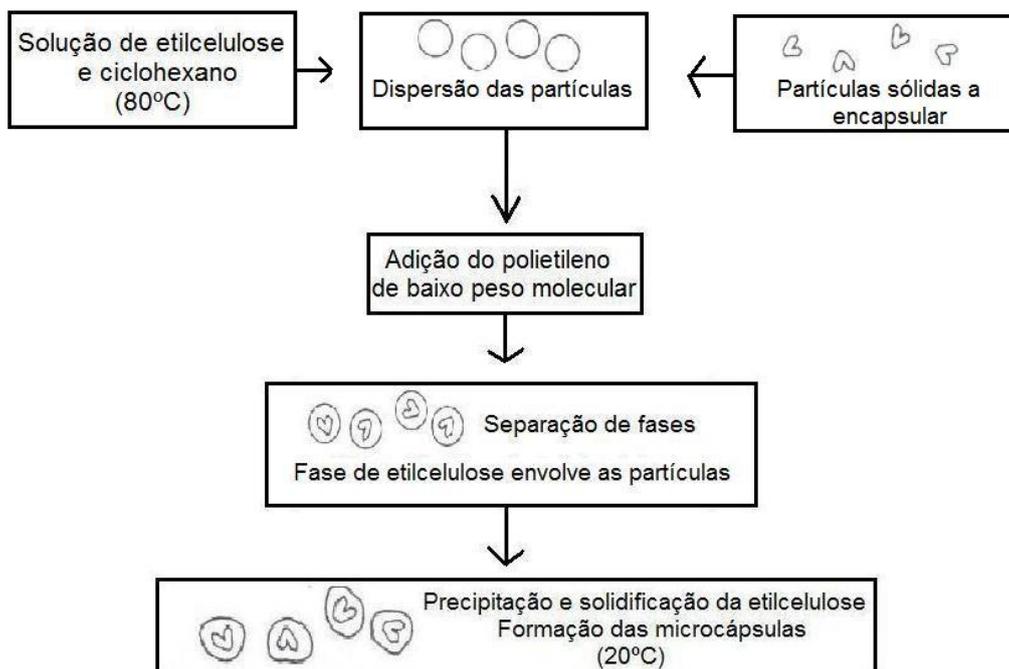


Figura 3 Exemplo de um processo de microencapsulação baseado em incompatibilidade polímero-polímero (adaptado da ref. 3).

Esta técnica de microencapsulação é utilizada habitualmente para encapsular sólidos com um grau finito de solubilidade em água, incluindo fármacos. As cápsulas produzidas têm forma irregular e tamanho entre 200 e 800  $\mu\text{m}$ . A aspirina e o cloreto de potássio são exemplos comerciais de produtos farmacêuticos encapsulados por esta técnica<sup>3</sup>.

### 2.2.3 Polimerização interfacial (PI)

Esta técnica tem uma característica que a torna única. A cápsula é formada dentro ou sobre a superfície duma gota ou partícula por polimerização de monómeros reactivos.

O primeiro passo da técnica de PI é dissolver um monómero no material líquido do núcleo. A solução resultante é dispersada, com o tamanho de gota desejado, numa fase aquosa que contém um agente de dispersão. Um co-reagente é então adicionado à fase aquosa, o que leva a uma reacção de polimerização rápida na interface, formando-se assim a parede da cápsula. A Figura 4 ilustra este processo<sup>3</sup>.

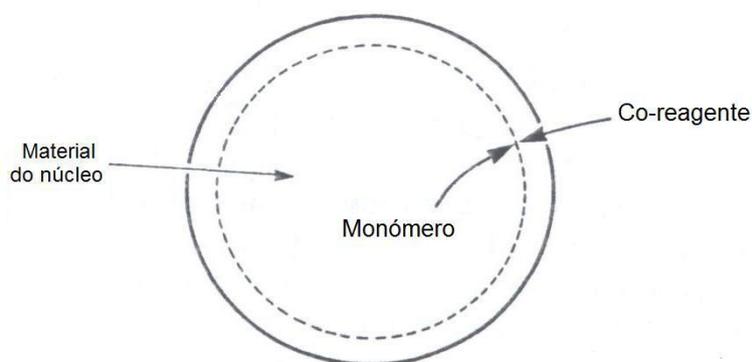


Figura 4 – Formação da casca num processo de polimerização interfacial (adaptado da ref. 3).

Também é possível encapsular sólidos usando esta técnica, embora a química da polimerização seja diferente daquela no caso de encapsulação de líquidos.

Esta técnica é muito usada para encapsular pesticidas e herbicidas. As cápsulas produzidas são normalmente esféricas com um diâmetro entre 20 a 30  $\mu\text{m}$ . A estrutura é do tipo núcleo/casca e a superfície exterior da casca é lisa e uniforme. A superfície interior revela muitas crateras e é irregular<sup>3</sup>.

### 2.2.4 Spray drying

A técnica de *spray drying* é a técnica mais antiga de encapsulação. O primeiro passo é a dispersão ou solubilização do material do núcleo (geralmente um óleo imiscível em água) numa solução concentrada do material do revestimento, muitas vezes uma solução aquosa.

Preocupações sobre inflamabilidade e toxicidade dos solventes têm restringido severamente o uso de solventes orgânicos.

A dispersão ou solução resultante é depois pulverizada em gotículas numa câmara onde circula um gás quente. As gotículas vão então rapidamente desidratadas, produzindo-se cápsulas secas, que vão cair no fundo da câmara, sendo posteriormente recolhidas.

As cápsulas produzidas por *spray drying* têm diâmetros que variam entre 10 e 300  $\mu\text{m}$  e tendem a ter uma geometria irregular. Cada cápsula tem um número de pequenas gotas ou partículas do material do núcleo dispersas por toda a cápsula, sendo portanto, cápsulas do tipo matriz. A técnica de *spray drying* tem sido muito utilizada para encapsular fragrâncias e sabores<sup>3</sup>.

#### 2.2.5 Evaporação de solvente

A microencapsulação por evaporação de solvente é amplamente utilizada na indústria farmacêutica. O material do revestimento é habitualmente um polímero. Alguns dos polímeros mais utilizados são o poli-ácido láctico e glicólico (PLGA), a etilcelulose e o diclorometano.

São possíveis diversas variantes do método, todas baseadas numa ou mais emulsões. Para o caso baseado numa emulsão do tipo óleo-em-água, o método de fabrico consiste nas seguintes etapas<sup>5</sup>:

- Dissolução do polímero e do IA num solvente orgânico;
- Emulsificação da fase orgânica (fase dispersa) numa fase aquosa (fase contínua);
- Extracção do solvente da fase dispersa para a fase contínua, seguida de evaporação do solvente, o que transforma as gotículas da fase dispersa em partículas sólidas, ou seja, nas microcápsulas.
- Recuperação e secagem das microcápsulas, eliminando-se o solvente residual.

Esta é a técnica escolhida para o nosso estudo (relação microestrutura do produto *versus* formulação e condições de processamento) e vai ser, por isso, mais aprofundada na secção 2.3.

### 2.2.6 *Revestidores de leito fluidizado*

Os revestidores de leito fluidizado baseiam-se na suspensão de um leito de partículas sólidas, que irão constituir o material do núcleo, numa corrente de gás, geralmente ar. A formulação líquida para o revestimento é pulverizada sobre este leito fluidizado. Este revestimento líquido é depois seco por evaporação de solvente ou por refrigeração. As operações de revestimento líquido e secagem são repetidas até que seja alcançada a espessura desejada para o revestimento.

Os revestidores de leito fluidizado representam um grande investimento de capital, mas são amplamente utilizados no encapsulamento de sólidos, especialmente para a indústria farmacêutica. A grande vantagem patente neste processo é a sua capacidade de lidar com uma grande variedade de formulações de revestimento.

## 2.3 Microencapsulação por evaporação de solvente

A microencapsulação por evaporação de solvente é uma técnica muito utilizada nas indústrias farmacêuticas e muitos fármacos foram já encapsulados por esta técnica. Por exemplo, o paracetamol foi encapsulado para mascarar o seu sabor amargo <sup>6</sup> e a carbamazepina, um fármaco anticonvulso, foi encapsulado para ter uma libertação prolongada e assim ajudar na redução do número de doses diárias, tal como reduzir efeitos secundários <sup>7</sup>.

A técnica por evaporação de solvente pode ser levada a cabo de diferentes formas consoante a hidrofiliabilidade do material a encapsular, designado em algumas aplicações como o ingrediente activo (IA). Para um IA insolúvel ou pouco solúvel em água, o método de eleição é o método de emulsão óleo-em-água (o/w). Sinteticamente pode-se definir este método em quatro etapas principais (ver Figura 5) <sup>8</sup>:

- (1) Dissolução do IA hidrofóbico e do polímero encapsulante num solvente orgânico;
- (2) Emulsificação desta fase orgânica (fase dispersa) numa fase aquosa (fase contínua);
- (3) Extração do solvente da fase dispersa para a fase contínua, seguida de evaporação do solvente, o que é conseguido à custa do aumento da temperatura ou redução da pressão; as gotas da fase dispersa transformam-se assim em partículas sólidas, contendo o polímero encapsulante e o IA encapsulado;
- (4) Recuperação e secagem das microcápsulas, eliminando-se o solvente residual.

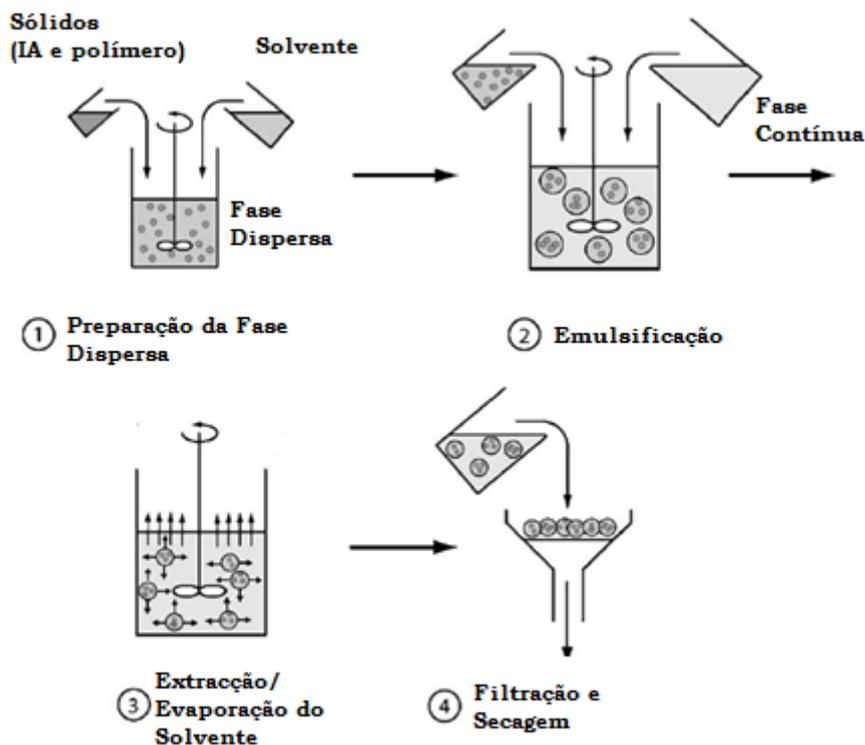


Figura 5 - Etapas básicas de microencapsulação por evaporação de solvente (adaptado da ref. 8).

O método o/w não é adequado para o encapsulamento de substâncias hidrofílicas devido a duas principais razões:

- Limitações ao nível da solubilidade do IA hidrofílico no solvente orgânico;
- O IA transfere-se para a fase contínua durante a emulsificação, reduzindo-se a quantidade que é de facto encapsulada.

Para resolver estas dificuldades, outros métodos alternativos de emulsão têm sido propostos para encapsular materiais hidrofílicos<sup>9</sup>:

1. O método de emulsão dupla, w/o/w: a solução aquosa de IA hidrofílico é primeiramente emulsionada numa fase orgânica contendo o polímero dissolvido (emulsão w/o). Esta emulsão é depois dispersa numa segunda solução aquosa, obtendo-se uma emulsão dupla do tipo w/o/w. Ao evaporar o solvente orgânico, o polímero precipita aprisionando as gotículas da fase interna.

2. O método o/w com ajuda de um co-solvente: quando o IA é pouco solúvel no solvente orgânico escolhido, adiciona-se um segundo solvente para ajudar na dissolução do fármaco.

3. O método de dispersão o/w: o fármaco não está completamente dissolvido na fase orgânica, mas está disperso na forma de pó;

4. O método de emulsão do tipo w/o: o IA é dissolvido em água ou num solvente hidrofílico, e o polímero tem que ser solúvel nesta solução; a fase contínua é uma fase hidrofóbica pouco volátil, como o óleo mineral.

Voltando ao método o/w, também o solvente orgânico pode ser problemático devido à miscibilidade parcial com o solvente da fase contínua (água ou outro solvente polar). Esta miscibilidade pode dar origem a uma extracção muito repentina do solvente orgânico para a fase contínua o que pode resultar numa microencapsulação deficiente devido à precipitação precoce do polímero. Para resolver este problema foram propostos três métodos:

- A fase contínua é pré-saturada com o solvente orgânico<sup>10</sup>;
- A fase dispersa é primeiro emulsificada numa pequena quantidade de fase contínua e, posteriormente, após a formação de gotas, esta emulsão é diluída adicionando-se à restante fase contínua<sup>11</sup>;
- A fase dispersa é emulsificada numa pequena quantidade de fase contínua, procedendo-se simplesmente à evaporação do solvente a partir desta emulsão concentrada<sup>12</sup>.

A selecção do método ideal para cada aplicação não é imediata, uma vez que depende de diversos factores: solubilidade do IA na fase dispersa e na fase contínua, miscibilidade do solvente orgânico com o solvente da fase contínua, compatibilidade do polímero com o solvente e a adequação do polímero à aplicação final. O método o/w e as suas variantes acima apresentadas oferecem contudo um bom ponto de partida para se desenhar o melhor método para cada aplicação, sendo os parâmetros de decisão mais importantes a solubilidade do IA no solvente orgânico e no solvente da fase contínua e a miscibilidade parcial dos dois solventes.

De um modo geral, a composição e microestrutura das microcápsulas obtidas dependem da formulação inicial de partida e também das condições de fabrico adoptadas. Esta relação geral é aliás o ponto de partida deste nosso trabalho, tal como enunciado no capítulo 1. Existem diversos estudos publicados sobre esta relação, mas concluir quanto a

tendências gerais é difícil, devido aos múltiplos factores envolvidos e interações específicas entre os materiais.

A título de exemplo, veja-se o estudo de Yang *et al.*<sup>13</sup> sobre a encapsulação de aspirina em etilcelulose, usando diclorometano como solvente. Estes autores estudaram a influência de três variáveis: concentração de gelatina (protector colóide, substituto do surfactante), o tamanho molecular da etilcelulose e ainda a concentração de etanol (usado como co-solvente em conjunto com o diclorometano). Como parâmetros de saída, foram avaliadas a eficiência de encapsulação, a distribuição de tamanhos das microcápsulas, as suas características de superfície e a velocidade de libertação da aspirina. Os resultados obtidos indicam que para maiores concentrações de gelatina (até 1%) obtêm-se eficiências maiores e que a adição do etanol como co-solvente leva a alterações na distribuição de tamanhos. Observa-se ainda que para máxima eficiência e maior velocidade de libertação é necessário a fase dispersa conter 25% de etanol e utilizar etilcelulose de menor peso molecular. A utilização da aspirina alivia o problema de remoção do surfactante, enquanto que o uso do etanol aumenta a velocidade de remoção do solvente durante o processo.

Muitos outros estudos poderiam ser referidos em detalhe, mas optámos antes por apresentar nas Tabelas 2 e 3 as tendências que nos parecem mais relevantes e que em princípio são genéricas, muitas delas também referidas nos artigos de revisão de Li *et al.*<sup>9</sup> e Freitas *et al.*<sup>8</sup>. Na Tabela 2 classificam-se os materiais habitualmente utilizados e a sua influência nas propriedades finais das microcápsulas, enquanto que a Tabela 3 se refere a parâmetros do processo de fabrico que também influenciam algumas propriedades das microcápsulas, em particular a sua microestrutura.

As Tabelas 2 e 3 servem de ponto de partida para o estudo sistemático que se pretende realizar. Para além do estudo da influência de um parâmetro em particular numa propriedade final das microcápsulas, será útil identificar os fenómenos fundamentais que têm lugar e o conjunto de parâmetros que os influenciam.

Tabela 2 - Materiais usados na microencapsulação, função básica e influência nas propriedades das microcápsulas

|                  | Função                               | Propriedades indispensáveis                    | Exemplos  | Propriedades das microcápsulas  |   |
|------------------|--------------------------------------|--|---|---|---|
| <b>Materiais</b> | <b>Fase Dispersa</b>                 |  |   |   |   |
|                  | Polímero                             | Agente encapsulante                            | - Biodegradabilidade<br>- Biocompatibilidade  | Etilcelulose, polimetilmetacrilato  | Velocidade de liberação do fármaco  |
|                  | Solvente                             | Dissolver IA e polímero                        | - Capacidade de dissolução do IA e do polímero<br>- Pouco solúvel na fase contínua<br>- Grande volatilidade<br>- Baixa toxicidade | Diclorometano é um dos solvente mais usados; tem a desvantagem de ser bastante tóxico.<br>Acetato de etilo é um possível substituto . | Obtêm-se geralmente cápsulas esféricas e uniformes                        |
|                  | Co-solvente                          | Aumentar a solubilidade do IA na fase dispersa | - Miscível com o solvente orgânico  | Metanol, Etanol   | Cápsulas mais concentradas de IA  |
|                  | Agente de Porosidade ou não-solvente | Gerar poros no interior da microesfera         | - Incompatível com o polímero<br>- Miscível com o solvente orgânico   | Hexano, Heptano   | Aumento da porosidade   |
|                  | <b>Fase Contínua</b>                 |  |   |   |   |
|                  | Surfactante                          | Estabilização da emulsão                       | - Balanço hidrófilo/lipófilo (HLB) adequado   | Álcool polivinílico, metilcelulose, Spans   | Diminuição do tamanho das partículas<br>Distribuição de tamanhos apertada |
| Anti-espuma      | Evitar a formação de espumas         | -  | -   | -   |   |

Tabela 3 – Influência de alguns parâmetros do processo nas propriedades finais das microcápsulas.

|                              |                                      | <b>Propriedades das microcápsulas</b> |   |
|------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---|
| <b>Parâmetros</b>            | Viscosidade da fase dispersa         | Aumento                               | Aumento no tamanho das microcápsulas<br>Aumento na eficiência de encapsulação               |
|                              | Concentração do IA na fase dispersa  | Aumento                               | Diminuição da eficiência de encapsulação  |
|                              | Fracção volumétrica da fase dispersa | Aumento                               | Diminuição no tamanho das microcápsulas   |
| <b>Condições de operação</b> | Velocidade de agitação               | Aumento                               | Diminuição do tamanho das microcápsulas   |
|                              | Temperatura                          | Aumento                               | Aumento da velocidade de evaporação, o que provoca alterações na morfologia da microcápsula |
|                              | Pressão                              | Diminuição                            | Aumento da velocidade de evaporação, o que provoca alterações na morfologia da microcápsula |

## 2.4 Técnicas de análise

Nesta secção, descrevem-se os princípios básicos de algumas das técnicas que serão usadas para caracterizar as microcápsulas, nomeadamente: (i) espectroscopia UV-vis, que será usada para quantificar o IA (aspirina) efectivamente encapsulado, assim como o IA libertado durante os testes de libertação; (ii) espectroscopia de difracção laser, usada para determinar a distribuição de tamanhos das microcápsulas; e (iii) determinação do potencial zeta, que é um parâmetro relacionado com a carga superficial das partículas (microcápsulas).

### 2.4.1 Espectroscopia UV-vis

A espectroscopia de absorção molecular do visível e ultravioleta (UV-vis) é utilizada há mais de 35 anos e durante este período tornou-se numa das análises mais importantes em laboratório, uma vez que é de baixo custo, de fácil operação e com uma boa sensibilidade <sup>14</sup>.

Esta técnica baseia-se na energia de excitação necessária para a transição de electrões entre orbitais moleculares <sup>15</sup>. Esta transição ocorre devido à absorção de luz visível e/ou ultravioleta por uma molécula que vai promover a excitação de electrões e, consequentemente, transições electrónicas.

O espectro de absorção, para uma amostra contendo o composto a analisar em solução, é obtido a partir da monitorização das intensidades da radiação incidente ( $I_0$ ) e da radiação transmitida após absorção ( $I$ ), para uma gama de comprimentos de onda. O espectro de absorção é caracterizado pela Lei de Beer-Lambert:

$$A = -\log_{10} \left( \frac{I}{I_0} \right) = \varepsilon \cdot C \cdot b$$

, onde  $A$  é a absorvância,  $C$  a concentração do soluto (mol/L),  $b$  o comprimento unitário da célula da amostra (cm) e  $\varepsilon$  a absortividade molar. Este último parâmetro é uma constante característica do soluto a analisar, para um dado comprimento de onda, um dado solvente e determinadas condições de pressão e temperatura. Para calibrar a técnica, escolhe-se habitualmente o comprimento de onda para o qual a absorvância é máxima e constrói-se uma recta de calibração absorvância vs. concentração  $C$ , determinando-se assim a constante ( $\varepsilon \cdot b$ ).

Um espectrómetro funciona basicamente como representado na Figura 6<sup>15, 16</sup>. A faixa de trabalho no ultravioleta é entre os 200 e 400nm enquanto que a faixa de trabalho do visível é entre os 400 e 760nm.

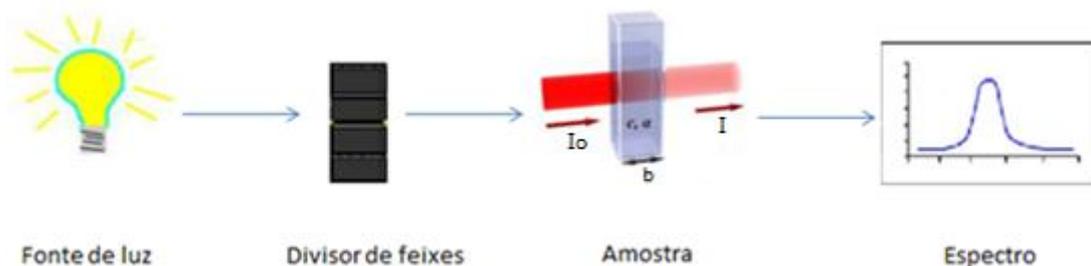


Figura 6 – Modo de funcionamento do UV-vis (adaptado de ref. 15 e 16).

Numa das nossas análises, a espectroscopia UV-vis é utilizada para quantificar dois compostos em solução: o ácido acetilsalicílico (AAS) e o ácido salicílico (AS). Este último resulta da hidrólise do primeiro (Figura 7), que nas nossas condições de análise é significativa. A Figura 8 mostra espectros característicos de cada um destes compostos em separado. O espectro característico de uma mistura AAS + AS apresenta dois picos, correspondentes às duas espécies (usando etanol puro como solvente, os picos são  $\lambda_1 = 275$  nm e  $\lambda_2 = 302$  nm, respectivamente para AAS e AS).

Para baixas concentrações, a lei de Beer-Lambert é aditiva relativamente às duas espécies, podendo escrever-se<sup>14</sup>:

$$A_1 = (\varepsilon \cdot b)_{1,AAS} \cdot C_{AAS} + (\varepsilon \cdot b)_{1,AS} \cdot C_{AS}$$

$$A_2 = (\varepsilon \cdot b)_{2,AAS} \cdot C_{AAS} + (\varepsilon \cdot b)_{2,AS} \cdot C_{AS}$$

, onde os índices 1 e 2 dizem respeito aos comprimentos de onda  $\lambda_1$  e  $\lambda_2$ . As constantes  $(\varepsilon \cdot b)$  são determinadas a partir de rectas de calibração para cada espécie e cada comprimento de onda (ao todo, 4 rectas:  $A_1$  vs.  $C_{AAS}$ ,  $A_2$  vs.  $C_{AS}$ ,  $A_1$  vs.  $C_{AS}$  e  $A_2$  vs.  $C_{AAS}$ ). Para uma amostra binária (AAS + AS), as concentrações das duas espécies são obtidas lendo as absorvâncias  $A_1$  e  $A_2$  no espectro da mistura e resolvendo depois o sistema de duas equações lineares acima.

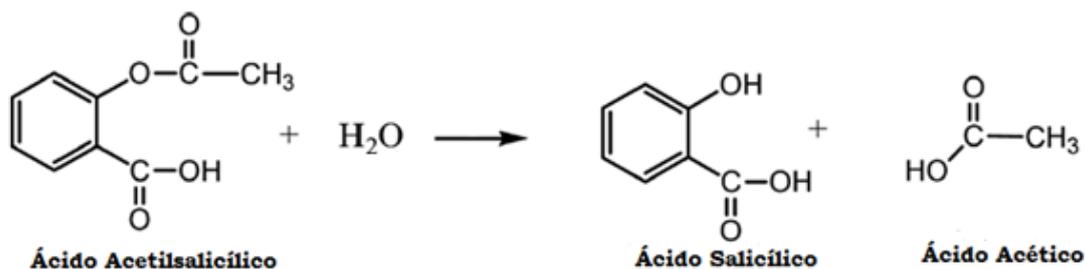


Figura 7 – Reacção de hidrólise do ácido acetilsalicílico.

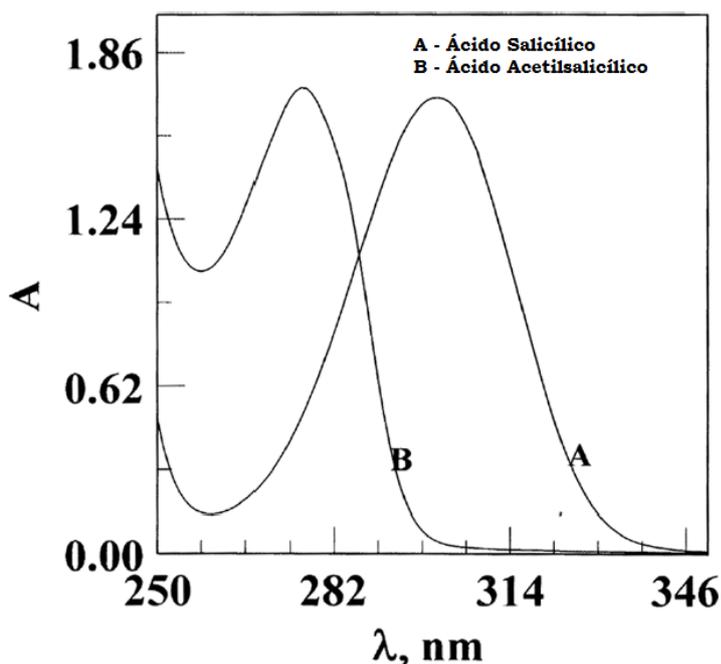


Figura 8 – Espectro característico de cada um dos compostos, ácido salicílico e ácido acetilsalicílico, em separado (em solução de etanol + água)<sup>17</sup>.

#### 2.4.2 Espectroscopia de difracção laser

A distribuição de tamanhos de partículas em suspensão pode ser determinada através da técnica de difracção de raios laser. A análise é feita fazendo-se incidir um feixe de raios laser sobre uma amostra de partículas dispersas, onde há medição da intensidade da luz dispersa<sup>18</sup>, em função do ângulo de dispersão<sup>19</sup>. O ângulo de dispersão formado será inversamente proporcional ao tamanho dessa partícula. A intensidade angular da luz dispersa será medida através de uma série de detectores fotossensíveis<sup>20</sup>. O fundamento da tecnologia utilizada nesta técnica encontra-se esquematizado na Figura 9<sup>21</sup>.

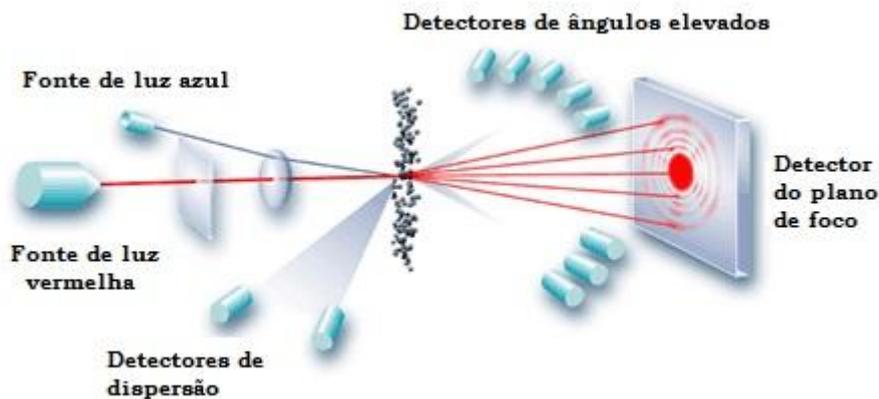


Figura 9 – Funcionamento da técnica de difracção de raios laser (adaptado da ref. 21).

### 2.4.3 Potencial zeta

O potencial zeta é uma medida indirecta da carga superficial de uma partícula. Quando uma partícula se encontra dispersa num meio aquoso, a sua carga superficial vai alterar a distribuição dos iões envolventes, resultando numa dupla camada eléctrica, tal como representado na Figura 10<sup>22</sup>. O potencial zeta é a diferença entre o potencial eléctrico na superfície externa da dupla camada eléctrica e o potencial no todo do meio de dispersão<sup>23</sup>. O potencial zeta depende assim não apenas da superfície da partícula mas também do meio de dispersão, e em particular do seu pH.

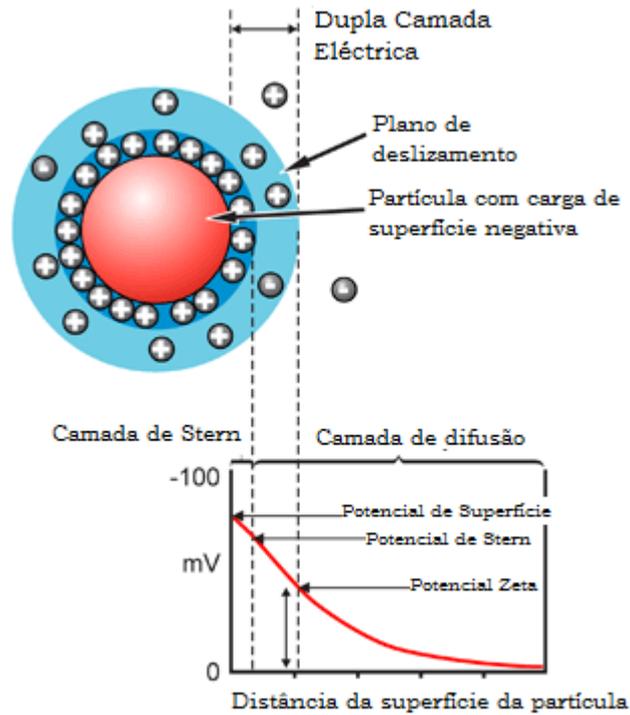


Figura 10 – Representação do potencial zeta (adaptado da ref. 24).

O potencial zeta não é medido directamente, mas encontra-se relacionado com a mobilidade electroforética. A mobilidade electroforética é a velocidade com que uma partícula carregada em suspensão é atraída para o pólo de carga oposta quando é aplicado um campo eléctrico. O potencial zeta relaciona-se com a mobilidade electroforética a partir da relação de Helmholtz-Smoluchowski<sup>25</sup>.

$$\zeta = \frac{4 \pi \eta v}{\epsilon_r \epsilon_0}$$

Onde  $\zeta$  é o potencial zeta (mV),

$\eta$  é a viscosidade do meio de dispersão ( $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}$ ),

$v$  é a mobilidade electroforética ( $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}/\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ )

$\epsilon_r$  é a constante dieléctrica (adimensional),

$\epsilon_0$  é a permissividade do ar ( $8,854 \times 10^{-12} \text{ C}^2\text{J}^{-1}\text{m}^{-1}$ ).

Sendo o meio de dispersão a água a 25°C,  $\varepsilon_r = 79$  e  $\eta = 8,95 \times 10^{-4} \text{ Nm}^{-2}\text{s}$ , a equação vai reduzir-se a:

$$\zeta = 12,83 v$$

Um valor elevado, em módulo, do potencial zeta indica que as partículas em suspensão se repelem e que, por isso, a suspensão é estável. Um valor de referência mínimo para boa garantia de estabilidade é 30mV<sup>26</sup>.

Na Figura 11 apresenta-se um exemplo de um espectro do potencial zeta de uma dispersão de AAS em meio aquoso (C cerca de 3,5g/L). O eixo dos yy diz respeito ao número de partículas com um determinado potencial zeta, ou seja, as partículas dispersas não têm um potencial zeta único mas sim uma distribuição de potenciais, dentro de certos limites. Neste caso, o potencial zeta médio ( $PZ_{\text{médio}}$ ) é de 1,75mV (média global de 4 espectros, resultantes de 4 leituras consecutivas).

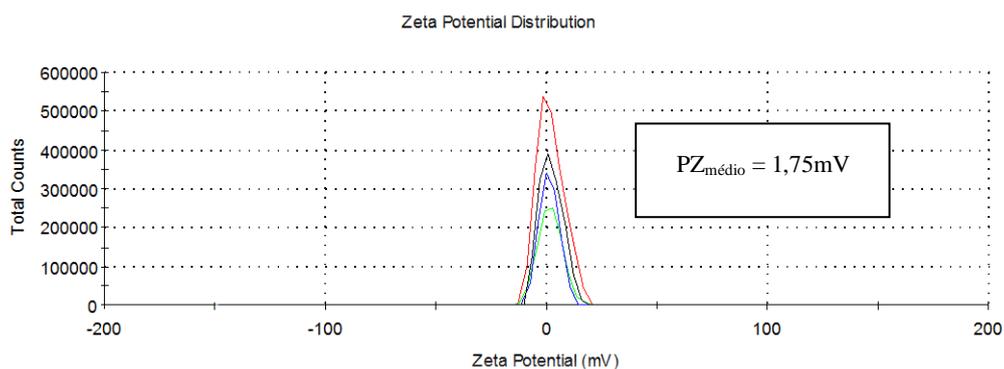


Figura 11 - Distribuição do potencial zeta para uma amostra de AAS em meio aquoso (4 leituras consecutivas).

### 3. Métodos

#### 3.1 Plano geral do estudo efectuado

Nesta secção, é apresentada a estratégia geral seguida neste trabalho.

De um ponto de vista mais abrangente, o objectivo é estudar a influência da formulação inicial das microcápsulas e das suas condições de fabrico na microestrutura final obtida, e também noutras propriedades de desempenho relevantes, como seja o perfil temporal de libertação do ingrediente activo (IA). Este estudo é concretizado para um caso particular (encapsulação de ácido acetilsalicílico (AAS) em etilcelulose), que definiremos em detalhe na secção 3.2. De seguida, há que estabelecer um procedimento de fabrico controlado e reprodutível, baseado na técnica de microencapsulação por evaporação de solvente. Para tal, fizeram-se vários testes preliminares, até se convergir para o procedimento descrito na secção 3.3.

Uma vez fabricadas as microcápsulas, em condições bem conhecidas e controladas, há que seleccionar os parâmetros de estrutura e outros que iremos analisar, e as respectivas técnicas usadas. A Tabela 4 regista os parâmetros seleccionados e respectivas técnicas de análise.

Tabela 4 – Parâmetros analisados e respectivas técnicas de análise

| <b>Parâmetros analisados</b>   | <b>Técnicas de Análise</b>  |
|--|---|
| Eficiência de encapsulação e concentração de IA nas microcápsulas                    | Dissolução das microcápsulas em etanol e análise UV-vis da solução obtida                       |
| Tamanho e forma das partículas (primeira observação)                                 | Microscopia Óptica  |
| Distribuição de tamanhos das partículas  | Espectroscopia de difracção laser, equipamento Mastersizer (Malvern)                            |
| Potencial Zeta*  | Potencial zeta medido pelo equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern)                              |
| Estrutura superficial e interna das partículas                                       | Microscopia Electrónica de Varrimento   |
| Velocidade de libertação do IA das microcápsulas (relacionada com estrutura interna) | Teste de libertação (libertação para meio aquoso agitado, seguida de análise UV-vis da solução) |

\* Parâmetro relacionado com a carga superficial das partículas.

A primeira técnica – dissolução das microcápsulas em etanol – permite, por análise UV-vis da solução obtida, calcular a eficiência de encapsulação, que é um importante parâmetro relativo ao processo de fabrico (razão entre a massa de IA efectivamente encapsulado e a massa de IA inicialmente adicionada ao processo). Sabendo a massa de IA encapsulado, facilmente se calcula a sua concentração nas microcápsulas, que é naturalmente um parâmetro importante para o desempenho final destas.

Por microscopia óptica, faz-se uma primeira avaliação do tamanho e forma das partículas. De seguida, obtém-se informação mais detalhada, a partir da técnica de difracção de raios laser, que permite calcular a distribuição de tamanhos das microcápsulas. Determina-se também o potencial zeta das partículas, que é uma importante propriedade de superfície. Para algumas das amostras, fizeram-se ainda observações ao microscópio electrónico, que permitem identificar detalhes morfológicos, quer da superfície das partículas, quer do seu interior (fazendo-se previamente o corte transversal das partículas).

Finalmente, o nosso conjunto de técnicas de análise é completado com testes de libertação do IA a partir das microcápsulas, para um meio aquoso agitado. Estes testes permitem avaliar a velocidade de libertação do IA, que é um parâmetro *standard* de qualquer produto baseado em microencapsulação. Além disso, pretendemos com estes testes obter informação quanto à estrutura interna das partículas, uma vez que esta influencia a resistência à transferência do IA através da cápsula e está assim relacionada com a velocidade de libertação do IA para o meio envolvente. Mais detalhes quanto às técnicas de análise e respectivos procedimentos são apresentados na secção 3.4.

O nosso plano experimental parte de um teste base, em torno do qual se fazem depois outros testes, variando parâmetros da formulação do produto ou condições de operação do processo. Cada teste inclui o fabrico das microcápsulas, seguido da sua caracterização pelas várias técnicas da Tabela 4. O produto de cada teste (cerca de 0,9g) é dividido em 8 porções representativas (usando um divisor de amostras sólidas, Rotary Micro riffler), encaminhando-se depois uma ou mais destas porções para diferentes técnicas de análise. O número de porções necessárias para cada técnica é como se segue: dissolução das microcápsulas (1 porção), microscopia óptica (< 1 porção), difracção laser (2 porções), potencial zeta (< 1 porção), microscopia electrónica (1 porção), teste de libertação (1 porção).

O tempo total necessário para cada teste, desde o fabrico das microcápsulas até completar todas as análises, é cerca de 3 dias. No primeiro dia produzem-se as partículas, no segundo

secam-se e no terceiro faz-se a divisão do produto e todas as análises (exceptuando a microscopia electrónica de varrimento, que foi feita consoante a disponibilidade do equipamento).

## 3.2 Caso de estudo

O nosso caso particular de estudo é a produção de microcápsulas de ácido acetilsalicílico (AAS) em etilcelulose (EC), a partir de uma emulsão o/w, que é um sistema já estudado por outros autores<sup>27, 28</sup>. O ácido acetilsalicílico é um fármaco barato e comum. O polímero de etilcelulose é biodegradável, biocompatível, foi aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para uso farmacêutico e é relativamente barato.

Quanto ao solvente usado na fase dispersa, consideraram-se diversas alternativas, apresentando-se na Tabela 5 três delas: diclorometano, acetato de etilo e MTBE. Todos estes solventes dissolvem em quantidade suficiente tanto o AAS, como o polímero EC. Sendo assim, a escolha do solvente baseou-se noutros critérios também relevantes: volatilidade, solubilidade em água e a toxicidade. A Tabela 5 apresenta propriedades dos solventes relacionadas com estes critérios.

A volatilidade deve ser suficientemente elevada para que o processo por evaporação do solvente seja rápido. O diclorometano é o solvente mais volátil, mas os outros apresentam também uma volatilidade que é em preciso razoável.

A solubilidade em água deve, em princípio, ser reduzida, já que o método de fabrico se baseia numa emulsão o/w, sendo o solvente o constituinte maioritário da fase interna. Contudo, algum nível de solubilidade pode ser vantajoso, já que acelera o passo de extracção do solvente da fase dispersa para a contínua.

Quanto à toxicidade, usamos como parâmetros de selecção a dose letal 50 (LD50), por via oral, uma vez que se trata de uma aplicação farmacêutica, e ainda a classificação GSK, que tem em conta factores de segurança, saúde e ambiente. A cada um destes factores é atribuído uma cor, sendo que a cor vermelha indica um forte incentivo para a substituição do solvente.

Tabela 5 – Solventes alternativos e suas propriedades.

|                                 | Número CAS | Ponto de ebulição normal (°C)* | Solubilidade em água (g/L a 20 °C)* | LD50 (rato, via oral)* | Classificação GSK**                |
|---------------------------------|------------|--------------------------------|-------------------------------------|------------------------|------------------------------------|
| Diclorometano (DCM)             | 75-09-2    | 40,0                           | 20                                  | 1,6 g/kg               | Código vermelho em resíduos        |
| Acetato de Etilo                | 141-78-6   | 77,0                           | 80                                  | 5,6 g/kg               | Sem código vermelho                |
| Éter metil-terc-butílico (MTBE) | 1634-04-4  | 55,3                           | 42                                  | 2,0 g/kg               | Código vermelho em inflamabilidade |

\* referência 29.

\*\* referência 30.

Face à discussão acima e aos dados da Tabela 5, o solvente seleccionado foi o acetato de etilo, uma vez que é o menos tóxico e com menos problemas ambientais. As suas desvantagens (menor volatilidade e maior solubilidade em água) podem ser contornadas, ajustando as condições de fabrico, como veremos na secção 3.3.

Para finalizar, é necessário seleccionar o surfactante a utilizar. Pelo método de HLB<sup>31</sup>, o surfactante escolhido é o Tween 80 (monooleato de polioxietileno (20) sorbitano).

Na Tabela 6 registam-se outras propriedades relevantes dos ingredientes escolhidos.

Tabela 6 – Propriedades dos ingredientes utilizados.

| Ingrediente            | Propriedades a 25 °C   |
|------------------------|--|
| Acetato de etilo       | Solubilidade em água – 80 g/L <sup>32</sup><br>Massa volúmica - 0,902 g/mL <sup>33</sup> |
| Água                   | Massa volúmica - 0,9970 g/mL <sup>34</sup>   |
| Surfactante (Tween 80) | Massa volúmica - 1,07 g/mL <sup>35</sup>   |
| Ácido Acetilsalicílico | Solubilidade em água - 3 mg/mL <sup>36</sup>   |

Para a obtenção de uma formulação de base, que serviu de ponto de partida para os nossos testes finais, foi necessário efectuar diversos testes preliminares, afinando-se parâmetros como: (i) o nível de pré-saturação da fase aquosa em AAS, (ii) o nível de pré-saturação da fase aquosa em acetato de etilo e (iii) a concentração de surfactante. Após o referido ajuste, chegou-se à formulação da Tabela 7.

Tabela 7 – Formulação base.

| Fase Dispersa    |                    |         | Fase Contínua    |       |         |
|------------------|--------------------|---------|------------------|-------|---------|
|                  |                    | % (w/w) |                  |       | % (w/w) |
| Acetato de Etilo | 23 mL              | 94      | Água Destilada   | 400mL | 93,36   |
| Etilcelulose     | 0,88g              | 4       | Tween 80         | 2mL   | 0,50    |
| AAS              | 0,44g              | 2       | AAS              | 0,96g | 0,23*   |
|                  |                    |         | Acetato de Etilo | 28mL  | 5,91*   |
|                  |                    |         |                  |       |         |
|                  | Total              | 100     |                  | Total | 100     |
|                  | 5% do volume total |         |                  |       |         |

\* corresponde a 80% de saturação de acordo com as solubilidades da Tabela 6.

Utilizando 400mL de água destilada e conhecendo as percentagens de pré-saturação pretendidas, é possível obter as massas necessárias de AAS e acetato de etilo na fase contínua (por exemplo, para o AAS,  $0,80 \times 3 \text{ mg/mL} \times 400 \text{ mL} = 0,96 \text{ g}$ ). Para o surfactante, os cálculos são feitos a partir da concentração especificada, 0,5% da fase contínua, e da massa dos restantes componentes da fase contínua.

A formulação base tem uma fracção volumétrica de fase dispersa de 0,05, que é um valor típico para boas condições de emulsificação. Partindo deste valor, calcula-se o volume da fase dispersa ( $430 \text{ mL} / 0,95 \times 0,05 = 23 \text{ mL}$ ). A concentração de etilcelulose na fase dispersa foi fixa em 4% e a do AAS em 2%. Estes valores foram ajustados até se conseguir uma encapsulação viável, ainda que a sua eficiência seja baixa. A partir destes valores, facilmente, se calculam as massas utilizadas na fase dispersa.

Na Tabela 8 apresentam-se os fornecedores e especificações dos ingredientes da formulação.

Tabela 8 – Fornecedor e especificações dos ingredientes utilizados.

|                        | Fornecedor | Especificações  |
|------------------------|------------|---|
| Ácido Acetilsalicílico | Acofarma   | > 99,0%   |
| Etilcelulose           | Acros      | 48% de etoxilação<br>22 cP (solução a 5% em 80/20 tolueno/etanol) |
| Acetato de Etilo       | Fisher     | Grade PA  |
| Tween 80               | Fisher     | -   |

### 3.3 Processo laboratorial de fabrico das microcápsulas

Como referido anteriormente a técnica utilizada neste estudo para o processo de microencapsulação foi a técnica de evaporação de solvente, a partir de uma emulsão o/w (ver secção 2.3).

Devido à miscibilidade parcial do acetato de etilo em água, foi necessário saturar (a 80%) a fase contínua com acetato de etilo, de modo a inibir a migração deste da fase dispersa para a fase contínua durante a emulsificação, evitando-se assim a precipitação prematura do polímero. Além disso, esta migração é também inibida através da técnica de pré-emulsão. Inicialmente, emulsifica-se a fase dispersa numa pequena porção de fase contínua. Esta pré-emulsão é depois diluída, adicionando-se a ela a restante fase contínua.

Como o AAS é parcialmente solúvel em água, também é necessário pré-saturar a fase contínua com AAS (2,4 mg/mL), para deste modo minimizar a sua migração para a fase contínua.

A formulação base da Tabela 7 (secção 3.2) contempla a pré-saturação da fase contínua em acetato de etilo e AAS.

Em face das adaptações atrás referidas, o processo de fabrico laboratorial consiste nas seguintes etapas:

1. Preparação da fase dispersa;
2. Preparação da fase contínua;
3. Pré-emulsificação;
4. Emulsificação;
5. Aquecimento da mistura e evaporação do solvente;
6. Filtração e lavagem;
7. Secagem;
8. Peneiração;
9. Divisão da amostra e Armazenamento.

As várias etapas são descritas em detalho no Anexo A. Procedimento experimental para fabrico de microcápsulas A Figura 12 resume as etapas 1 a 5 do processo, sob a forma de um diagrama de Gantt (etapas vs. tempo decorrido). Incluímos também no diagrama as principais condições de operação. Os valores para a temperatura de evaporação (50°C) e velocidade de agitação mecânica (600 rpm) correspondem ao nosso teste base e serão alvo de variação em testes subsequentes.

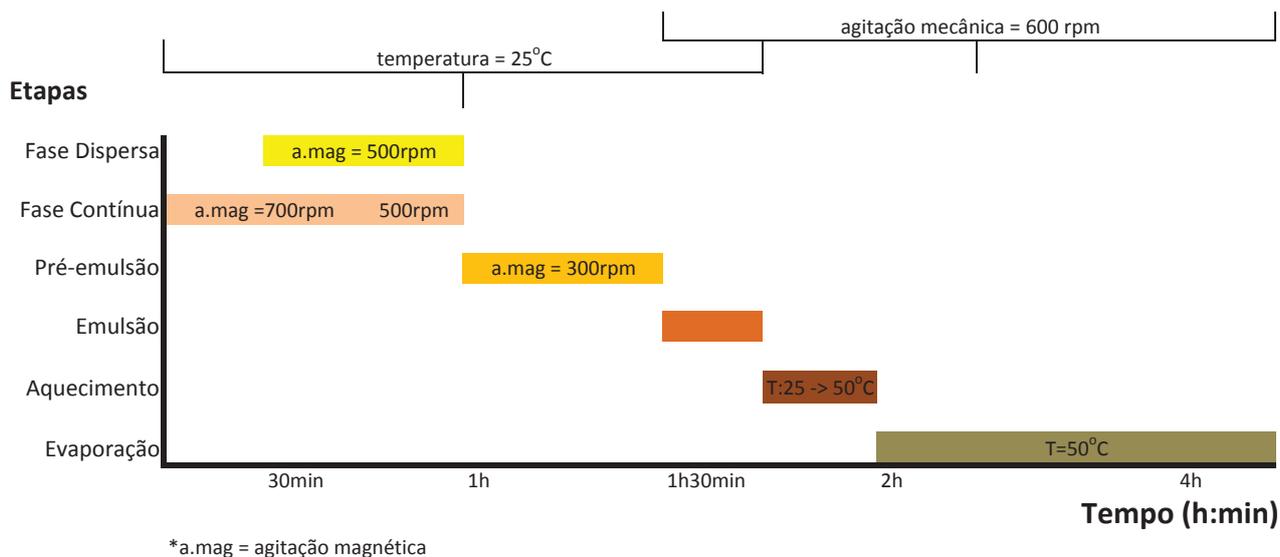


Figura 12 – Diagrama de Gantt do processo de microencapsulação por evaporação de solvente.

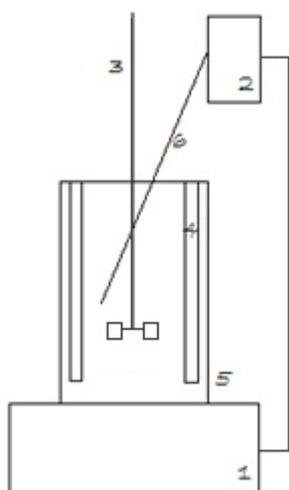
Existem alguns pormenores a ter em atenção durante o processo. Aquando da preparação da fase dispersa, a EC e o AAS são adicionados lentamente e em simultâneo, porque melhora o processo de dissolução. A adição da fase dispersa na etapa de pré-emulsão é realizada lentamente e com auxílio de uma vareta. A adição da restante fase contínua na etapa de emulsão ocorre de igual forma.

O tempo de evaporação necessário foi determinado por análise do acetato de etilo presente na mistura. Retiraram-se amostras ao longo do tempo, que foram depois submetidas a extracção com diclorometano. O extracto foi analisado via cromatografia gasosa. Concluiu-se que o tempo para evaporação completa do acetato de etilo é cerca de 2 horas. Esta análise foi efectuada para as condições da formulação base, uma temperatura de evaporação de 50 °C e agitação mecânica de 600 rpm. Os resultados são apresentados no Anexo B. Análise de solvente ao longo do tempo de evaporação

No final do processo, a amostra é seca durante 24 horas a 50 °C. O produto seco é depois peneirado, com uma malha de 600 µm, de modo a retirar partículas que advieram da precipitação precoce da etilcelulose, eventuais aglomerados de partículas e ainda películas de etilcelulose que aderem às superfícies do copo e do agitador. Por último, a amostra é dividida em 8 porções e armazenada num exsiccador.

### *Montagem Experimental*

Numa primeira fase, a montagem experimental é simples, sendo apenas necessários copos (de 50 mL e 800 mL), magnetos e placas de agitação/aquecimento para se dar a preparação das fases dispersa e contínua.



Legenda:

- 1 – Placa de aquecimento
- 2 – Controlador de temperatura
- 3 – Agitador mecânico
- 4 – Chicana
- 5 – Copo alto de 600 mL
- 6 – Termopar

Figura 13 – Montagem experimental utilizada na etapa de emulsificação.

Na etapa de pré-emulsão, a montagem experimental é idêntica à apresentada na Figura 13, com excepção da agitação que é magnética, devido ao pequeno volume de mistura. Nas etapas seguintes de emulsão e evaporação de solvente tem-se então exactamente a montagem da Figura 13 (com agitação mecânica).

O tipo de agitador e a geometria do sistema de agitação foram escolhidos de acordo com as recomendações habituais para sistemas de emulsificação: agitador tipo turbina com 6 pás, proporções geométricas dentro dos valores recomendados e duas chicanas para evitar a formação de vórtice (Figura 14). Deste modo conseguem-se uma mistura próxima de uniforme dentro do copo e elevadas tensões de cortes para quebra das gotas<sup>37</sup>.

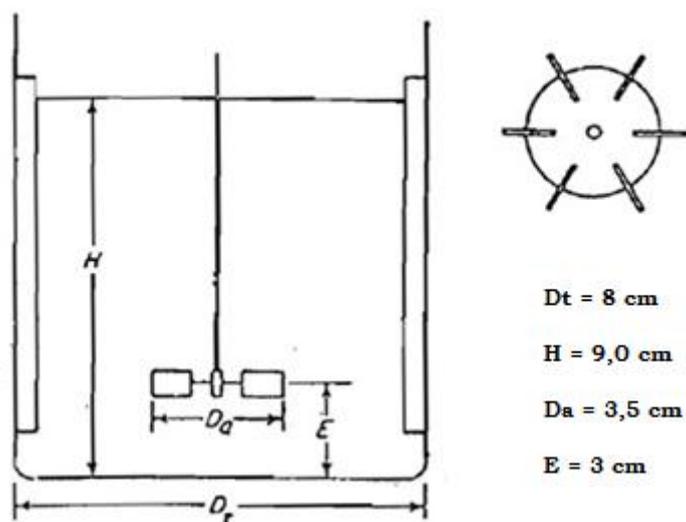


Figura 14 – Geometria do sistema de agitação do processo<sup>37</sup>.

Para a filtração e lavagem das microcápsulas é utilizado um sistema com funil de Büchner e uma bomba de vácuo. Uma boa lavagem é importante para a remoção completa do surfactante à superfície das partículas. O volume de água utilizado para a lavagem é semelhante ao volume da fase contínua e a lavagem final é efectuada com um esguicho.

Para além do material de vidro, a Tabela 9 apresenta a lista dos equipamentos utilizados para o fabrico das microcápsulas.

Tabela 9 – Lista dos equipamentos utilizados.

| <b>Equipamento</b>    | <b>Fabricante e Modelo</b> |
|-----------------------|----------------------------|
| - Agitador mecânico   | Heidolph, RZ2101 Control   |
| - Balança             | Mettler Toledo, AG 204     |
| - Divisor de amostras | Rotary Micro Riffler       |
| - Estufa              | WTC Binder                 |
| - Peneiro             | Retsch - 600 µm            |
| - Placas de agitação  | Heidolph, MR3001K          |
| - Termopares          | Heidolph, EKT 3001         |

### 3.4 Técnicas de análise

Após o fabrico das microcápsulas, procede-se à sua caracterização a partir das técnicas seleccionadas (ver Tabela 4 na secção 3.1). De seguida, descrevem-se os procedimentos adoptados em cada uma das análises.

#### 3.4.1 Eficiência de encapsulação

A quantidade de AAS presente nas microcápsulas é determinada dissolvendo uma porção de amostra (cerca de 0,1 g) em 50 mL de etanol puro (agitação magnética durante 2 horas a 25 °C) e analisando a solução obtida por UV-vis. Nas nossas condições de fabrico a hidrólise de AAS é significativa, pelo que é necessário quantificar as duas espécies em solução, AAS e AS. De acordo com tratamento feito na secção 2.4.1, a partir de rectas de calibração das duas espécies em separado e para os dois comprimentos de onda onde estas apresentam absorvância máxima, é possível determinar a concentração de ambas as espécies (ver ANEXO C. Detalhes).

As rectas de calibração obtidas são:

$$\text{Rectas de Calibração do AAS} \begin{cases} A = 6,3665 \times C_{AAS} , \lambda_1 = 275 \text{ nm} \\ A \approx 0, \lambda_2 = 302 \text{ nm} \end{cases}$$

$$\text{Rectas de Calibração do AS} \begin{cases} A = 5,2497 \times C_{AS} , \lambda_1 = 275 \text{ nm} \\ A = 26,483 \times C_{AS} , \lambda_2 = 302 \text{ nm} \end{cases}$$

Nas equações acima,  $A$  designa absorvância e  $C$  as concentrações, em g/L.

Para uma mistura binária, tem-se então:

$$\begin{cases} A_1 = (6,3665 \times C_{AAS}) + (5,2497 \times C_{AS}) \\ A_2 = 26,483 \times C_{AS} \end{cases}$$

Através do espectro UV-vis para uma solução binária AAS + AS em etanol puro, lêem-se os valores de absorvância para os dois picos,  $A_1$  e  $A_2$ . Substituindo estes valores nas equações anteriores obtêm-se, então, as concentrações de interesse,  $C_{AAS}$  e  $C_{AS}$ , em g/L. A partir destas duas concentrações facilmente se calcula a quantidade total equivalente de AAS nas microcápsulas (quantidade total caso não houvesse hidrólise, designada por  $A'$ ). Verificou-se que a presença de etilcelulose e eventuais traços de Tween 80 não afectam quantitativamente o espectro UV-vis na gama de interesse.

A partir da análise acima descrita determinam-se os seguintes parâmetros de interesse:

$$\text{Eficiência de encapsulação, \%} = \frac{A'}{A} \times 100$$

$$\text{Eficiência global do processo, \%} = \frac{A' + B'}{A + B} \times 100$$

$$\text{Concentração do ácido acetilsalicílico nas microcápsulas, \%} = \frac{A'}{A' + B'} \times 100$$

, onde  $A$  e  $A'$  designam, respectivamente, a quantidade de AAS no início do processo e nas microcápsulas ( $A'$  é a quantidade total equivalente acima referida), e  $B$  e  $B'$  quantidades análogas para a etilcelulose. A soma de  $A'$  e  $B'$  representa a massa das partículas no final do processo que é obtida por pesagem.

Os espectros de absorção foram obtidos com o Espectrofotómetro UV-Vis Beckman DU650 e as células utilizadas foram células de quartzo de 10 mm. O ácido salicílico é do fabricante Acofarma, a 99,0%. O etanol é etanol absoluto da Fisher, grade analítico.

### 3.4.2 *Distribuição de tamanhos*

A distribuição de tamanhos das microcápsulas é determinada por espectroscopia de difracção laser, usando o Mastersizer Hydro 2000, da Malvern. Este aparelho efectua medições rápidas e com elevada reprodutibilidade e permite determinar uma ampla faixa de tamanhos<sup>38</sup>.

A suspensão para leitura no Mastersizer foi preparada com duas porções de amostra (cerca de 0,2 g), dispersas em 10 mL de água destulada com 3 gotas de solução aquosa de Tween 80 a 5%. A suspensão permaneceu em agitação durante 10 minutos. Findo este período, a suspensão foi introduzida no equipamento e procedeu-se ao início da análise.

### 3.4.3 *Potencial zeta*

O equipamento utilizado para medição do potencial zeta foi o Zetasizer Nano-Zs, da Malvern. O manual do equipamento refere que o intervalo de confiança para leitura do potencial zeta relativamente ao tamanho das partículas, é de 5 nm a 10  $\mu\text{m}$ <sup>39</sup>. Algumas partículas da amostra têm tamanho superior, pelo que há a possibilidade de ocorrer deposição na célula durante a leitura. Como tal, foi efectuada uma selecção dos resultados obtidos tendo em atenção o tempo decorrido desde o início da análise. OS resultados para tempos superiores a 15 minutos foram rejeitados.

A suspensão para leitura no Zetasizer foi preparada com uma porção de amostra (cerca de 0.1 g), dispersa em 50 mL de água destilada com 9 gotas de solução aquosa de Tween 80 a 5%. Após agitação da suspensão durante 10 minutos, transferiu-se uma amostra para a célula do Zetasizer, havendo sempre o cuidado de uma boa lavagem da célula e de garantir a inexistência de bolhas de ar na mesma. A célula foi depois introduzida no equipamento e foram executadas cinco leituras consecutivas. O potencial zeta médio, que designamos por  $PZ_{\text{médio}}$  é a média global dos 5 espectros obtidos.

#### 3.4.4 *Microscopia óptica*

Para observação no microscópio óptico, foi utilizada a mesma suspensão utilizada na determinação do potencial zeta. Após uma primeira análise da suspensão, esta foi submetida durante 2 minutos a ultra-sons e foi novamente observada.

O equipamento utilizado foi o Microscópio OLYMPUS BH-2.

#### 3.4.5 *Microscopia electrónica de varrimento (MEV)*

Para a análise em MEV foi necessário revestir a amostra a ouro, relativamente inerte, a uma pressão de  $5 \times 10^{-3}$  mbar, uma potência de 100 W e durante 30 segundos. Para a análise microscópica recorreu-se ao microscópio Philips XL 30 e a tensão usada foi de 10,0 kV. Todo o procedimento foi efectuado por um técnico do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Coimbra.

#### 3.4.6 *Testes de libertação*

Os testes de libertação têm grande importância na área farmacêutica, seja para controlo de qualidade do comportamento de um fármaco, ou para o estudo da microestrutura de um sistema de libertação controlada de um fármaco<sup>3</sup>.

Nos testes de libertação são diversas as variáveis que influenciam a variação a velocidade de libertação, tal como o pH do meio envolvente, a velocidade de agitação e a temperatura.

Existem vários métodos já estabelecidos, alguns deles simulando as condições do organismo humano<sup>3, 40</sup>. Neste estudo, os testes de libertação efectuaram-se num dispositivo simples, desenhado para o efeito (Figura 15). Consiste num copo de 100 mL com 75 mL de água, onde é mergulhado um saco de algodão, devidamente selado, contendo as microcápsulas (cerca de 0,3 g), um magneto e pequenas esferas de vidro. O copo é colocado sobre uma placa de agitação, regulada para agitação suave (100 rpm), promovendo-se assim o movimento conjunto do magneto e das esferas e uma dispersão homogénea das partículas no

interior do saco. O teste é realizado à temperatura controlada de 37°C e com o copo devidamente selado de modo a evitar evaporação.

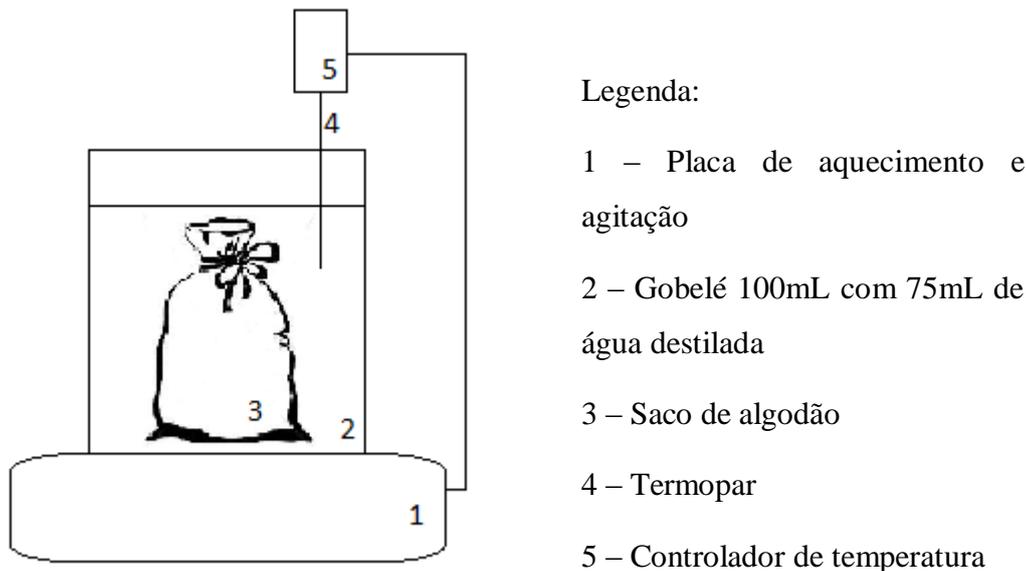


Figura 15 – Montagem experimental utilizada no teste de libertação.

Ao longo do tempo, retiram-se amostras do líquido que circunda o saco, que são depois analisadas quanto ao teor de AAS libertado, por espectroscopia UV-vis. Às amostras é adicionada solução aquosa de NaOH e em quantidade tal que garante a hidrólise total do AAS a AS. Obtém-se assim na análise UV-vis um espectro com um único máximo para o comprimento de onda de 296nm<sup>41</sup>.

A amostragem ao longo do tempo é feita em triplicado. A cada amostra de 2mL são adicionados 2mL de solução aquosa de NaOH (0,1 M). A mistura é depois filtrada com um filtro de agulha de porosidade 0,45µm, removendo-se eventuais resíduos de partículas, e sujeita em seguida a agitação durante cerca de 10 minutos. Após a agitação, procede-se à análise UV-vis.

Foram realizados testes para verificar se o contacto com o algodão do saco perturba o espectro do AS em solução aquosa de NaOH, concluindo-se que não.

## 4. Resultados

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos nos diversos testes realizados, variando a formulação inicial do produto e algumas condições de processo de microencapsulação. Começa-se com um teste base, com a formulação da Tabela 7 e as condições de fabrico da Figura 12 (secção 3.3). Os restantes testes são variações deste teste base, tal como registado na Tabela 10.

Tabela 10 – Testes efectuados: teste base e quatro variantes, variando quatro parâmetros de entrada, um de cada vez (variação assinalada a negrito).

|                 | % sat. AAS na fase aquosa* | % inicial AAS na fase dispersa** | Velocidade de agitação | Temperatura de evaporação |
|-----------------|----------------------------|----------------------------------|------------------------|---------------------------|
| Teste base (TB) | 80                         | 2                                | 600 rpm                | 50°C                      |
| Teste SatAAS+   | <b>100</b>                 | 2                                | 600 rpm                | 50°C                      |
| Teste N+        | 80                         | 2                                | <b>900 rpm</b>         | 50°C                      |
| Teste T+        | 80                         | 2                                | 600 rpm                | <b>60°C</b>               |
| Teste AAS-      | 80                         | <b>1</b>                         | 600 rpm                | 50°C                      |

\* % de saturação de AAS na fase aquosa, baseada numa solubilidade estimada de 3,0 mg/mL

\*\* % de EC na fase dispersa também varia, tal que a % (AAS + EC) = 6%.

Este plano de experiências foi desenhado variando quatro parâmetros que julgamos terem impacto significativo na eficiência de encapsulação e estrutura das microcápsulas, e tendo em atenção limitações de tempo e recursos. Partimos, pois, do teste base, e considerámos apenas quatro variantes, variando um só parâmetro de cada vez. Estamos cientes que este é apenas um conjunto preliminar de testes, e que um estudo sistemático mais completo exigiria uma variação mais extensa dos parâmetros de entrada, a inclusão de mais parâmetros de entrada relevantes (e.g. concentração da fase dispersa, concentração do surfactante), e ainda um desenho das combinações mais adequadas (de acordo, por exemplo, com princípios de desenho estatístico de experiências).

No teste SatAAS+, e face ao teste base, aumenta-se o nível de saturação inicial da fase contínua em AAS, com o intuito de averiguar se a eficiência de encapsulação aumenta (no teste base, como veremos mais adiante, a eficiência é baixa).

No teste N+, e face ao teste base, aumenta-se a velocidade de agitação, com o objectivo de averiguar se uma emulsificação mais intensa permite obter partículas mais pequenas. No teste T+, aumenta-se a temperatura de evaporação, com o intuito de averiguar o impacto de uma evaporação mais rápida na microestrutura final das partículas.

No último caso, varia-se a concentração inicial de AAS e EC na fase dispersa, mantendo constante o teor total destes compostos (6% w/w). Estamos assim a variar o rácio AAS:EC, que é 2:4 no teste base e 1:5 no caso AAS-.

De seguida, apresentamos os resultados obtidos e em duas secções distintas. Na secção 4.1 apresentamos os resultados para o teste base e outros resultados primários, digamos assim, com o objectivo de ilustrar o conjunto de informação obtidas. Na secção **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** apresentamos os resultados de forma integrada, incluindo todos os testes, fazendo uma análise comparativa e discutindo algumas tendências observadas.

#### 4.1 Teste base e outros resultados primários

##### *Eficiência de encapsulação*

Os parâmetros determinados através da análise em UV-vis para o teste base apresentam-se na Tabela 11. A eficiência de encapsulação e a concentração de AAS nas microcápsulas são ambos reduzidos, o que indica que ocorreu uma grande perda de AAS durante o processo. A massa de microcápsulas no final do processo é de 0,9136 g.

Tabela 11 – Valores de eficiência de encapsulação, concentração de AAS nas microcápsulas e eficiência global, para o teste base.

| <b>Eficiência de encapsulação, %</b> | <b>Concentração, %</b> | <b>Eficiência global, %</b> |
|--------------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| 13,4                                 | 6,4                    | 73,6                        |



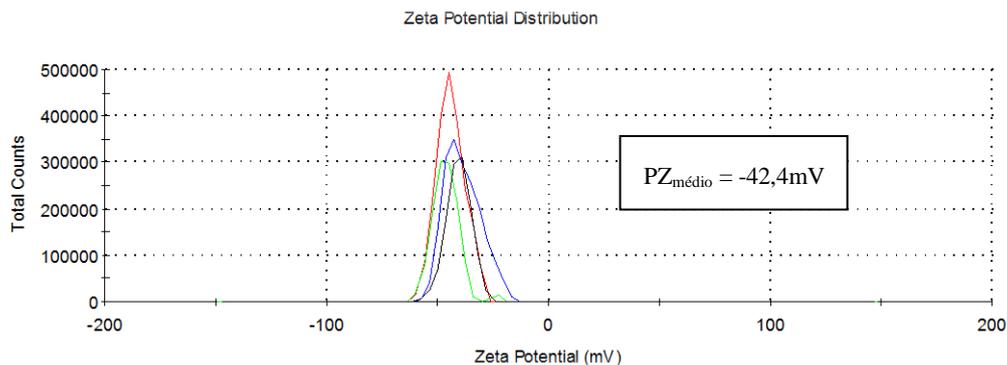


Figura 16 - Distribuição do potencial zeta para uma amostra de EC em meio aquoso (4 leituras consecutivas).

Para o teste base, o valor médio do potencial zeta das microcápsulas é de  $-14,6\text{mV}$  (Figura 17). Observa-se alguma variabilidade entre leituras consecutivas, facto que se pode ra dever à deposição das partículas. Para partículas de EC (Figura 16), o potencial zeta médio é de  $-42,4\text{ mV}$ . Coloca-se então a possibilidade da superfície da partícula não ser só constituída por EC, mas que exista também AAS.

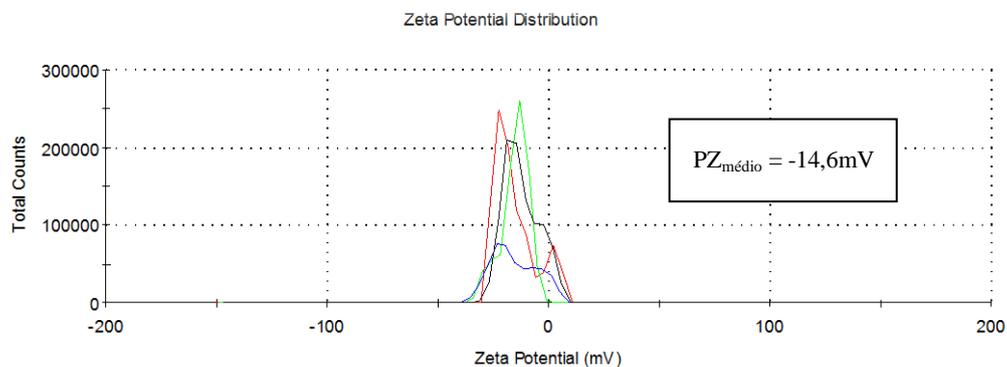


Figura 17 – Distribuição do potencial zeta para uma amostra do teste base em meio aquoso (4 leituras consecutivas).

### *Tamanho e distribuição de tamanhos*

Com a análise de tamanho e distribuição de tamanhos determina-se a gama de tamanho das partículas, bem como o tipo de curva de distribuição de tamanhos, o que se traduz num conhecimento melhorado sobre as partículas.

Para o teste base (Figura 18), conclui-se que 10% das partículas têm tamanho inferior a 78  $\mu\text{m}$ , 50% têm tamanho inferior a 131  $\mu\text{m}$  e 90% têm tamanho inferior a 231  $\mu\text{m}$ . A distribuição de tamanhos é aproximadamente simétrica e do tipo log-normal

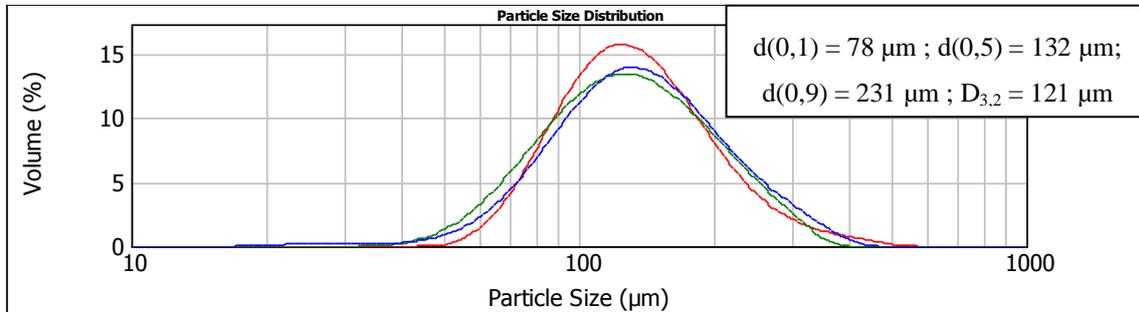


Figura 18 – Distribuição de tamanhos de partículas do teste base (3 leituras)

### *Microscopia óptica*

Através da análise microscópica é possível determinar qual a forma das partículas e se há grande variedade nessa forma.

Com se pode observar na Figura 19, as partículas do teste base são, na sua maioria, de forma esférica.

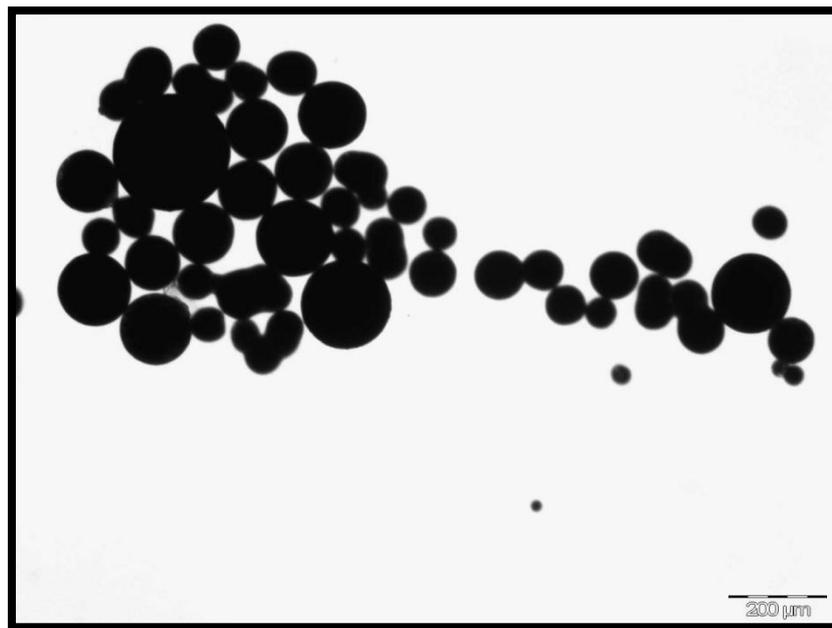


Figura 19 – Imagem de microscopia óptica (200  $\mu\text{m}$ ) de partículas do teste base.

*MEV*

Com a análise das partículas por MEV é possível verificar qual é a estrutura exterior, bem como interior, das partículas. Assim é possível verificar a existência de poros à superfície, a rugosidade da superfície, tal como, averiguar se internamente a partícula é muito ou pouco porosa.

Analisando as imagens obtidas por MEV para o teste base (Figura 20), externamente conclui-se que a existência de poros não é abundante e que as partículas são muito pouco rugosas. Interiormente, a partícula é, em grande parte, porosa.

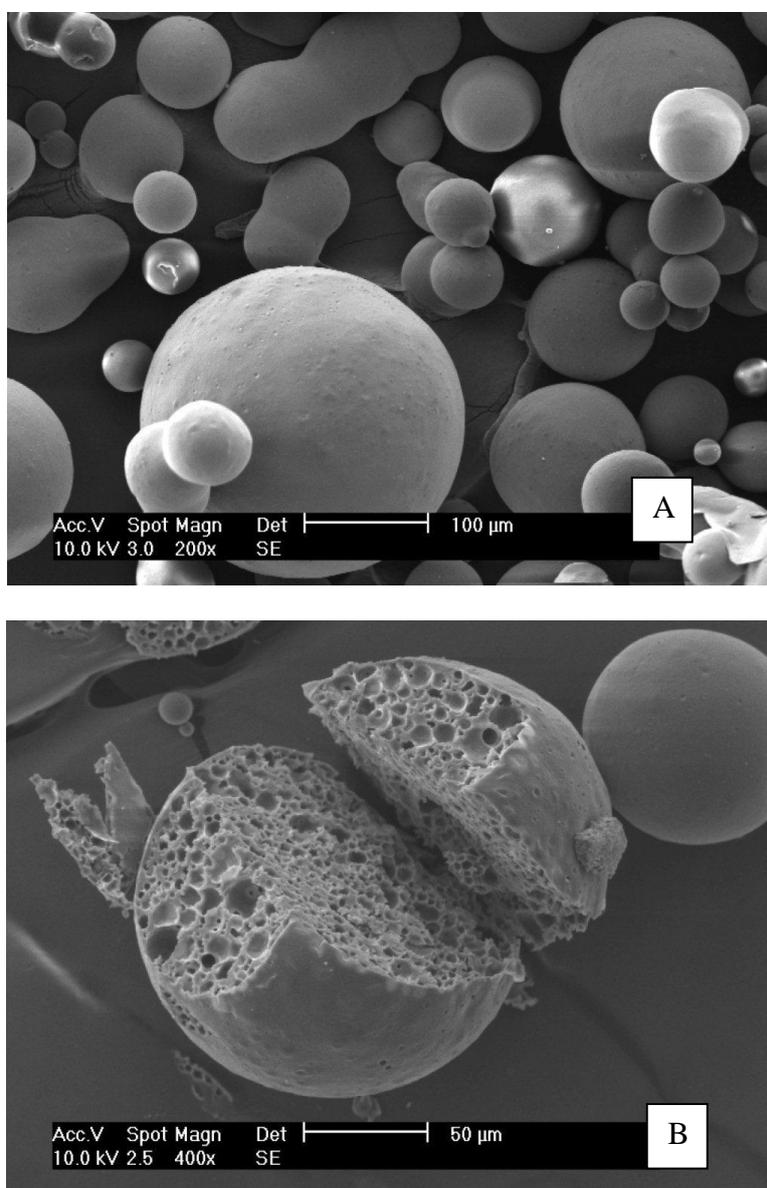


Figura 20 – Imagens obtidas por MEV das partículas do teste base: A) superfície externa (100μm); B) interior das partículas (50μm).

### *Teste de libertação*

Através dos resultados do teste de libertação é possível determinar qual a percentagem de AAS libertado ao longo do tempo.

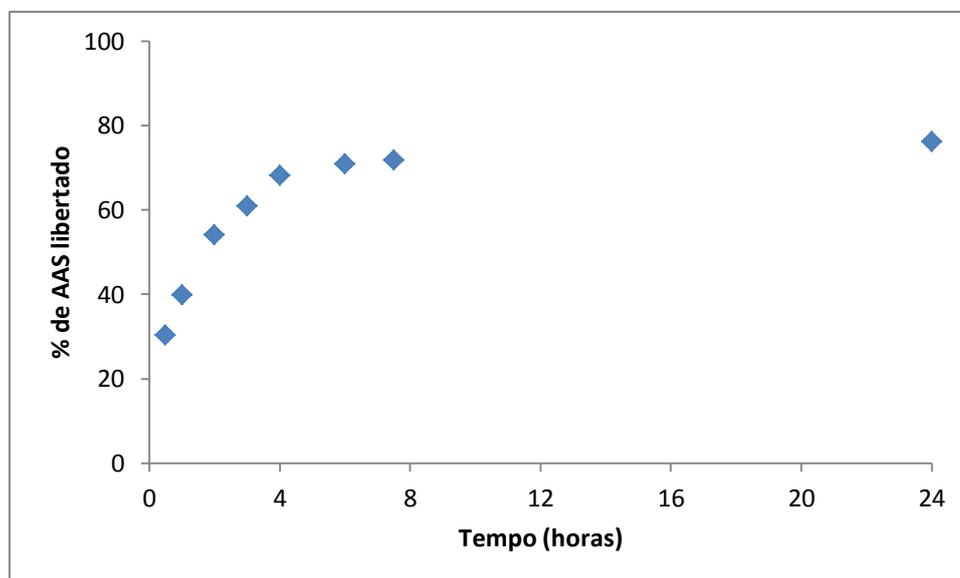


Figura 21 – Percentagem de AAS libertado em função do tempo, em horas (Teste de Libertação do teste base).

### *Réplicas*

De forma a verificar a reprodutibilidade do processo de fabrico das microcápsulas, foram efectuadas réplicas para alguns testes. Na Tabela 13 encontram-se registados os resultados obtidos por leitura em UV-vis e distribuição de tamanhos para o teste base, o teste SatAAS+ e réplicas. Analisando a tabela verifica-se existir reprodutibilidade, visto que os resultados apresentados, na sua maioria, serem similares.

Tabela 13 – Resultados de eficiência e distribuição de tamanhos para duas réplicas do teste base e do teste SatAAS .

| Teste   | Ef. encaps (%) | Conc (%) | Ef. Global (%) | Distribuição de Tamanhos, $\mu\text{m}$ |        |        |                 |
|---------|----------------|----------|----------------|---|--------|--------|-----------------|
|         |                |          |                | d(0,1)                                  | d(0,5) | d(0,9) | D <sub>32</sub> |
| Base    | 13,4           | 6,4      | 73,6           | 78                                      | 132    | 231    | 121             |
|         | 13,3           | 6,1      | 72,4           | 83                                      | 124    | 194    | 118             |
| SatAAS+ | 14,6           | 6,9      | 72,3           | 68                                      | 116    | 200    | 107             |
|         | 16,6           | 7,6      | 72,9           | 71                                      | 120    | 205    | 111             |

## 4.2 Resultados globais e análise comparativa

A Tabela 14 resume os principais resultados obtidos pelas diversas técnicas de análise e para os diferentes testes efectuados.

Tabela 14 – Tabela resumo dos principais resultados obtidos, pelas diversas técnicas de análise e para os diferentes testes efectuados

| Teste   | Ef. encaps (%) | Conc (%) | Ef. global (%) | PZ médiumV | Distribuição de Tamanhos, $\mu\text{m}$ |         |         |                 | Forma das partículas   | Detalhes de Estrutura  |                            | TL (% libert às 6 horas) |
|---------|----------------|----------|----------------|------------|---|---------|---------|-----------------|------------------------|--|----------------------------|--------------------------|
|         |                |          |                |            | d (0,1)                                 | d (0,5) | d (0,9) | D <sub>32</sub> |                        | Superfície Exterior  | Interior da partícula      |                          |
| Base    | 13,4           | 6,4      | 73,6           | - 14,6     | 78                                      | 132     | 231     | 121             | F. esférica            | Sup. lisa, com poucos poros e pequenos   | Poros ~ 1-10 $\mu\text{m}$ | 71%                      |
| SatAAS+ | 14,6           | 6,9      | 72,3           | - 9,0      | 68                                      | 116     | 200     | 107             | Na maioria, esféricas  | Sup. lisa com praticamente ausência de poros. Existência de grande cavidade à superfície | -                          | 78%                      |
| N+      | 9,4            | 5,8      | 59,7           | -13,6      | 60                                      | 93      | 171     | 91              | F. esférica            | Sup. rugosa com poros, alguns com profundidade   | -                          | -                        |
| T+      | 12,4           | 6,8      | 64,2           | -11,6      | 104                                     | 180     | 320     | 166             | F. alongada, agregação | Sup. lisa, poucos poros e muito pequenos   | Poros ~ 3-15 $\mu\text{m}$ | 64%                      |
| AAS-    | 34,1           | 8,4      | 70,6           | -19,5      | 42                                      | 71      | 186     | 70              | F. esférica            | Sup. rugosa com poros e profundos  | -                          | -                        |

Relativamente à eficiência de encapsulação verifica-se que é baixa em todos os testes, exceptuando o teste AAS-. Com este resultado pode-se concluir que a fraca eficiência de encapsulação não se deve à saturação de AAS na fase aquosa não ser de 100%. Também se conclui que a temperatura e a rotação não provocam alterações significativas na eficiência de encapsulação. As mesmas conclusões são tiradas para a concentração de AAS nas microcápsulas. No teste AAS-, tal como era esperado, a eficiência de encapsulação aumentou. Também se verificou um aumento na concentração de AAS nas partículas, no entanto este não foi tão significativo.

Observando os resultados obtidos para o potencial zeta médio verifica-se que à medida que a massa total inicial de AAS aumenta, o potencial zeta médio diminui (i.e. aproxima-se de

zero), sendo o teste SatAAS+ o que apresenta menor valor de  $PZ_{médio}$ , e o teste AAS- o que apresenta maior valor. Comparando estes valores com os obtidos para a etilcelulose (-42,4 mV) e para o AAS (+1,75 mV) verifica-se que o teste SatAAS+, onde a quantidade de AAS é maior, se aproxima mais do valor obtido para o AAS, o que pode levar a concluir que a superfície destas partículas têm mais AAS na sua constituição do que as partículas do teste AAS- onde o valor é mais próximo do valor da etilcelulose.

A Figura 22 mostra a distribuição de tamanhos para quatro testes diferentes. As curvas apresentam o mesmo comportamento e diferenciam-se umas das outras em deslocamentos para a esquerda ou para a direita. Em relação ao teste base (TB), as curvas dos testes N+ e SatAAS+ deslocam-se para tamanhos mais pequenos, enquanto que o deslocamento da curva do teste T+ é para a direita, indicando tamanhos maiores, o que pode resultar de agregação de partículas. Como é possível na Figura 23, o único teste que apresenta um comportamento diferente dos outros é o teste AAS-, com uma distribuição de tamanhos com duas modas.

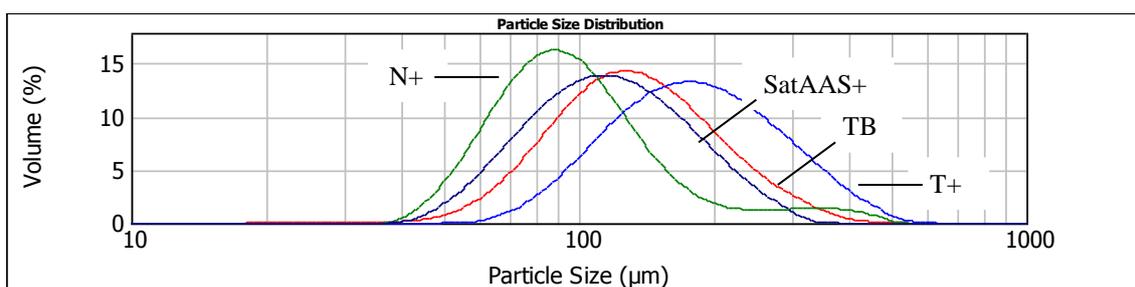


Figura 22 – Distribuição do tamanho das partículas dos testes base, SatAAS+, N+ e T+.

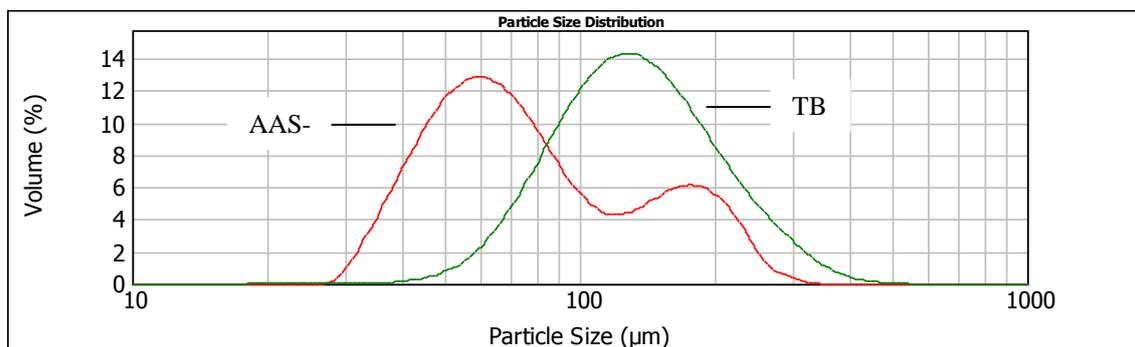


Figura 23 – Distribuição do tamanho das partículas dos testes base e AAS-.

Analisando as imagens obtidas por microscopia óptica presentes na Figura 24 podemos concluir que as partículas do teste SatAAS+ são, na sua maioria esféricas, mas que também

existem partículas de forma mais alongada (ovais). As partículas do teste N+ são maioritariamente esféricas enquanto que as partículas dos testes T+ e AAS- apresentam agregados.

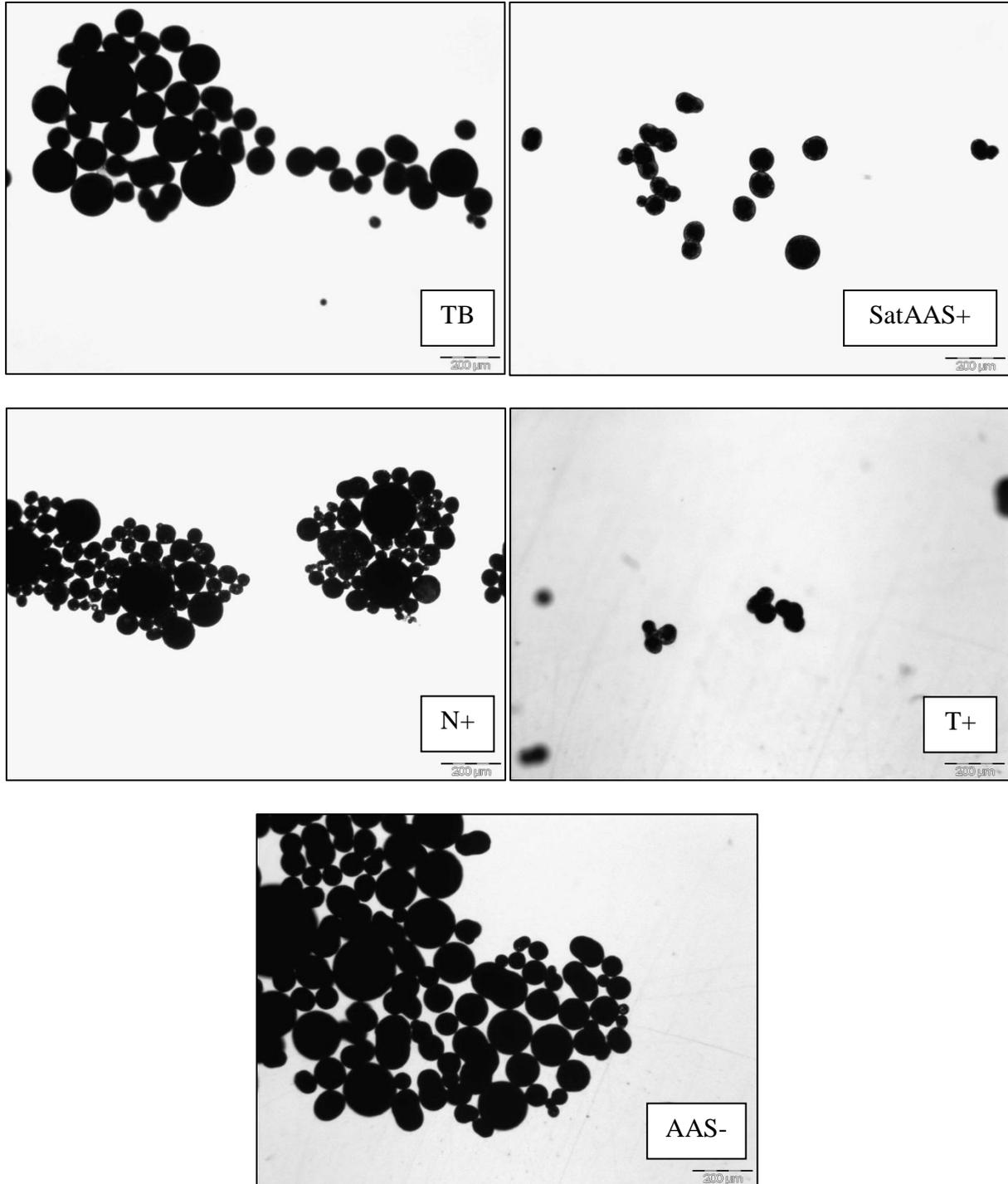


Figura 24 – Imagens de microscopia óptica (200 μm) das partículas para os vários teste realizados.

Analisando a Figura 25, onde se encontram imagens captadas por MEV dos diversos testes realizados, verifica-se que existem partículas no teste SatAAS+ que têm forma esférica mas que existem outras partículas com uma forma mais irregular, mais alongada (oval). Quanto à superfície, esta é lisa com ausência, quase total, de poros. Também é possível constatar que estas partículas têm uma característica única (comparativamente com os outros testes) que é a existência de uma grande cavidade à superfície.

Quanto às partículas obtidas no teste N+ é notório que estas têm uma superfície rugosa, onde se verifica a existência de pequenas cavidades circulares, algumas profundas. Este tipo de superfície pode ser explicado com base no aumento da velocidade de rotação, que acelera a evaporação do solvente levando à formação de partículas menos perfeitas.

Ao visualizar as partículas do teste T+, confirma-se que estas têm forma esférica mas que na sua maioria se encontram agregadas. A sua superfície é lisas, com poucos poros e muito pequenos. A agregação observada pode ser explicada pelo facto do aumento da temperatura acelerar a evaporação, mas como o tempo do processo foi o mesmo que para o teste base, as partículas já formadas vão ficar mais tempo em suspensão.

No caso do teste AAS- as partículas apresentam uma superfície bastante rugosa com a existência de algumas pequenas cavidades circulares e profundas.

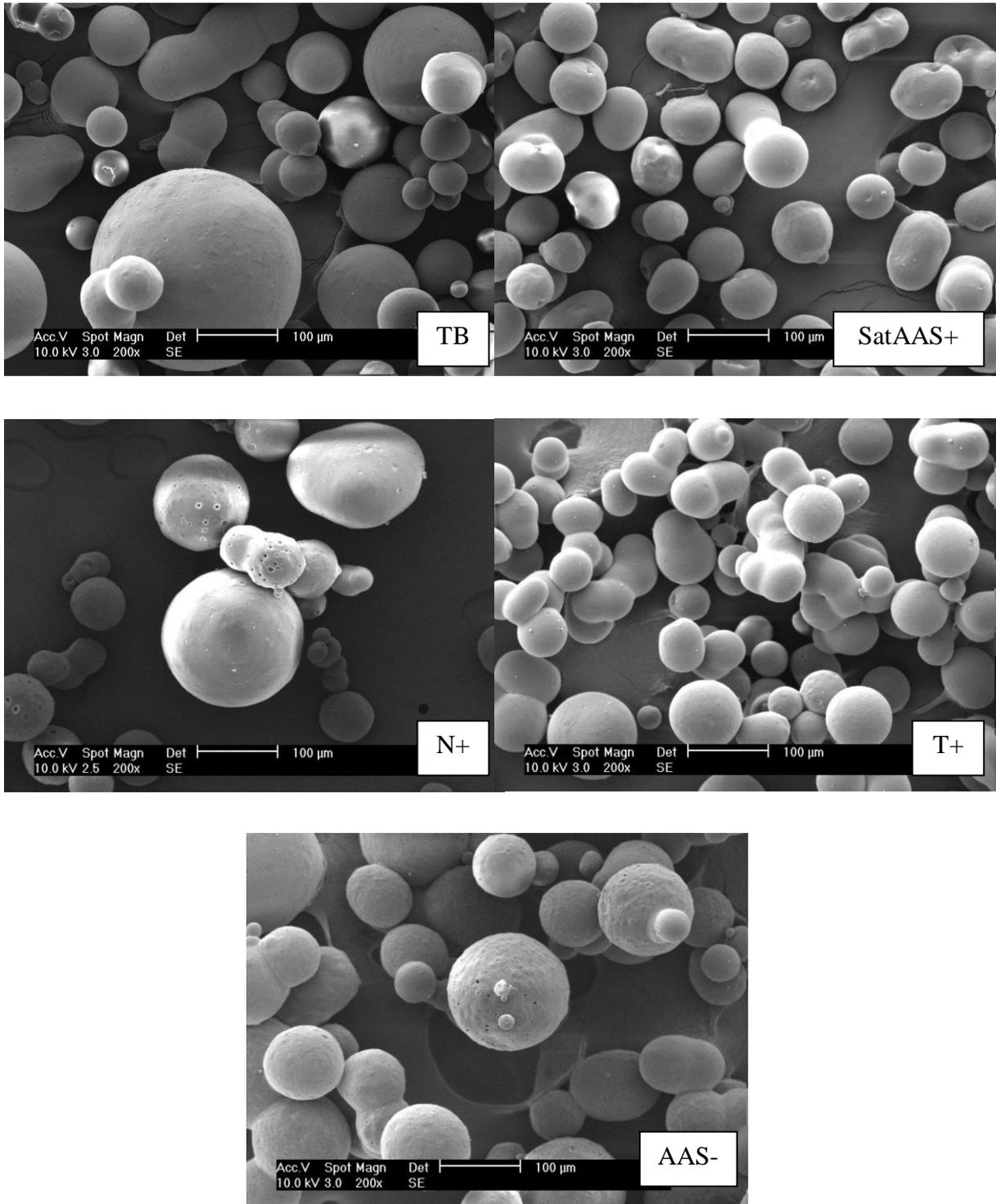


Figura 25 – Imagens obtidas por MEV da superfície das partículas dos vários testes realizados (100µm).

Quanto à estrutura interna (Figura 26), só foram obtidas imagens para o teste base e para o teste T+. Comparando ambas as estruturas, verifica-se que a natureza é a mesma e que as partículas do teste base apresentam poros na gama de 1-10  $\mu\text{m}$ , aproximadamente, enquanto que os poros presentes nas partículas do teste T+ apresentam poros na gama de 3-15  $\mu\text{m}$ .

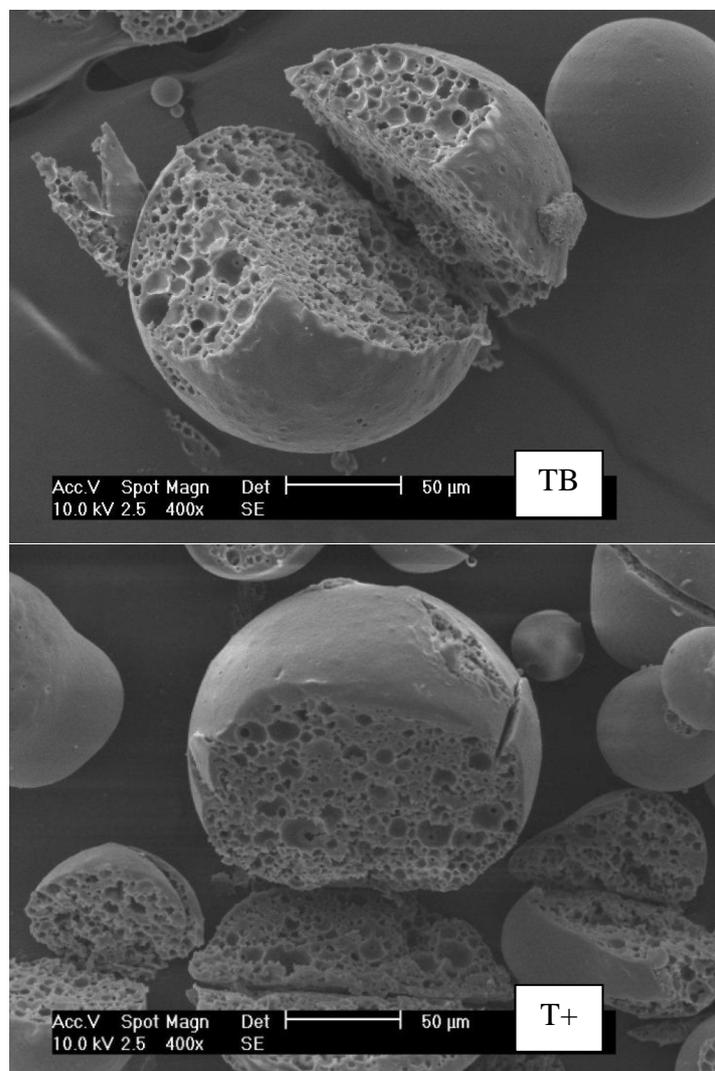


Figura 26 – Imagens obtidas por MEV do interior das partículas do teste base e do teste T+ (50 $\mu\text{m}$ )

No que toca aos testes de libertação são vários os aspectos que influenciam a libertação de AAS das partículas, destacando-se a estrutura interna, o AAS à superfície das partículas tal como a área de transferência que as partículas oferecem.

Quanto à estrutura interna, os testes dos quais esta é conhecida apresentam natureza idêntica e a gama de tamanhos dos poros não difere muito. Assim sendo, quanto à estrutura interna a taxa de libertação do AAS não deverá diferir muito. Relativamente ao AAS à

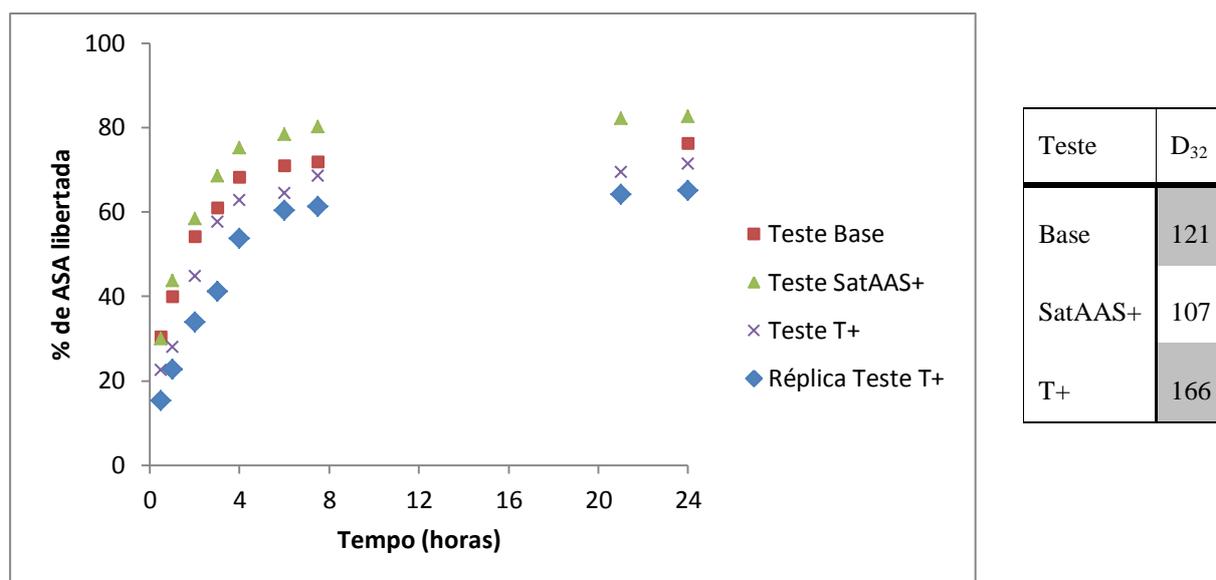
superfície das partículas, com as técnicas utilizadas não foi, de todo, perceptível a existência de AAS à superfície. Isto leva a que o estudo seja mais focado na área de superfície oferecida pelas partículas.

Pode-se relacionar a área de transferência da partícula com o diâmetro de Sauter através da seguinte equação <sup>42</sup>:

$$\frac{\text{Área de transferência}}{\text{Volume}} = \frac{6}{D_{32}}$$

Daqui conclui-se que quando o diâmetro da partícula aumenta, o diâmetro de Sauter também aumenta levando a uma diminuição da área de transferência da partícula.

A Figura 27 mostra os gráficos obtidos para os testes de libertação efectuados, tal como os valores de  $D_{32}$  obtidos para cada caso.



| Teste   | $D_{32}$ |
|---------|----------|
| Base    | 121      |
| SatAAS+ | 107      |
| T+      | 166      |

Figura 27 – Testes de libertação para os testes base, SatAAS+ e T+ durante 24 horas.

Analisando os perfis obtidos para os três testes efectuados e a réplica feita no teste T+ verifica-se que a diferença entre o teste T+ e a réplica é da mesma ordem da encontrada nos testes de libertação dos outros três testes, o que leva a concluir que a diferença entre os três testes pode não ser significativa. Mesmo assim é possível verificar que existe uma relação entre a velocidade de libertação de AAS e o  $D_{32}$ . Quanto maior é o  $D_{32}$ , menor vai ser a velocidade de libertação de AAS. Isto vai de encontro à teoria explicitada do diâmetro de Sauter.

É possível verificar através dos dados obtidos para o teste SatAAS+ que a percentagem de AAS libertado às 24 horas só alcança o valor de aproximadamente 83%. De forma a averiguar se o AAS ainda estava em processo de libertação, foi retirada uma amostra decorridos 3 dias e o valor obtido foi praticamente o mesmo obtido às 24 horas do processo. Deste modo e para averiguar se ainda existia AAS nas partículas que se encontravam dentro do saco e aquelas que durante o processo tinham vindo para o meio aquoso, procedeu-se a uma análise em UV-vis utilizando o método usado para a eficiência de encapsulação, tendo-se procedido a uma filtração e secagem do conteúdo do copo e do saco.

Após análise em UV-vis, comprovou-se que cerca de 14% de AAS tinha ficado retido nas partículas, o que somando com a percentagem de AAS libertado durante o processo, perfaz o valor de 97% ( $\cong 100\%$ ).

Uma das razões que pode impedir a libertação da totalidade de AAS durante o processo é o facto de as partículas que saíram do saco ficarem praticamente em repouso uma vez que a agitação ocorre dentro do saco e, assim, seja dificultada a libertação de AAS.

## 5. Conclusões

O trabalho descrito ao longo desta dissertação culminou com a obtenção de características de partículas em função da formulação e das condições do processo de fabrico.

Antes da análise dos resultados finais obtidos, metas intermédias atingidas merecem alguns comentários. Para se estabelecer a formulação do teste base foram necessários vários testes até obter resultados satisfatórios. As partículas obtidas no teste base são esféricas e a sua superfície é lisa e com ausência, quase total, de poros. Quanto à eficiência de encapsulação, o valor obtido foi baixo. No Teste SatAAS+ foi estudada a saturação de AAS na fase aquosa de forma a verificar em que medida a eficiência de encapsulação dependia desta característica. A eficiência de encapsulação não sofreu alterações significativas quando comparada com o teste base. As partículas obtidas no Teste SatAAS+ são, na sua maioria, esféricas e apresentam cavidades características. No Teste N+ aumentou-se a velocidade de rotação de forma a averiguar a tendência esperada de diminuição do tamanho das partículas. Neste teste, comprovou-se a diminuição do tamanho das partículas e estas são rugosas, com pequenas cavidades circulares, algumas profundas. No Teste T+ a propriedade em estudo foi a temperatura, tendo sido aumentada em 10 °C. As partículas apresentam uma forma esférica e na sua maioria encontram-se agregadas, o que provocou uma libertação de AAS mais lenta. No Teste AAS-, a característica estudada foi a percentagem de AAS na fase dispersa, tendo esta sido reduzida. As partículas obtidas neste teste são muito rugosas, com algumas cavidades circulares profundas.

Não foi possível averiguar mais características de partículas relacionadas com propriedades do processo de fabrico e formulação devido a limitações de tempo e recursos. Contudo, os estudos realizados apresentaram resultados importantes, principalmente, quanto a características de superfície das partículas e à importância de dominar um conjunto alargado de técnicas de análise para efectuar um estudo da gama de estruturas que é possível produzir.

Segundo uma perspectiva de procura contínua, podem ser indicadas algumas sugestões para trabalhos futuros a realizar nesta área tais como:

- i. Testes com variação mais extensa dos parâmetros de entrada (i.e. outros valores de N, de T, do rácio AAS:EC);

- ii. Estudar, de forma mais aprofundada, a possível relação entre o valor do potencial zeta e a constituição da superfície das partículas (e.g. através de análise química associado a MEV);
- iii. Inclusão de mais parâmetros de entrada (e.g. concentração da fase dispersa, concentração do surfactante);
- iv. Planeamento e execução de novos testes variando outros parâmetros de formulação e processuais (e.g. pressão, solvente)
- v. Planeamento e execução de novos testes com variação simultânea de vários parâmetros de modo a concretizar um estudo sistemático de formação de estrutura.

## Bibliografia

1. Hill M. Product and Process Design for Structured Products. *AIChE Journal*. 2004;50(8), 1656-1661.
2. Hill M. Chemical Product Engineering - the Third Paradigm. *Computers & Chemical Engineering*. 2009;33(5), 947-953.
3. Benita S. *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*. Vol 158. 1<sup>a</sup> ed. New York: Taylor & Francis Group; 1996.
4. Poncelet D. Microencapsulation: fundamentals, methods and applications, In: Blitz, Jonathan; Gun'ko, Vladimir, eds. *Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science*: Springer; 2006.
5. Li M, Poncelet D, Rouand O. Microencapsulation by Solvent Evaporation. Paper presented at: XVth International Workshop on Bioencapsulation, 2007; Vienna.
6. Brasileiro JSL. *Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas*. Porto: Universidade Fernando Pessoa - Faculdade de Ciências da Saúde; 2011. Tese de Mestrado.
7. Zanetti BG, Soldi V, Lemos-Senna E. Efeito da adição de polietilenoglicóis nas formulações de microesferas de acetobutirato de celulose sobre a eficiência de encapsulação da carbamazepina e morfologia das partículas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2002;38(2), 229-236.
8. Freitas S, Merkle HP, Gander B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of Controlled Release*. 2004;102(2), 313-332.
9. Li M, Rouad O, Poncelet D. Microencapsulation by Solvent Evaporation: State of the Art for Process Engineering Approaches. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;363(1-2), 26-39.
10. Bahl Y, Sah H. Dynamic Changes in Size Distribution of Emulsion Droplets During Ethyl Acetate-Based Microencapsulation Process. *AAPS PharmSciTech*. 2000;1(1),

article 5.

11. Freytag T, Dasheusky A, Tillman L, Hardee G, Bodmeier R. Improvement of the encapsulation efficiency of oligonucleotide-containing biodegradable microspheres. *Journal of Controlled Release*. 2000;69(1),197-207.
12. Sah H. Microencapsulation techniques using ethyl acetate as a dispersed solvent: effects of its extraction rate on the characteristics of PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release*. 1997;47(3), 233-245.
13. Yang CY, Tsay SY, Chen BK. Application of Gelatin for Encapsulating Aspirin into Ethyl Cellulose Microcapsule in O/W Emulsion. *Chemical Engineering Communications*. 2001;186(1), 241-255.
14. ThermoSpectronic. Basic UV-vis Theory, Concepts and Applications. <http://www.molecularinfo.com/MTM/UV.pdf>. Accessed Novembro 2011.
15. Santos D, Neves G, C e Branco R. *Espectroscopia na Região do Ultravioleta/Visível*: Universidade Federal do Pará; 2010.
16. Weinrt PL. *Disciplina: Análise Orgânica* 2012.
17. Iwunze MO. Absorptiometric Determination of Acetylsalicylic Acid in Aqueous Ethanolic Solution. 2008;41(16), 2944-2953.
18. Malvern. Mastersizer 2000. Available at: <http://www.malvern.com>. Accessed Junho 2012.
19. Li FF. *Laser Transmission Spectroscopy: a Discussion of Technique and Studies of Biological*. Indiana: University of Notre Dame; 2012. Thesis of Doctor.
20. Xu R. *Particle Characterization: Light Scattering Methods*: Springer; 2001.
21. Geology C. Malvern Mastersizer 2000 Laser Diffraction Grain Size Analyzer. Available at: <http://departments.colgate.edu>. Accessed Junho 2012.
22. Antunes ES. *Flocculation Studies in Papermaking*. DEQ-FCTUC, Coimbra 2009. PhD Thesis.
23. Potencial Zeta. *Wikipédia*. Available at: <http://en.wikipedia.org>. Accessed Junho 2012.

24. Zeta potential measurement using laser Doppler electrophoresis. *Malvern*. Available at: <http://www.malvern.com/>. Accessed Junho 2012.
25. Bueno B. *Aspectos Cinéticos da Remoção de Cromo (III) por Flotação de Precipitados*: Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro; 2003. Tese de Mestrado.
26. BrasEq. Potencial Zeta: Tudo o que você sempre quis saber. Available at: <http://braseq.blogspot.pt/2011/06/potencial-zeta-tudo-o-que-voce-sempre.html>. Accessed Junho 2012.
27. Yang C, Tsay S, Tsiang R. An Enhanced Process for Encapsulating Aspirin in Ethyl Cellulose Microcapsules by Solvent Evaporation in as O/W Emulsion. *Journal of Microencapsulation*. 2000;17(3), 269-277.
28. Yang C, Tsay S, Tsiang RC. Encapsulating aspirin into a surfactant-free ethyl cellulose microsphere using non-toxic solvents by emulsion solvent-evaporation technique. *Journal of Microencapsulation*. 2001;18(2), 223-236.
29. Merck. Fichas de Segurança. *Merck Portugal*. <http://www.merck.pt/>. Accessed Setembro 2011.
30. Henderson RK, Jiménez-González C, Constable DJC, Alston SR. Expanding GSK's solvent selection guide – embedding sustainability into solvent selection starting at medicinal chemistry. *The Royal Society of Chemistry*. 2011;13, 854-862.
31. Prista LN, Alves AC, Morgado R, Lobo JS. *Tecnologia Farmacêutica*. Vol I. 6ª ed. Porto: Fundação Calouste Gulbenkian; 2002.
32. MegaloidDCM. Material Safety Data for: Methylene Chloride. Available at: <http://megaloid.ca/MSDS/Methylene%20Chloride.pdf>. Accessed Outubro 4, 2011.
33. Ethyl acetate, analytical standard. *Sigma-Aldrich*. Available at: <http://www.sigmaaldrich.com>. Accessed Outubro 2011.
34. Properties of water. *Wikipédia*. Available at: <http://en.wikipedia.org>. Accessed Outubro 2011.
35. TWEEN® 80. *Sigma-Aldrich*. Available at: <http://www.sigmaaldrich.com>. Accessed

Outubro 2011.

36. Acetylsalicylic acid, >99,0%, crystalline. *Sigma-Aldrich*. Available at: <http://www.sigmaaldrich.com>. Accessed Outubro 2011.
37. Paul E, Atiemo-Obeng V, Kresta S, eds. *Handbook of Industrial Mixing Science and Practice*. New Jersey: John Wiley & Sons; 2004.
38. Rawle, Alan. *Basic Principles of Particle Size Analysis*: Malvern.
39. Malvern. *Zetasizer Nano - User Manual* 2008.
40. TabletDissolution. Advice and information on all aspects of tablet dissolution testing. *TabletDissoluiton*. <http://www.tabletdissolution.com/education/>. Accessed Abril 2012.
41. Santos MA. *Guia dos Laboratórios III (Bloco de Métodos Ópticos)*. IST, Lisboa 2005.
42. Sauter mean diameter. *Wikipédia*. Available at: <http://en.wikipedia.org>. Accessed Junho 2012.
43. Mihranyan A, Stromme M, EK R. Influence of cellulose powder structure on moisture-induced degradation of acetylsalicylic acid. *European Journal of Pharmaceutical Science*. 2005;27(2-3), 220-225.
44. Venkatesan P, Manavalan R, Valliappan K. Microencapsulation: a vital technique in novel drug delivery system. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2009;1(4), 26-35.

## **Anexo A. Procedimento experimental para fabrico de microcápsulas**

Os valores apresentados dizem respeito ao teste base (Tabela 7 e Tabela 10).

### **1. Preparação da FASE DISPERSA**

1.1 Medir 23 mL de acetato de etilo e colocar num copo de 50 mL, mergulhado num banho com temperatura controlada a 25°C. Manter sob agitação magnética de 500 rpm.

1.2 Pesar rigorosamente cerca de 0,88 g de etilcelulose (4% da fase dispersa) e 0,44 g de ácido acetilsalicílico (2% da fase dispersa)

1.3 Adicionar, em conjunto, a etilcelulose e o ácido acetilsalicílico ao acetato de etilo, de forma lenta, para não formar aglomerados. Deixar agitar durante algum tempo até dissolução completa.

### **2. Preparação da FASE CONTÍNUA**

2.1 Num copo de 800ml colocar 400mL de água destilada e manter temperatura nos 25°C.

2.2 Adicionar 0,96 g de ácido acetilsalicílico (2,4 mg/mL). Agitar (700 rpm, agitação magnética) até dissolução do ácido acetilsalicílico (cerca de 30 minutos).

2.3 Adicionar 28 mL de acetato de etilo (80% de saturação), sob agitação magnética (500 rpm).

### **3. Pré-emulsão**

3.1 Retirar 35 mL de fase contínua para um copo alto de 600 mL (diâmetro = 10 cm), com duas chicanas e mergulhado num banho com temperatura controlada de 25 °C.

3.2 Adicionar cerca de 2 mL de Tween 80 à fase contínua no copo alto, menos 8 gotas que são adicionadas à restante fase contínua. Manter temperatura a 25 °C e agitação magnética 300 rpm.

3.3 Adicionar a fase dispersa, lentamente, com auxílio de uma vareta.

3.4 Emulsificar durante 30 minutos, sob agitação magnética (300 rpm).

#### **4. Emulsão**

4.1 Adicionar lentamente a restante fase contínua à pré-emulsão, com auxílio de uma vareta e sob agitação mecânica (600 rpm).

4.2 Marcar o nível da solução no copo.

4.3 Emulsificar, sob agitação mecânica, durante 15 minutos a 25 °C.

#### **5. Aquecimento da mistura e Evaporação do solvente**

5.1 Elevar a temperatura da emulsão até aos 50 °C (temperatura set-point termopar = 50 °C, temperatura da placa de agitação = 200 °C), mantendo a agitação mecânica (600 rpm).

5.2 Depois de atingidos os 50 °C, manter a agitação durante 2h, para que o acetato de etilo evapore. O nível deve baixar o correspondente ao volume de acetato de etilo adicionado em ambas as fases.

#### **6. Filtração e Lavagem das microcápsulas**

6.1 Filtrar sob vácuo, usando um papel de filtro previamente seco e levado a peso constante.

6.2 Lavar a amostra com água destilada, até não haver formação de espuma (volume de lavagem semelhante ao volume da fase contínua; lavagem final feita com esguicho).

## **7. Secagem das microcápsulas**

7.1 Colocar o filtro com a amostra numa estufa, durante 24h, a 50 °C.

7.2 Após as 24h, retirar o filtro com a amostra e colocar num exsiccador durante 1 hora. Após isso, procede-se à primeira pesagem.

7.3 Voltar a colocar o filtro com a amostra na estufa durante 1 hora, a 50 °C. Após isso, proceder à segunda pesagem.

7.4 Voltar a 7.2 até que as pesagens não difiram em mais de 2 mg.

## **8. Peneiração da amostra**

8.1 Peneirar a amostra seca, usando um peneiro com malha de 600 µm (de modo a separar resíduos e/ou aglomerados).

8.2 Guardar a amostra no exsiccador.

## **9. Divisão da amostra**

9.1 Dividir amostra em divisor de amostras, obtendo 8 fracções representativas.

9.2 Guardar as fracções da amostra no exsiccador.

## Anexo B. Análise de solvente ao longo do tempo de evaporação

O tempo de evaporação necessário foi determinado por análise do acetato de etilo presente na mistura. Retiraram-se amostras de 5 mL ao longo do tempo, que foram depois submetidas a extracção 2 vezes com 20 mL de diclorometano, no total das 2 extracções. O extracto foi analisado via cromatografia gasosa, obtendo-se os resultados da Tabela 15.

Tabela 15 – Concentração de acetato de etilo no extracto ao longo do tempo de evaporação.

| Tempo de evaporação | % (w/w) de Acetato de Etilo |
|---------------------|-----------------------------|
| 1h00                | 0,311                       |
| 1h15                | 0,189                       |
| 1h30                | 0,024                       |
| 1h45                | Nd                          |
| 2h00                | Nd                          |

## ANEXO C. Detalhes relativos à determinação da eficiência de encapsulação

### 1. Curva de Calibração do Ácido Acetilsalicílico

#### 1.1 Solução-stock de ácido acetilsalicílico: 0,9 g/L

Pesar rigorosamente cerca de 0,045 g de ácido acetilsalicílico. Registrar a massa pesada. Colocar num balão volumétrico de 50mL, adicionar etanol e colocar em agitação até solubilizar. Aferir com etanol.

Foi pesado 0,0454g de ácido acetilsalicílico.

#### 1.2 Padrões para construir a curva de calibração

Tabela 16 – Valores de concentração dos padrões utilizados para construção da curva de calibração.

| Padrão | Volume de Solução stock 3.1 (mL) | Volume Total etanol (mL) | C <sub>padrão</sub> (g/L) |
|--------|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| P1     | 1                                | 25                       | 0,036                     |
| P2     | 2                                |                          | 0,073                     |
| P3     | 3                                |                          | 0,109                     |
| P4     | 4                                |                          | 0,145                     |
| P5     | 5                                |                          | 0,182                     |

### 1.3 Curva de Calibração

Tabela 17 – Valores de absorvância, para  $\lambda=275\text{nm}$ , obtidos na leitura dos padrões de ácido acetilsalicílico

| Padrão | $C_{\text{padrão}}$ (g/L) | Absorvância <sub>média</sub> |
|--------|---------------------------|------------------------------|
| P1     | 0,036                     | 0,243                        |
| P2     | 0,073                     | 0,472                        |
| P3     | 0,109                     | 0,698                        |
| P4     | 0,145                     | 0,924                        |
| P5     | 0,182                     | 1,148                        |

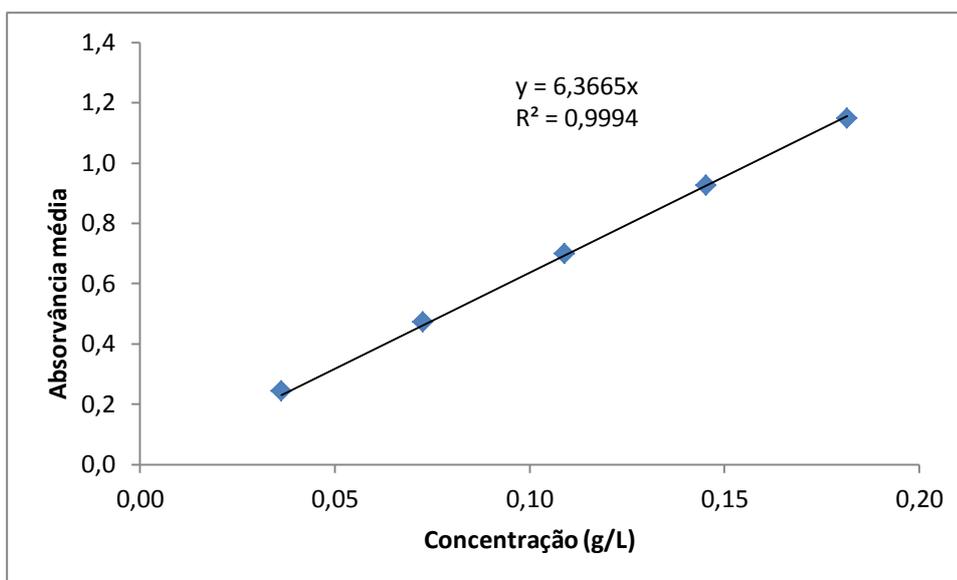


Figura 28 – Curva de calibração obtida para padrões de ácido acetilsalicílico em etanol puro,  $\lambda = 275\text{nm}$ .

## 2. Curva de Calibração do Ácido Salicílico

### 2.1 Solução-stock de ácido salicílico: 0,2 g/L

Pesar rigorosamente cerca de 0,02 g de ácido salicílico. Registrar a massa pesada. Colocar num balão volumétrico de 100mL, adicionar etanol e colocar em agitação até solubilizar. Aferir com etanol.

Foi pesado 0,0209g de ácido salicílico.

## 2.2 Padrões para construir a curva de calibração

Tabela 18 – Valores de concentração dos padrões utilizados para construção da curva de calibração.

| Padrão | Volume de Solução stock 3.1 (mL) | Volume Total etanol (mL) | C <sub>padrão</sub> (g/L) |
|--------|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| P1     | 1                                | 25                       | 0,008                     |
| P2     | 2                                |                          | 0,017                     |
| P3     | 3                                |                          | 0,025                     |
| P4     | 4                                |                          | 0,033                     |
| P5     | 5                                |                          | 0,042                     |

## 2.3 Curva de Calibração

### 2.3.1 $\lambda = 302 \text{ nm}$

Tabela 19 – Valores de absorvância, para  $\lambda=302\text{nm}$ , obtidos na leitura dos padrões.

| Padrão | C <sub>padrão</sub> (g/L) | Absorvância <sub>média</sub> |
|--------|---------------------------|------------------------------|
| P1     | 0,008                     | 0,230                        |
| P2     | 0,017                     | 0,448                        |
| P3     | 0,025                     | 0,667                        |
| P4     | 0,033                     | 0,886                        |
| P5     | 0,042                     | 1,101                        |

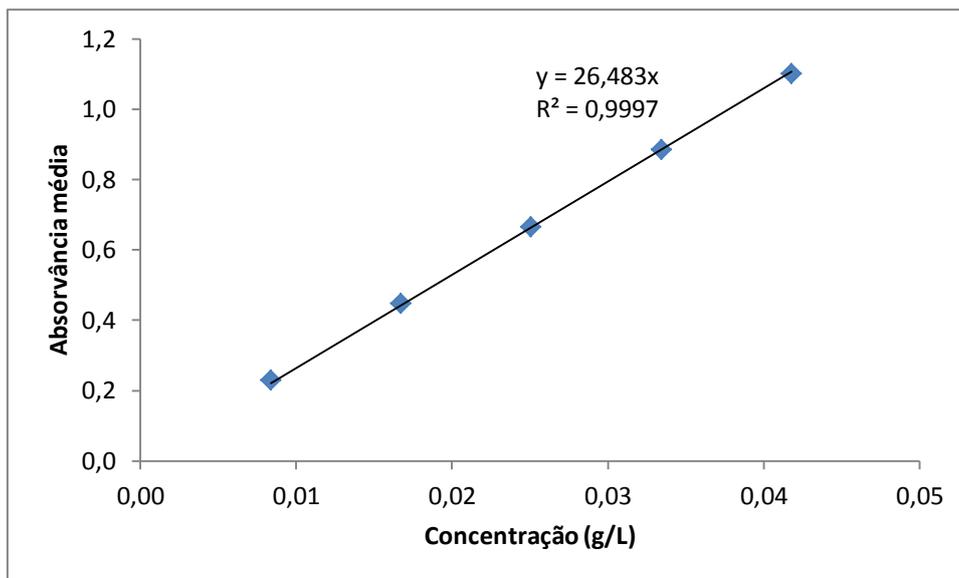


Figura 29 – Curva de calibração obtida para padrões de ácido salicílico em etanol puro, para  $\lambda = 302\text{nm}$ .

### 2.3.2 $\lambda = 275\text{nm}$

Tabela 20 – Valores de absorvância, para  $\lambda=275\text{nm}$ , obtidos na leitura dos padrões

| Padrão | $C_{\text{padrão}} \text{ (g/L)}$ | Absorvância <sub>média</sub> |
|--------|-----------------------------------|------------------------------|
| P1     | 0,008                             | 0,046                        |
| P2     | 0,017                             | 0,088                        |
| P3     | 0,025                             | 0,131                        |
| P4     | 0,033                             | 0,176                        |
| P5     | 0,042                             | 0,219                        |

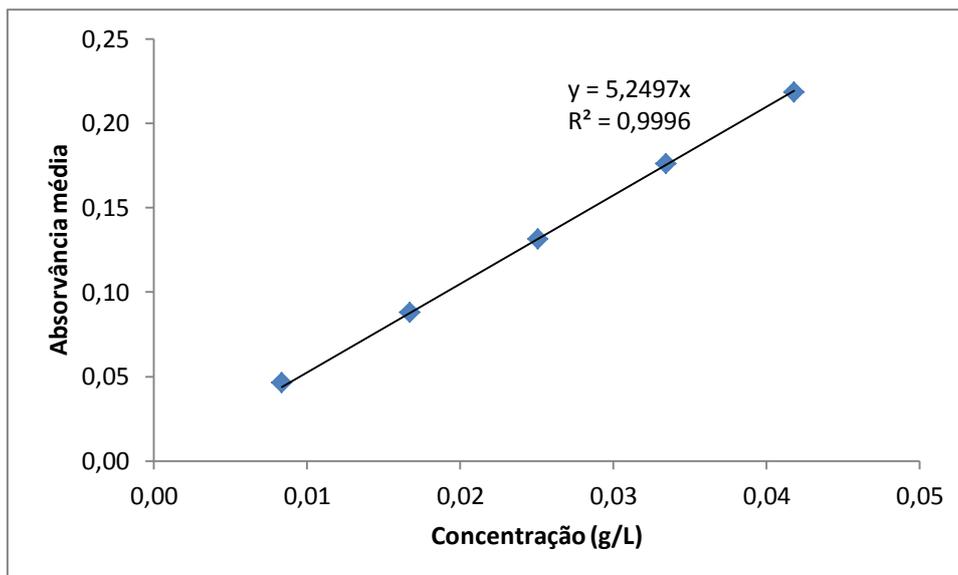


Figura 30 – Curva de calibração obtida para padrões de ácido salicílico em etanol puro, para  $\lambda = 275\text{nm}$ .

### 3. Preparação da amostra

3.1 Pesar rigorosamente uma das porções de amostra, resultantes da divisão prévia da amostra.

3.2 Dissolver em etanol, durante 2h.

### 4. Leituras em UV-vis

#### 4.1 Curva de Calibração

4.1.1 Branco: Colocar etanol na célula de quartzo. Limpar muito bem a célula e colocar no espectrofotômetro. Fazer o varrimento do espectro do etanol com branco entre 800 e 200nm.

4.1.2 Padrões: Colocar o padrão de menor concentração, P1, na célula e fazer a leitura na mesma gama de comprimento de onda do branco. Registrar a absorvância para o comprimento de onda adequado. Repetir a leitura 3 vezes. Repetir para os padrões P2, P3, P4 e P5, tendo o cuidado de lavar a célula com o padrão a ler, entre cada leitura.

#### 4.2 Amostra

Repetir 4.1.1.

Colocar a amostra na célula, previamente passada por etanol e varrer o espectro na mesma gama de comprimentos de onda. Registrar o valor de absorvância para o comprimento de onda adequado. Repetir 3 vezes.

## ANEXO D. PROCEDIMENTO DA ANÁLISE EM UV-vis para TESTE DE LIBERTAÇÃO

### 1. Curva de Calibração do Ácido Acetilsalicílico

#### 1.1 Solução-stock de ácido acetilsalicílico: 0,2 g/L

Pesar rigorosamente cerca de 0,02 g de ácido acetilsalicílico. Registrar a massa pesada. Colocar num balão volumétrico de 100mL, adicionar 50mL de água destilada e 50mL de solução aquosa de NaOH (para converter o ácido acetilsalicílico a ácido salicílico).

Foi pesado 0,0205g de ácido acetilsalicílico.

#### 1.2 Padrões para construir a curva de calibração

Tabela 21 – Valores de concentração dos padrões utilizados para construção da curva de calibração

| Padrão | Volume de Solução stock 3.1 (mL) | Volume Total (mL) | C <sub>padrão</sub> (g/L) |
|--------|----------------------------------|-------------------|---------------------------|
| P1     | 1                                | 25                | 0,008                     |
| P2     | 2                                |                   | 0,016                     |
| P3     | 3                                |                   | 0,025                     |
| P4     | 4                                |                   | 0,033                     |
| P5     | 5                                |                   | 0,041                     |
| P6     | 6                                |                   | 0,049                     |
| P7     | 7                                |                   | 0,057                     |

### 1.3 Curva de Calibração

Tabela 22 – Valores de absorvância, para  $\lambda=296\text{nm}$ , obtidos na leitura dos padrões de ácido acetilsalicílico

| Padrão | $C_{\text{padrão}} \text{ (g/L)}$ | Absorvância <sub>média</sub> |
|--------|-----------------------------------|------------------------------|
| P1     | 0,008                             | 0,167                        |
| P2     | 0,016                             | 0,326                        |
| P3     | 0,025                             | 0,449                        |
| P4     | 0,033                             | 0,617                        |
| P5     | 0,041                             | 0,801                        |
| P6     | 0,049                             | 0,943                        |
| P7     | 0,057                             | 1,092                        |

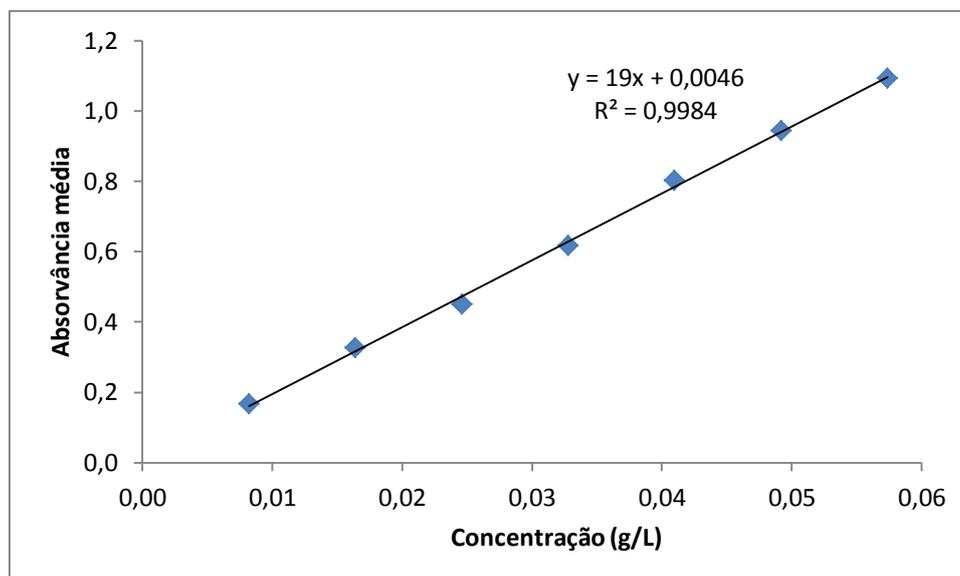


Figura 31 – Curva de calibração obtida para padrões de ácido acetilsalicílico

## **2. Leituras em UV-vis**

### **2.1 Curva de Calibração**

2.1.1 Branco: Colocar água destilada na célula de quartzo. Limpar muito bem a célula e colocar no espectrofotômetro. Fazer o varrimento do espectro do etanol com branco entre 800 e 200nm.

2.1.2 Padrões: Colocar o padrão de menor concentração, P1, na célula e fazer a leitura na mesma gama de comprimento de onda do branco. Registrar a absorvância para o comprimento de onda 296nm. Repetir a leitura 3 vezes. Repetir para os outros padrões, tendo o cuidado de lavar a célula com o padrão a ler, entre cada leitura.