

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA

Vitor Brandão Boechat



NANOSSUSPENSÃO DE EFVIRENZ OBTIDA POR
METODOLOGIA *BOTTOM-UP*: OTIMIZAÇÃO EXPERIMENTAL

RIO DE JANEIRO

2022

Vitor Brandão Boechat

NANOSSUSPENSÃO DE EFAVIRENZ OBTIDA POR METODOLOGIA *BOTTOM-UP*:
OTIMIZAÇÃO EXPERIMENTAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

Orientador(es): Erika Christina Ashton Nunes Chrisman
Nevardo Bello Yaya
Helvécio Vinícius Antunes Rocha

Rio de Janeiro

2022

CIP - Catalogação na Publicação

B669n Boechat, Vitor Brandão
Nanossuspensão de Efavirenz obtida por
metodologia bottom-up: otimização experimental /
Vitor Brandão Boechat. -- Rio de Janeiro, 2022.
92 f.

Orientadora: Erika Christina Ashton Nunes
Chrisman.
Coorientador: Nevarado Bello Yaya.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de
Química, Bacharel em Engenharia Química, 2022.

1. Efavirenz. 2. Planejamento de experimentos.
3. Nanossuspensão. I. Chrisman, Erika Christina
Ashton Nunes, orient. II. Yaya, Nevarado Bello,
coorient. III. Título.

Vitor Brandão Boechat

NANOSSUSPENSÃO DE EFAVIRENZ OBTIDA POR METODOLOGIA *BOTTOM-UP*:
OTIMIZAÇÃO EXPERIMENTAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola de Química da Universidade Federal do
Rio de Janeiro, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Engenheiro
Químico.

Aprovado em 15 de dezembro de 2022.

Prof.^a Erika Christina Ashton Nunes Chrisman, D.Sc., UFRJ

Prof. Nevardo Bello Yaya, M.Sc., UFRJ

Prof. Helvécio Vinícius Antunes Rocha, D.Sc., Fiocruz

Prof. Daniel Weingart Barreto, D.Sc., UFRJ

Prof. Francisco Alexandrino Júnior, D.Sc., Fiocruz

Rio de Janeiro
2022

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e fizeram de tudo para que eu trilhasse os melhores caminhos.

À professora e minha orientadora Erika Christina Ashton Nunes Chrisman, que me acolheu quando eu precisava e me deu todo o suporte, ajuda e conselhos necessários para que eu concluísse essa etapa de formação.

Ao meu coorientador Nevarado Bello Yaya, por todas as conversas, conselhos e direcionamentos nos momentos de dificuldade.

Ao meu coorientador Helvécio Vinícius Antunes Rocha, pela orientação, pela confiança depositada em mim e por ter disponibilizado os materiais, espaço e equipamentos para a realização deste trabalho.

À Flávia, ao Marcelo, ao Alexandrino e a todos os outros membros do Laboratório de Micro e Nanotecnologia, pela recepção, prestatividade e zelo ímpares enquanto compartilharam comigo seu espaço de trabalho.

Ao Marcelo Queiroz e ao Gabriel Pereira, assim como aos outros integrantes do DOPOLAB, pela amizade, recepção e apoio desde nosso primeiro contato.

À UFRJ e à Escola de Química, por fornecerem professores qualificados que aumentaram o nível do meu aprendizado.

*“And if you were to ask me,
After all that we’ve been through
‘Still believe in magic?’
Oh, yes, I do”*

(Guy Berryman / Jonny Buckland / Will Champion / Chris Martin)

RESUMO

BOECHAT, Vitor Brandão. **Nanossuspensão de Efavirenz obtida por metodologia *bottom-up*: otimização experimental**. Rio de Janeiro, 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença infecciosa que já provocou 36 milhões de mortes no mundo e quase 350 mil mortes no Brasil. Dentre os fármacos usados no seu combate, está o Efavirenz (EFV), que é fornecido pela Fundação Oswaldo Cruz ao Sistema Único de Saúde. Para este tratamento com EFV, altas doses do produto são necessárias, devido a sua baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade no organismo. Uma forma de minimizar este problema, buscando um aumento da sua biodisponibilidade, envolve o uso de nanopartículas do princípio ativo. Assim, o objetivo deste trabalho foi propor e otimizar um procedimento experimental para obtenção de nanossuspensão estável de EFV, por meio de precipitação em antissolvente, chamada de *bottom-up*. Para estabelecimento das condições operacionais e identificação da influência das variáveis composicionais: concentrações de EFV na FO e de estabilizantes na FA, foram executados experimentos preliminares, seguidos de um planejamento de experimentos do tipo fatorial completo (PFC). As amostras produzidas foram analisadas, imediatamente e após 1 hora de sua produção, quanto ao diâmetro médio de partícula (d_{AVG}) e índice de polidispersão (PDI), utilizando métodos de difração a laser e espalhamento dinâmico de luz (DLS). Para a otimização do sistema foi utilizado um Arranjo Compósito Central (CCD) construído no *software* Design-Expert. Os melhores resultados foram obtidos com a ausência do estabilizante de carga testado, laurilsulfato de sódio (LSS), e mantendo-se o uso do estabilizante estérico testado, a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) entre 26 e 35 %mEFV na FA e com 5 e 22% p/v de EFV na FO, permitindo a produção de nanossuspensões estáveis pelo método *bottom-up*. A condição otimizada, com 20% (p/v) de EFV na FO e 26% (%mEFV) de HPMC na FA, forneceu um diâmetro médio de partícula (d_{AVG}) de $271,3 \pm 5,0$ nm e um índice de polidispersão (PDI) de $0,124 \pm 0,013$, mostrando ser promissor o emprego desta metodologia.

Palavras-chave: Efavirenz; planejamento de experimentos; nanossuspensão.

ABSTRACT

BOECHAT, Vitor Brandão. **Nanossuspensão de Efavirenz obtida por metodologia *bottom-up*: otimização experimental**. Rio de Janeiro, 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

The Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) is an infectious disease that has already caused 36 million deaths worldwide and almost 350,000 deaths in Brazil. Among the drugs used to fight it is Efavirenz (EFV), supplied by the Oswaldo Cruz Foundation to the Unified Health System. For this EFV treatment, high doses of the product are required, due to its low solubility in water and low bioavailability. A way to minimize this problem, seeking to increase its bioavailability, involves the use of nanoparticles of the active principle. Thus, the objective of this work was to propose and optimize an experimental procedure to obtain a stable EFV nanosuspension, through bottom-up precipitation in antisolvent. To establish the operating conditions and identify the influence of compositional variables: concentrations of EFV in the organic phase (OP) and stabilizers in the aqueous phase (AP), preliminary experiments were carried out, followed by a full factorial design of experiments. The samples produced were analyzed, immediately and after 1 hour of their production, regarding the mean particle diameter (d_{AVG}) and polydispersity index (PDI), using laser diffraction and dynamic light scattering (DLS) methods. For the system optimization, a Central Composite Design (CCD) built in the Design-Expert software was used. The best results were obtained with the absence of the tested charge stabilizer, sodium dodecyl sulfate (SDS), and maintaining the use of the tested steric stabilizer, hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) between 26 and 35% (%mEFV) in the AP and with 5 and 22% (w/v) of EFV in the OP, allowing the production of stable nanosuspensions by the bottom-up method. The optimized condition, with 20% (w/v) EFV in the OP and 26% (%mEFV) HPMC in the AP, provided a mean particle diameter (d_{AVG}) of 271.3 ± 5.0 nm and a polydispersity index (PDI) of 0.124 ± 0.013 , showing that the use of this methodology is promising.

Keywords: Efavirenz; design of experiments; nanosuspension.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 – Estrutura química do EFV.....	20
Figura 2.2 – Quantidade de artigos publicados com as palavras-chave “drug” e “nanoparticles” na plataforma ScienceDirect entre 1997 e 2021.....	23
Figura 2.3 – Quantidade de artigos publicados com as palavras-chave “drug”, “nanoparticles” e “bioavailability” na plataforma ScienceDirect entre 1997 e 2021.....	23
Figura 2.4 – Resumo dos grupos de rotas tecnológicas descritos na literatura para a redução do tamanho de partícula.....	25
Figura 2.5 – Esquema de tecnologia de nanocristalização por SFE.....	28
Figura 2.6 – Metodologia de nanocristalização por antissolvente.....	29
Figura 2.7 – Esquema do método EASAI.....	30
Figura 2.8 – Esquema do método DBD-SAI.....	32
Figura 2.9 – Quantidade de artigos publicados com as palavras-chave “nanoparticles”, “design of experiments” (barras azuis) e “drug” (barras laranjas) na plataforma ScienceDirect entre 1997 e 2021.....	34
Figura 2.10 – CCD circunscrito para um planejamento fatorial de 2 variáveis.....	38
Figura 3.1 – Fluxograma resumido dos experimentos de precipitação realizados.....	40
Figura 3.2 – Resumo da marcha experimental adotada neste trabalho.....	40
Figura 4.1 – Bomba peristáltica usada neste trabalho.....	47
Figura 4.2 – Visualização da espuma formada no ensaio E02.....	48
Figura 4.3 – Amostras E05 (à esquerda), E07 (centro) e E10 (à direita).....	49
Figura 4.4 – Aspecto visual da amostra E04.....	51
Figura 4.5 – Interação entre os fatores A e B e sua influência no valor medido de d_{AVG}	59
Figura 4.6 – Comparação entre os dados obtidos e os previstos no ajuste de d_{AVG}	63
Figura 4.7 – Visualizações da superfície de resposta do modelo obtido para o valor de d_{AVG}	64
Figura 4.8 – Comparação entre os dados obtidos e os previstos no ajuste de PDI.....	65
Figura 4.9 – Visualizações da superfície de resposta do modelo obtido para o valor de PDI.....	66
Figura 4.10 – Comparação entre os dados obtidos e os previstos no ajuste de d_{AVG} após 1h... 68	68
Figura 4.11 – Visualizações da superfície de resposta do modelo obtido para o valor de d_{AVG} após 1h.....	69

Figura 4.12 – Comparação entre os dados obtidos e os previstos no ajuste de PDI após 1h....	70
Figura 4.13 – Aspecto visual da amostra E44 1h após sua obtenção.....	73
Figura B.1 – Curva de calibração da bomba peristáltica com acetona.....	89
Figura B.2 – Curva de calibração da bomba peristáltica com metanol.....	90
Figura C.1 – Gráfico normalizado de resíduos do modelo obtido para o valor de d_{AVG} medido imediatamente	91
Figura C.2 – Gráfico normalizado de resíduos do modelo obtido para o valor de PDI medido imediatamente	91
Figura C.3 – Gráfico normalizado de resíduos do modelo obtido para o valor de d_{AVG} medido após 1h	92
Figura C.4 – Gráfico normalizado de resíduos do modelo obtido para o valor de PDI medido após 1h	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Número de fatores versus técnica de DoE.....	34
Tabela 2.2 – PFC do tipo 2^k com 4 variáveis.....	35
Tabela 2.3 – PFF do tipo 2^{k-p} com 6 variáveis e 2 fatores de redução.....	36
Tabela 3.1 – Relação dos ensaios iniciais para definição da metodologia.....	42
Tabela 3.2 – Relação dos ensaios realizados para a avaliação individual de parâmetros.....	43
Tabela 3.3 – Relação dos ensaios referentes ao Planejamento Fatorial Completo com duas variáveis.....	43
Tabela 3.4 – Relação dos ensaios referentes ao Método de Superfície de Resposta para as duas variáveis do PFC e dos ensaios de otimização.....	43
Tabela 4.1 – Solubilidade do EFV em diferentes solventes orgânicos.....	45
Tabela 4.2 – Distribuições de tamanhos de partícula, obtidas pelo Mastersizer, das amostras E4 a E13.....	50
Tabela 4.3 – Comparação dos tamanhos de partícula obtidos nos ensaios SN11, de Sartori (2016), com o ensaio E13, deste trabalho.....	52
Tabela 4.4 – Distribuições de tamanhos de partícula, obtidas pelo Mastersizer, das amostras E14, E15 e E16.....	54
Tabela 4.5 – Distribuições de tamanhos de partícula, obtidas pelo Mastersizer, das amostras E14, E19 e E20.....	55
Tabela 4.6 – Distribuições de tamanhos de partícula, obtidas pelo Mastersizer, das amostras E20 a E23.....	56
Tabela 4.7 – Diâmetro médio de partícula (d_{AVG}) e PDI, obtidos pelo Zetasizer, da amostra E23	56
Tabela 4.8 – Análises das amostras E23, E24 e E25 realizadas no Mastersizer e, quando aplicável, no Zetasizer.....	57
Tabela 4.9 – Análise das amostras E26 a E31 no Mastersizer e no Zetasizer.....	58
Tabela 4.10 – Efeitos de cada parâmetro do PFC para o d_{AVG} e para o PDI.....	59
Tabela 4.11 – ANOVA dos parâmetros do PFC para o d_{AVG}	60
Tabela 4.12 – ANOVA dos parâmetros do PFC para o PDI.....	60
Tabela 4.13 – Análise das amostras E32 a E42 no Mastersizer e no Zetasizer.....	62
Tabela 4.14 – ANOVA dos parâmetros do MSR para o d_{AVG}	62
Tabela 4.15 – ANOVA dos parâmetros do MSR para o PDI.....	64

Tabela 4.16 – Distribuições de tamanhos de partícula, obtidas pelo Mastersizer, das amostras E32 a E42 após uma hora, e comparação com valores iniciais.....	66
Tabela 4.17 – Diâmetro médio de partícula e PDI, obtidos pelo Zetasizer, das amostras E32 a E42 após uma hora.....	67
Tabela 4.18 – ANOVA dos parâmetros do MSR para o d_{AVG} após 1h.....	68
Tabela 4.19 – ANOVA dos parâmetros do MSR para o PDI após 1h.....	69
Tabela 4.20 – Restrições e resultado da minimização da concentração de HPMC para os valores de d_{AVG} e PDI obtidos em medição imediata.....	71
Tabela 4.21 – Restrições e resultado da minimização da concentração de HPMC para os valores de d_{AVG} e PDI obtidos após 1h.....	71
Tabela 4.22 – Análises da amostra E43 realizadas imediatamente e após 1h.....	71
Tabela 4.23 – Análises da amostra E44 realizadas no Mastersizer e no Zetasizer.....	72
Tabela A.1 – Distribuições de tamanhos de partícula de todas as medições realizadas pelo Mastersizer	81
Tabela A.2 – Diâmetros médios de partícula e PDIs de todas as medições realizadas pelo Zetasizer	86
Tabela B.1 – Pontos usados na calibração da bomba peristáltica com acetona.....	89
Tabela B.2 – Pontos usados na calibração da bomba peristáltica com metanol.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANOVA	Análise de variância
CCD	Arranjo Compósito Central
DBD-SAI	Interação solvente-antissolvente gota a gota
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DoE	<i>Design</i> de experimentos
EASAI	Interação solvente-antissolvente assistida por evaporação
EFV	Efavirenz
FA	Fase aquosa
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FO	Fase orgânica
FSC	Fluido supercrítico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPC	Hidroxipropilcelulose
HPH	Homogeneização de alta pressão
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
LSS	Laurilsulfato de sódio
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MSR	Método de superfície de resposta
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAA	Poli(ácido acrílico)
PDI	Índice de polidispersão
PFC	Planejamento fatorial completo
PFF	Planejamento fatorial fracionado
PrEP	Profilaxia pré-exposição
PVA	Poli(ácido vinílico)
PVP	Polivinilpirrolidona
RESS	Rápida expansão da solução supercrítica
SCAS	Antissolvente supercrítico
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SFE	Evaporação <i>flash</i> via <i>spray</i>

SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
UT	Ultra-turrax

LISTA DE SÍMBOLOS

%mEFV	Percentual em relação à massa de Efavirenz (-)
%p/v	Percentual peso/volume (-)
C	Concentração do sólido em determinado instante (g cm^{-3})
C_{∞}	Solubilidade de uma partícula infinitamente grande (g cm^{-3})
C_S	Solubilidade da partícula no meio (g cm^{-3})
D	Coefficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)
D_{10}	Diâmetro de partícula abaixo do qual encontra-se 10% da amostra (μm)
D_{50}	Diâmetro de partícula abaixo do qual encontra-se 50% da amostra (μm)
D_{90}	Diâmetro de partícula abaixo do qual encontra-se 90% da amostra (μm)
d_{AVG}	Diâmetro médio de partícula (nm)
dC/dt	Taxa de dissolução ($\text{g cm}^{-3} \text{s}^{-1}$)
h_D	Espessura da camada de difusão (cm^{-1})
M	Massa molar da partícula (g mol^{-1})
R	Constante universal dos gases ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)
r	Raio da partícula (cm)
ρ	Densidade da partícula (g cm^{-3})
S	Área superficial do sólido (cm^2)
T	Temperatura do meio (K)
V	Volume do meio de dissolução (cm^3)
γ	Tensão superficial entre a partícula e o meio (J cm^{-2})

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 OBJETIVOS	21
1.1.1 Geral	21
1.1.2 Específicos	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 O EFAVIRENZ (EFV)	22
2.2 DISSOLUÇÃO DE PARTÍCULAS	23
2.3 NANOPARTÍCULAS PARA O AUMENTO DA BIODISPONIBILIDADE DE FÁRMACOS	24
2.4 ROTAS PARA OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS	26
2.4.1 Métodos <i>top-down</i>	27
2.4.2 Métodos <i>bottom-up</i>	28
2.4.2.1 Presença de fluido supercrítico	29
2.4.2.2 Remoção de solvente	29
2.4.2.3 Efeito solvente/antissolvente	30
2.5 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS	35
2.5.1 Métodos de triagem	36
2.5.2 Métodos de otimização	39
3 METODOLOGIA.....	41
3.1 MATERIAIS	41
3.2 MATERIAIS	41
3.3 EXPERIMENTOS DE PRECIPITAÇÃO	41
3.4 MEDIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA E PDI	46
4 RESULTADOS	47
4.1 DEFINIÇÃO DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	47
4.1.1 Escolha do solvente da FO	47
4.1.2 Estabilizantes	48
4.1.3 Ensaios iniciais	49
4.1.3.1 Forma de promoção de agitação	49
4.1.3.2 Avaliação individual dos parâmetros composicionais.....	55
4.1.3.2.1 Concentração de EFV na FO	55
4.1.3.2.2 Concentração de estabilizantes na FA	56

4.2 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO (PFC).....	59
4.3 MÉTODO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR).....	63
4.4 OTIMIZAÇÃO NUMÉRICA.....	72
4.4.1 Teste exploratório de mudança de solvente	74
5 CONCLUSÕES.....	76
5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	76
6 REFERÊNCIAS.....	77
APÊNDICE A – DADOS DE MEDIÇÃO DO MASTERSIZER E DO ZETASIZER	83
APÊNDICE B – CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA BOMBA PERISTÁLTICA	91
APÊNDICE C – CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA BOMBA PERISTÁLTICA	93

1 INTRODUÇÃO

No início dos anos 1980, mais precisamente em 1982, vários relatos de uma nova doença infecciosa, nomeada Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS, na sigla em inglês), colocaram o mundo em estágio de alerta (CDC, 1982). Desde então, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de 79 milhões de pessoas tenham desenvolvido a doença, resultando em cerca de 36 milhões de mortes (OMS, 2021). No Brasil, o Ministério da Saúde contabilizou 1.011.617 casos de AIDS detectados desde 1980 até 31 de dezembro de 2019, além de 349.784 óbitos associados à condição (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Em 1983, a partir do isolamento do vírus da imunodeficiência humana (HIV), retrovírus responsável pela enfermidade, foi iniciada a corrida na busca por medicamentos que auxiliassem no tratamento contra a doença (BARRÉ-SINOUSI, 1983).

Dentre os produtos mais utilizados, destaca-se o Efavirenz (EFV), inserido no mercado em 1998, sob o nome comercial Sustiva®. No Brasil, o EFV é fornecido ao Sistema Único de Saúde (SUS), desde 2009, pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), tornando-se um dos protagonistas na luta contra o HIV. Concomitantemente, esse composto tem sido estudado e manipulado no intuito de se aumentar a eficácia do tratamento e, ao mesmo tempo, reduzir os efeitos adversos a ele relacionados (COCUZZA, 2001; SARTORI *et al*, 2022). Um dos caminhos adotados para tais objetivos foi buscar o aumento de sua biodisponibilidade, o que permitiria uma redução das doses usadas com aumento da eficácia terapêutica.

A biodisponibilidade de um princípio ativo tem relação direta com a taxa de dissolução do mesmo (AMIDON *et al*, 1995), que, por sua vez, é diretamente proporcional, dentre outros aspectos, à área superficial da partícula em questão (SEAGER, 2018). Quanto menor for o tamanho da partícula, maior será a sua área superficial relativa ao seu volume. Portanto, esta relação matemática entre a taxa de dissolução e o tamanho da partícula motiva a busca pela sua redução.

Estudos realizados nas últimas décadas avaliaram métodos de obtenção de nanopartículas de fármacos, considerados como uma maneira segura de se aumentar a biodisponibilidade dos mesmos (LIVERSIDGE e CUNDY, 1995; KECK e MÜLLER, 2006; GAO *et al*, 2012). Atualmente, existem diversas rotas tecnológicas em uso e em desenvolvimento, dentre as quais, a obtenção de nanopartículas de EFV a partir da precipitação em antissolvente, a qual tem apresentado resultados promissores em trabalhos recentes (KUMAR e SIRIL, 2020; SARTORI *et al*, 2022).

Com base nos dados de revisão da literatura e do emprego de técnicas de planejamento de experimentos, este trabalho teve como objetivo principal obter uma rota viável de nanoprecipitação do EFV, a partir de uma metodologia experimental baseada em técnicas de planejamento de experimentos. Através desse estudo, deseja-se avaliar as influências específicas de determinados parâmetros, com destaque para as concentrações de estabilizantes e de EFV, nos tamanhos de partícula obtidos. Espera-se que a metodologia proposta neste trabalho possa ser um modelo reproduzível aplicável a diferentes compostos no futuro.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Propor um procedimento experimental para obtenção de uma nanossuspensão estável de EFV por meio da metodologia *bottom-up*.

1.1.2 Específicos

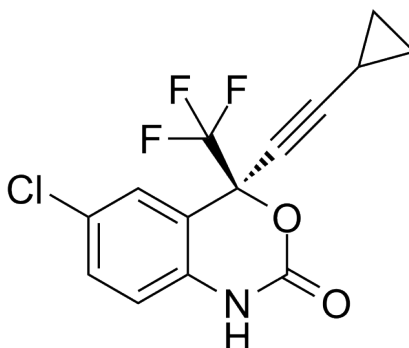
- a) Estabelecer as condições operacionais para o método de produção utilizando a abordagem *bottom-up*;
- b) Identificar os fatores relevantes e seus respectivos níveis para a obtenção de nanossuspensões de EFV via metodologia *bottom-up*;
- c) Determinar as condições operacionais mais favoráveis para obtenção de nanossuspensões de EFV por meio do planejamento de experimentos;
- d) Validar as condições ótimas encontradas por meio de ensaios de otimização.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O EFAVIRENZ (EFV)

O Brasil é referência mundial no combate e tratamento da AIDS, tendo um modelo bem definido de acesso universal a medicamentos antirretrovirais, através do Sistema Único de Saúde (SUS). O EFV (Figura 2.1) é um dos antirretrovirais que compõem o coquetel de profilaxia pré-exposição (PrEP), fornecido atualmente aos pacientes, e é parte importante do rol de medicamentos fornecidos pela Fiocruz para direcionamento ao SUS (MATOS, 2021; BRASIL, 2022). A realização do tratamento com EFV de maneira correta, aliada à administração de outros medicamentos, é capaz de reduzir a carga viral, a níveis menores que o limite de detecção, em 80% dos pacientes (BURGER *et al*, 2006).

Figura 2.1 – Estrutura química do EFV.



Fonte: ChemSrc (2022).

Molécula considerada altamente hidrofóbica, o EFV apresenta, em sua formulação oral, biodisponibilidade média na faixa dos 40 a 45%, tendo meia-vida em torno de 52 horas no organismo (CHIAPPETTA *et al*, 2013). Sua baixa solubilidade em meio aquoso (0,9 µg/ml) e baixa taxa de dissolução intrínseca (0,037 mg/cm²/min) o colocam na classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), sendo descrito como um fármaco com absorção oral incompleta e imprevisível (BEDOR *et al*, 2021).

No Brasil, apenas uma fabricante, além da Fiocruz, produz medicamentos contendo o EFV como princípio ativo, fornecendo-o em solução a 30 mg/ml e com posologia recomendada (para adultos) de 720 mg. A Fiocruz, por sua vez, produz comprimidos revestidos que contêm 600 mg de EFV (CRISTÁLIA, 2020; ANVISA, 2022). As doses relativamente altas são necessárias devido às características supracitadas do fármaco, sendo associadas a efeitos colaterais, principalmente no sistema nervoso central (SNC). Apesar destes efeitos geralmente

se resolverem de maneira espontânea, eles podem levar à escolha do paciente por interromper o tratamento (RAFFI, 2014; HARI, 2016).

2.2 DISSOLUÇÃO DE PARTÍCULAS

Qualquer substância administrada via ingestão, antes da sua absorção no organismo, sofre o fenômeno de dissolução. Tal etapa, inclusive, é largamente estudada durante o desenvolvimento de novos medicamentos, sendo capaz de representar um modelo do comportamento dos mesmos *in vivo* (WONG e COLLINS, 2008). Logo, torna-se necessário entender os mecanismos pelos quais se pode aumentar a taxa de dissolução de um produto farmacêutico.

Matematicamente, a equação de Noyes-Whitney, Equação (1.1), ilustra os parâmetros associados a um processo de dissolução de sólidos:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DS}{Vh_D} \cdot (C_S - C) \quad (1.1)$$

onde:

- dC/dt : taxa de dissolução;
- D : coeficiente de difusão;
- S : área superficial do sólido;
- V : volume do meio de dissolução;
- h_D : espessura da camada de difusão;
- C_S : solubilidade da partícula no meio;
- C : concentração do sólido em determinado instante.

Considerando que D , V e h são mantidos constantes durante todo o processo de dissolução, pode-se aproximar $D/(V \cdot h)$ como sendo uma constante única. Dessa forma, a taxa de dissolução da equação diferencial fica sujeita exclusivamente – e em proporção direta – aos efeitos da área superficial do sólido e da sua solubilidade no meio (SHI *et al*, 2014). Como relatado por Seager e colaboradores (2018), estes dois parâmetros podem ser aumentados a partir da redução de tamanho de partícula do sólido em questão. Os meios para se obter tal redução serão apresentados e discutidos adiante.

Jakubowska e Lulek (2021) trouxeram ainda a equação de Ostwald-Freundlich, Equação (1.2), como instrumento para descrever matematicamente a observação supracitada de Seager e colaboradores (2018). Tal equação foi desenvolvida inicialmente para descrever o comportamento de gotas de líquido em meio gasoso, mas, posteriormente, teve comprovada sua

validade para partículas sólidas de tamanho inferior a 1 μm em meio líquido (PELTONEN e HIRVONEN, 2018).

$$C_S = C_\infty \cdot \exp \frac{2\gamma M}{\rho R T r} \quad (1.2)$$

onde:

- C_S : solubilidade da partícula no meio;
- C_∞ : solubilidade de uma partícula infinitamente grande;
- γ : tensão superficial entre a partícula e o meio;
- M : massa molar da partícula;
- ρ : densidade da partícula;
- R : constante universal dos gases;
- T : temperatura do meio;
- r : raio da partícula.

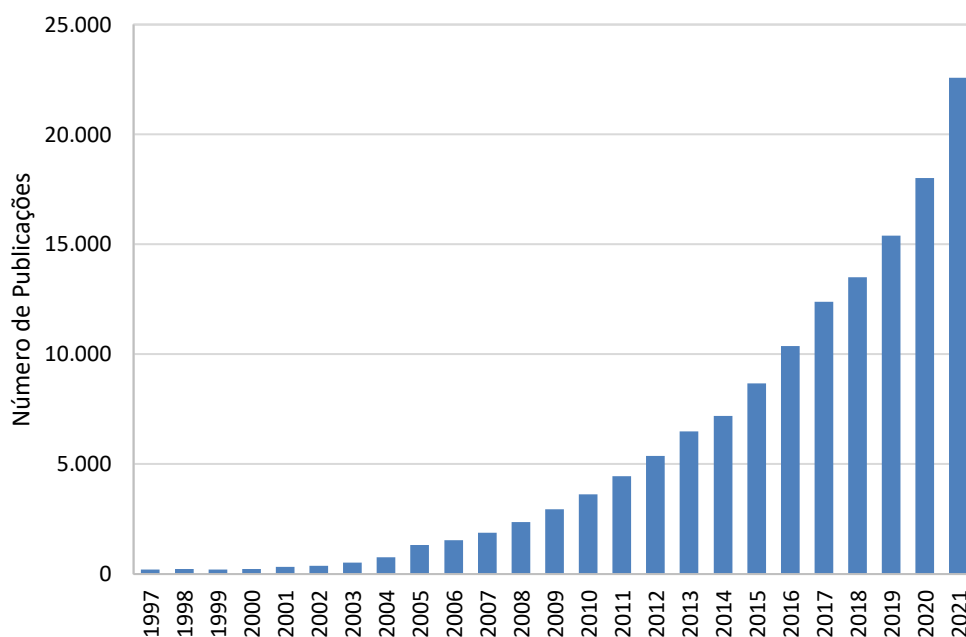
Pela Equação (1.2), nota-se que a redução no raio da partícula significa um aumento em sua solubilidade no meio; e, como visto na Equação (1.1), tal solubilidade é diretamente proporcional à taxa de dissolução da partícula no meio. Assim, pode-se confirmar matematicamente que a redução do raio da partícula resulta no aumento de sua taxa de dissolução, corroborando as observações feitas por Shi e colaboradores (2014), Sartori (2016) e Seager e colaboradores (2018).

2.3 NANOPARTÍCULAS PARA O AUMENTO DA BIODISPONIBILIDADE DE FÁRMACOS

Nos últimos anos, houve um crescimento expressivo no número de artigos publicados contendo estudos sobre nanopartículas de fármacos. Esta tendência é ilustrada graficamente através de uma pesquisa na plataforma ScienceDirect com as palavras-chave “drug” e “nanoparticles” restrita aos anos de 1997 a 2021, organizada ano a ano (Figura 2.2).

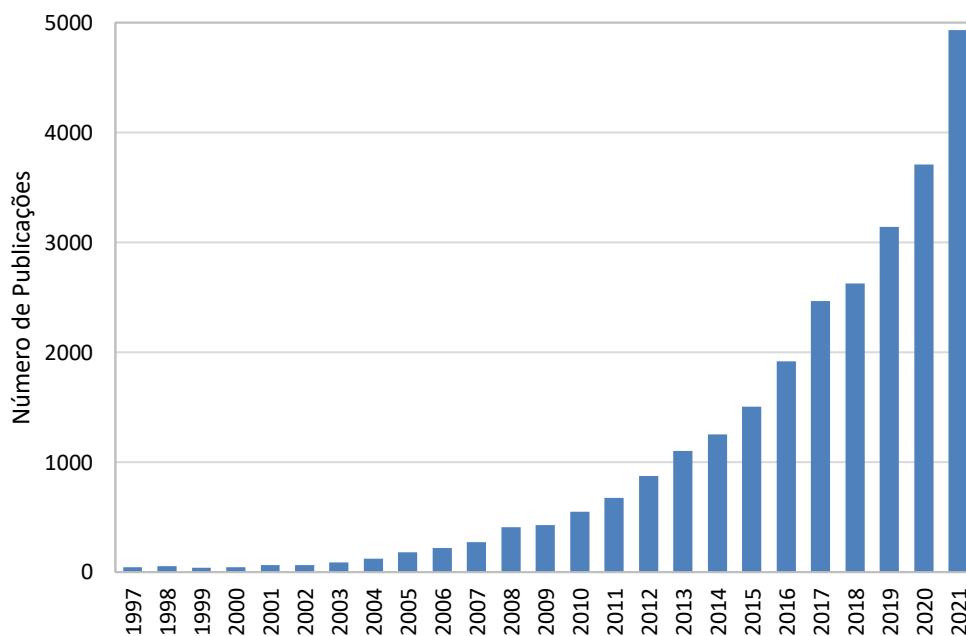
Para se analisar a correlação entre a tendência apresentada na Figura 2.2 com a perspectiva de aumento na biodisponibilidade dos fármacos, citada anteriormente, foi realizada uma nova busca, adicionando-se o termo “bioavailability” aos outros dois termos pesquisados acima. A Figura 2.3 traz os resultados da busca na mesma plataforma, também organizados ano a ano, restrita de 1997 a 2021.

Figura 2.2 – Quantidade de artigos publicados com as palavras-chave “drug” e “nanoparticles” na plataforma ScienceDirect entre 1997 e 2021.



Fonte: elaboração própria.

Figura 2.3 – Quantidade de artigos publicados com as palavras-chave “drug”, “nanoparticles” e “bioavailability” na plataforma ScienceDirect entre 1997 e 2021.



Fonte: elaboração própria.

Dentre os trabalhos englobados pela pesquisa representada na Figura 2.3, existe uma série de aplicações de nanopartículas para o aumento da biodisponibilidade de fármacos, dentre as quais, usos no tratamento de doenças cardiovasculares (SHAKER *et al*, 2021), no combate ao câncer de mama (PANDEY *et al*, 2016) e na prevenção de cânceres em geral (SHEN *et al*, 2012), além do combate ao próprio HIV (SAVAGE *et al*, 2019; PANDYA *et al*, 2021).

A análise de trabalhos disponíveis na literatura permitiu inferir que o EFV disponível para uso nacional em larga escala apresenta cristais na escala micrométrica. O trabalho de Sartori (2016), por exemplo, analisou a morfologia de duas amostras comerciais de EFV através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e observou um tamanho de partícula na faixa de 1 a 2 μm . Por sua vez, Fandaruff e colaboradores (2015) encontraram, para seis amostras de EFV oriundas de dois laboratórios brasileiros diferentes – dentre os quais o laboratório Farmanguinhos-FIOCRUZ, que abastece o SUS –, tamanhos de partícula na faixa de 2 a 8 μm .

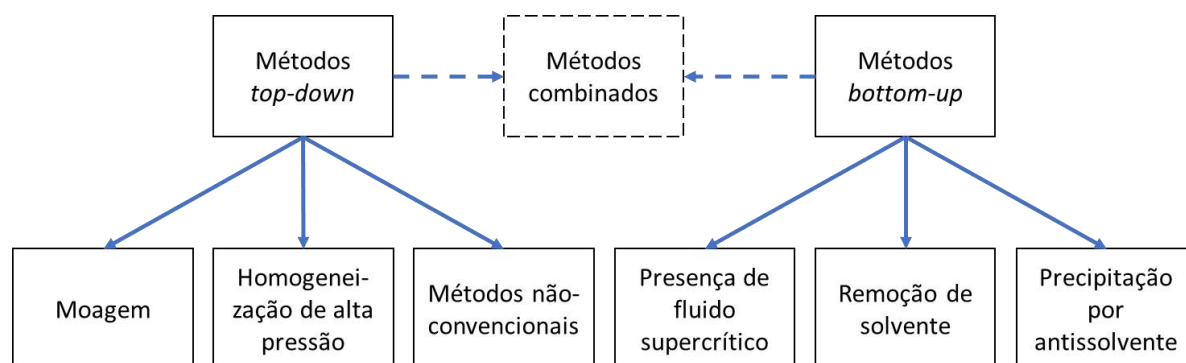
Observando-se a argumentação proposta nos itens anteriores, torna-se coerente direcionar os esforços para a obtenção de cristais de EFV na escala nanométrica, entrando em consonância com a tendência tecnológica apresentada nas Figuras 2.2 e 2.3.

2.4 ROTAS PARA OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

Na literatura, observa-se dois grandes grupos de rotas tecnológicas na abordagem deste problema. A primeira rota parte de cristais macro e microscópicos, chamada de rota *top-down*, onde são aplicadas etapas mecânicas de redução de tamanho. A segunda rota, chamada de *bottom-up*, que parte da molécula em solução e usa técnicas de precipitação para obtenção dos cristais (JOSHI *et al*, 2019).

A Figura 2.4 traz um resumo visual, adaptado da literatura disponível acerca do assunto incluindo uma terceira categoria de métodos citada por alguns autores, chamada de “métodos combinados”, que na prática é a adoção de tecnologia envolvendo as duas rotas acima, de maneira sequencial ou intercalada. Logo, a análise dos métodos se resumirá aos dois mencionados inicialmente.

Figura 2.4 – Resumo dos grupos de rotas tecnológicas descritos na literatura para a redução do tamanho de partícula.



Fonte: adaptado de Joshi e colaboradores (2019).

2.4.1 Métodos *top-down*

Os métodos *top-down* englobam técnicas de redução de tamanho de partículas já precipitadas, a partir de métodos mecânicos diversos. Na literatura recente, estes métodos são os mais aplicáveis em escala industrial (JOSHI *et al*, 2019; NITISH *et al*, 2020; KUMAR *et al*, 2018), sendo considerados mais simples e rápidos que os métodos *bottom-up* (TUOMELA *et al*, 2016).

Corroborando tal argumento, Nagarwal (2011) trouxe uma revisão do panorama dos métodos de produção de 23 compostos farmacêuticos em forma de nanocristais disponíveis no mercado, além de alguns em fase de estudo. Os resultados da revisão indicam que 20 destes 23 compostos são produzidos a partir de métodos *top-down*, mostrando sua já consolidada empregabilidade em escala industrial.

As tecnologias *top-down* mais antigas eram, em geral, consideradas mais caras e energeticamente demandantes, e costumavam gerar cristais com ampla distribuição de tamanho de partícula, inclusive na escala micrométrica. Adaptações mais recentes a algumas delas, contudo, obtiveram resultados mais do que satisfatórios em termos de tamanho de partícula, além de terem elevada controlabilidade operacional (FU *et al*, 2018).

Um dos processos *top-down* de uso comum na indústria é a moagem, que usa pérolas resistentes à abrasão em meio aquoso para reduzir o tamanho de partícula através do atrito. Alguns autores apontam possíveis contaminações do produto final provocadas pela erosão das pérolas ao longo de sua vida útil, o que aumentaria o custo do processo, caso essas não sejam trocadas. Apesar disso, trabalhos mais recentes conseguiram excelentes resultados de tamanho de partícula por meio de moagem, tanto sozinha, quanto combinada com outros métodos (SHEGOKAR e MULLER, 2010; SINGH *et al*, 2018; SARTORI *et al*, 2022).

Outro bloco de tecnologias familiares à indústria é a homogeneização de alta pressão (HPH), que pode ser dividida em duas “vertentes”: microfluidização e homogeneização *piston-gap*. A primeira consiste na colisão frontal entre duas correntes de fluido em câmaras de alta pressurização, e necessita de um alto número de ciclos para atingir os tamanhos de partícula desejados. A segunda se baseia na passagem de uma solução contendo o sólido dispersado por uma pequena abertura, sob altas pressões (de 1500 a 2000 bar, podendo chegar a até 4000 bar). O espaço físico pequeno, aliado às pressões empregadas, fazem as partículas sofrerem cisalhamento, cavitação e impactos entre si, causando a redução de tamanho desejada (JOSHI *et al*, 2019; SHEGOKAR e MULLER, 2010).

Por fim, alguns artigos descrevem o uso de métodos *top-down* não-convencionais para redução do tamanho de partícula. Agarwal e colaboradores (2008) adotaram a sonicação como método de redução de tamanho, associada a ciclos de adição de camadas de estabilizantes (polieletrólitos) de cargas opostas e isolamento das nanopartículas por centrifugação. Foram obtidos tamanhos de cerca de 100 nm e potenciais zeta absolutos acima de 20 mV, valores considerados satisfatórios pelo grupo, e é proposta a aplicabilidade de diversos polieletrólitos para o uso do método. Não é mencionada a possibilidade de escalonamento da produção, e os autores alegam a necessidade de mais estudos.

Ainda na linha de métodos alternativos, Sylvestre e colaboradores (2011) realizaram estudos de fragmentação de partículas por ablação a laser em meio aquoso, com o auxílio de agitação magnética durante o processo. Apesar de obterem nanocristais, o artigo trouxe diversos empecilhos relacionados à suscetibilidade dos compostos a se degradarem térmica e oxidativamente, além das dificuldades de escalonamento e da reprodutibilidade do método.

2.4.2 Métodos *bottom-up*

Os métodos *bottom-up* abordam a precipitação a partir de uma solução supersaturada. Apesar de serem tidos como mais simples e menos onerosos em termos de tempo e energia, os artigos disponíveis na literatura tendem a atribuí-los exclusivamente às escalas laboratorial e piloto, devido às suas características e limitações (TUMOELA *et al*, 2016; SARTORI, 2016).

As técnicas de precipitação baseiam-se em três possíveis métodos gerais: presença de fluido supercrítico; remoção de solvente; e efeito solvente/antissolvente (SINHA *et al*, 2013). Para todas as metodologias, a escolha de um solvente adequado é primordial e dita a viabilidade das mesmas. O controle dos parâmetros e condições de processo visa aumentar a quantidade de pontos de nucleação e reduzir o tamanho do cristal que cresce a partir de cada um deles, o que pode ser alcançado com o auxílio de aditivos e estabilizantes.

2.4.2.1 Presença de fluido supercrítico

A precipitação em presença de fluido supercrítico (FSC) usa um solvente em condições críticas de temperatura e pressão que, uma vez reduzidas a valores mais brandos, promovem a rápida evaporação do mesmo e a imediata precipitação do soluto. Dentre as técnicas que utilizam FSCs, duas apresentam propostas de destaque: rápida expansão da solução supercrítica (RESS) e antissolvente supercrítico (SCAS, na sigla em inglês).

Stepanov e colaboradores (2005) desenvolveram uma metodologia RESS a partir do uso de dióxido de carbono (CO₂) a pressões de 150 a 295 bar e temperaturas de 70 a 75°C para produzir cristais de ciclonita com tamanhos de partícula na faixa de 110 a 220 nm. Apesar das condições supercríticas permitirem uma secagem extremamente eficiente e produção contínua, a maioria dos compostos farmacêuticos apresenta baixa solubilidade em CO₂, o que resulta em baixas capacidades de produção (JOSHI *et al*, 2019).

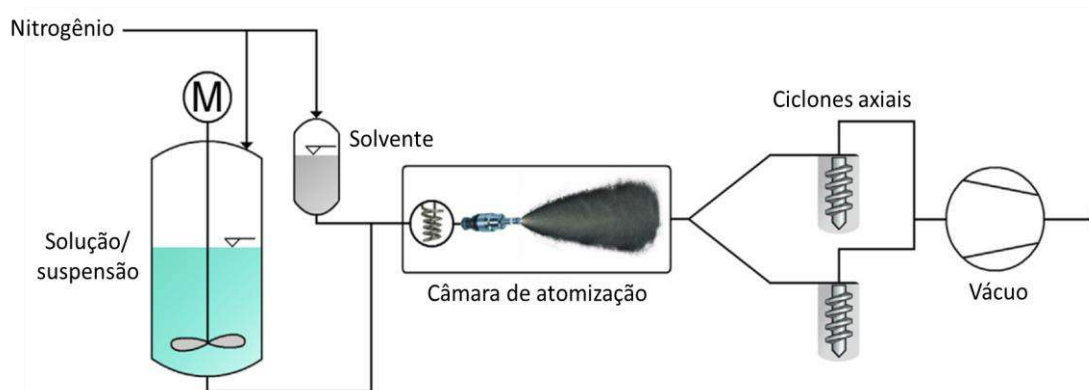
A técnica SCAS foi formulada pensando exatamente nestas moléculas insolúveis em FSCs e, por consequência, incompatíveis com a técnica RESS. Na SCAS, o composto é dissolvido em um solvente orgânico, que deve obrigatoriamente ser miscível no FSC de escolha; a mistura entre a solução e o FSC, não importando a ordem de adição, causa a difusão do solvente no FSC, provocando supersaturação e nucleação do composto (SINHA *et al*, 2013).

2.4.2.2 Remoção de solvente

Essa técnica pode ser considerada uma generalização da ideia de precipitação em presença de fluido supercrítico. Basicamente, a secagem da solução aumenta rápida ou gradativamente o grau de saturação do composto de interesse, até o ponto de supersaturação e, conseqüentemente, precipitação (JAKUBOWSKA *et al*, 2021). Dentre as tecnologias que se encaixam nessa ideia, destaca-se a evaporação *flash* via *spray* (SFE, na sigla em inglês) analisada por Spitzer e colaboradores (2017), que pode ser esquematizada tal qual a Figura 2.5.

Neste método, o composto de interesse é dissolvido em um solvente de baixo ponto de ebulição (por exemplo, etanol ou acetona), no qual sua solubilidade esteja na faixa de 1 a 10% (p/p) à temperatura ambiente. O recipiente é pressurizado a cerca de 40 bar com N₂ comprimido, e conectado a uma câmara de vácuo através de um bocal cônico. O bocal é aquecido a 130-160°C, e a câmara é mantida a uma pressão de 5 a 20 mbar. Ao passar de um ambiente para o outro, a rápida depressurização e a queda na temperatura, aliadas à passagem pelo bocal, promove uma evaporação *flash* seguida da formação de cristais, que podem ser recuperados em um ciclone, precipitador eletrostático ou filtro (SPITZER *et al*, 2017).

Figura 2.5 – Esquema de tecnologia de nanocristalização por SFE.



Fonte: adaptado de Spitzer e colaboradores (2017).

Dentre as configurações testadas, a mais eficiente apresentou capacidade de 100 gramas por hora. Apesar de argumentarem boa repetibilidade experimental e possibilidade de escalonamento, os autores observam que foi necessário fabricar algumas das peças e recipientes usados, sendo necessários mais estudos para se desenvolver uma metodologia que se aplique a diferentes classes de compostos (SPITZER *et al*, 2017).

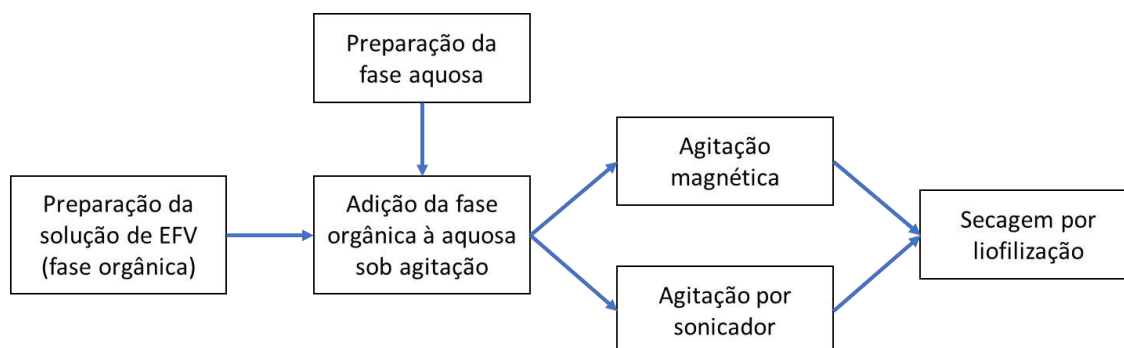
2.4.2.3 Efeito solvente/antissolvente

O último grupo de métodos envolve a precipitação por efeito solvente/antissolvente, também chamada de precipitação por antissolvente. Este é o melhor e mais amplamente descrito na literatura. Em sua configuração mais simples, é um método relativamente direto: o composto de interesse é adicionado a um solvente orgânico, de forma a se atingir uma concentração próxima à da saturação; em seguida, a solução é adicionada a um antissolvente (água, por exemplo), provocando supersaturação do composto e nucleação seguida de crescimento dos cristais. O solvente deve, obrigatoriamente, ser miscível no antissolvente para que a técnica funcione (SHEGOKAR e MULLER, 2010; SINHA *et al*, 2013; JOSHI *et al*, 2019).

Uma das adaptações mais comuns a essa técnica é o uso de aditivos estabilizantes: visando controlar o tamanho da partícula gerada, usa-se como antissolvente uma solução aquosa diluída do aditivo. Este provocará efeito de estabilização estérica, por meio da ocupação física da superfície da partícula, e/ou eletrostática, por meio da repulsão provocada pela formação de uma camada elétrica dupla. A lista de estabilizantes com o uso descrito, sozinhos ou combinados entre si, é razoavelmente ampla (AGARWAL *et al*, 2008; SINHA *et al*, 2013; SARTORI, 2016).

Sartori (2016) estudou a obtenção de nanocristais de EFV a partir da precipitação por antissolvente, com o auxílio de estabilizantes, para analisar e verificar diversos fatores e parâmetros envolvidos no processo. Foram utilizadas duas abordagens bastante similares no geral, conforme ilustrado na Figura 2.6.

Figura 2.6 – Metodologia de nanocristalização por antissolvente.



Fonte: adaptado de Sartori (2016).

A primeira abordagem consistiu na dissolução do EFV no solvente de escolha e adição desta solução ao antissolvente, sob agitação magnética por ultra-turrax (UT). As suspensões geradas apresentaram formação de espuma e alta viscosidade. Como o uso de UT provoca alto cisalhamento durante a homogeneização, suspeitou-se que tal aspecto das suspensões estivessem associadas ao método de agitação, o que motivou a troca do mesmo para a segunda abordagem. A partir de determinado ponto da marcha experimental com o uso de UT, foi testada a agitação por meio de sonicador, que atua não por cisalhamento, mas por cavitação, para homogeneizar a suspensão. A liofilização foi adotada no final de ambas as abordagens para obtenção dos nanocristais de EFV, que foram produzidos em concentrações que variaram entre aproximadamente 1 e 5% (p/v) (SARTORI, 2016).

Sartori (2016) trouxe em seu trabalho, além do tamanho de partícula obtido, a morfologia das partículas e seus padrões de difração de raios X, perfis de dissolução, dados de retroespalhamento de luz, dados de espectroscopia no infravermelho, potenciais zeta e índices de estabilidade. Destes, o perfil de dissolução, o tamanho de partícula e o potencial zeta foram os parâmetros utilizados para definir as melhores condições de obtenção dos nanocristais durante a marcha experimental.

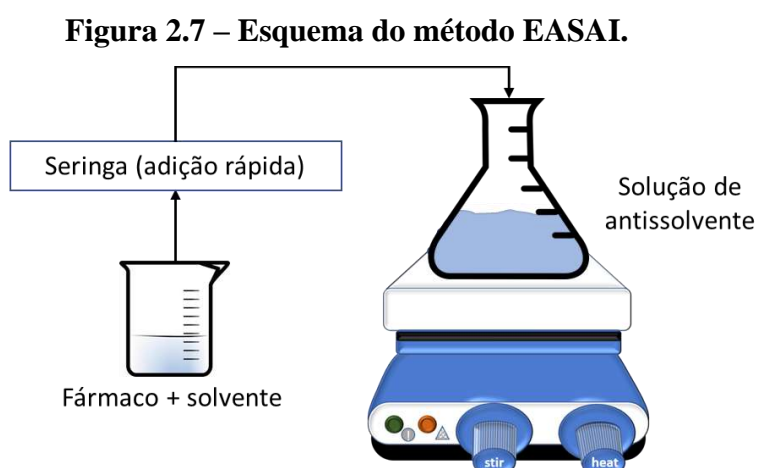
Os procedimentos experimentais envolveram o uso tanto de estabilizantes estéricos, quanto eletrostáticos. No primeiro grupo, foram testados cinco compostos: hidroxipropilmetilcelulose E5 (HPMC); polivinilpirrolidona K30 (PVP); hidroxipropilcelulose

E LF (HPC); e dois poloxâmicos (Lutrol F68 e Lutrol F127). No segundo, foi usado apenas o laurilsulfato de sódio (LSS), da marca VETEC, presente – mesmo que em diferentes concentrações – em todas as 30 amostras obtidas, sendo encontrada a concentração ótima de 2% (%mEFV) pela autora.

Das 30 amostras obtidas no referido trabalho, 3 foram selecionadas como sendo as mais promissoras, a partir dos seus perfis de dissolução. Em termos de tamanho de partícula, nem todas as amostras passaram por análise via espalhamento dinâmico de luz (DLS, na sigla em inglês); as 20 que passaram apresentaram, em sua grande maioria, tamanhos médios na escala nanométrica. Porém, em diversos casos houve alto índice de polidispersão (PDI, na sigla em inglês), que é um indicativo de alta distribuição e baixa uniformidade dos tamanhos de partícula na amostra, e presença de cristais de diâmetro micrométrico, especialmente na abordagem com agitação por UT (SARTORI, 2016).

Não obstante, a autora concluiu que os estabilizantes mais indicados para o uso com o EFV são o PVP e o HPMC, sendo 40% (%mEFV) a melhor concentração encontrada para o segundo, e que uma redução na viscosidade da suspensão formada aumenta o perfil de dissolução da amostra. É apontado, ainda, que a adição de uma etapa de moagem após a liofilização produziu a dissolução mais eficiente das amostras obtidas, corroborando as limitações do uso isolado da precipitação por antissolvente para a obtenção de nanocristais (SHEGOKAR e MULLER, 2010; SARTORI, 2016; JOSHI *et al*, 2019).

Kumar e Siril (2015) apresentaram uma variação interessante da precipitação por antissolvente: foi usado um método denominado “interação solvente-antissolvente assistido por evaporação” (EASAI, na sigla em inglês) para obter nanocristais de griseofulvina (GF), um fármaco de interesse no tratamento de câncer. A rota de obtenção é resumida na Figura 2.7.



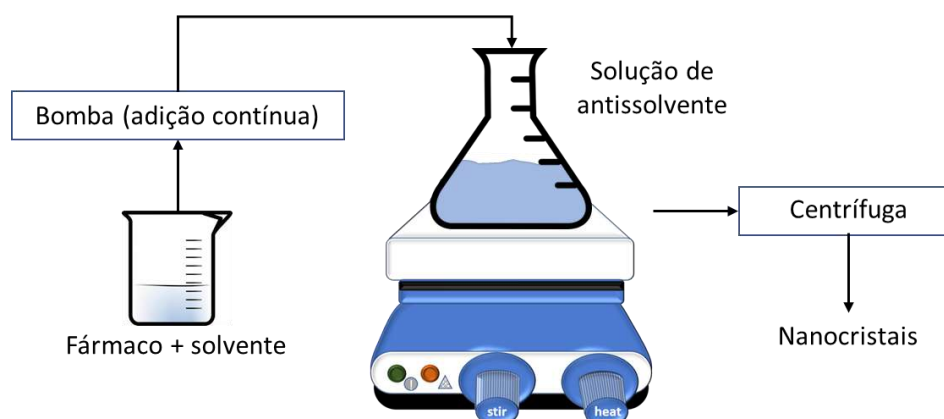
Preparou-se uma solução a 50 mM de GF em acetona (e, por diluição subsequente, soluções a 25 e 5 mM), filtrada em seringa para remoção de material particulado. A um Erlenmeyer contendo 25 ml de antissolvente (água pura ou solução aquosa de estabilizante) aquecido a 70°C, adicionou-se rapidamente uma alíquota de 100 µl da solução de GF (de concentração conhecida), seguida de agitação magnética para homogeneizar a solução e precipitar os nanocristais. Foram obtidos cristais consideravelmente pequenos, com tamanhos de partícula inferiores a 40 nm, especialmente na presença de estabilizantes (KUMAR e SIRIL, 2015).

Já haviam sido encontrados, pelo mesmo grupo, valores ótimos de temperatura do antissolvente (70°C) e proporção entre solvente e antissolvente (1:250), que foram mantidos neste caso. Foi estudada a influenciadas concentrações de GF no solvente e dos estabilizantes HPMC e PVP. Determinou-se o efeito dessas variáveis no tamanho de partícula, potencial zeta, morfologia, eficiência de encapsulamento, solubilidade e perfis de dissolução, dentre outras análises, das amostras obtidas. Os menores tamanhos de partícula, medidos por DLS, foram obtidos na presença de estabilizantes no antissolvente, nos valores de 151 nm para o PVP e 132 nm para o HPMC, sendo suas concentrações ótimas 0,2% e 0,1% (p/v), respectivamente (KUMAR e SIRIL, 2015).

Cabe aqui, porém, mencionar que o potencial zeta, um indicativo da estabilidade de soluções coloidais, foi menor – em valores absolutos – para as amostras supracitadas, se comparadas às amostras de nanocristais de GF obtidas sem o uso de estabilizantes. Adicionalmente, os potenciais zeta mais expressivos (ou seja, as amostras teoricamente mais estáveis) foram obtidos quando se usou soluções mais diluídas do fármaco na ausência de estabilizantes, indicando que seu uso excessivo pode provocar aglomeração de partículas dentro da suspensão (KUMAR e SIRIL, 2015; SARTORI, 2016).

Cinco anos depois, o mesmo grupo propôs uma alteração na metodologia experimental empregada acima: em vez da adição rápida, foi empregada uma bomba peristáltica dosadora para a adição gota-a-gota do solvente, como ilustrado na Figura 2.8. O método, abreviado no artigo como DBD-SAI, foi aplicado para a obtenção de nanocristais de sulfametoxazol, com o auxílio de diferentes estabilizantes. Foram investigados os efeitos de diferentes parâmetros experimentais, e obteve-se tamanhos de partícula inferiores a 220 nm (KUMAR e SIRIL, 2020).

Figura 2.8 – Esquema do método DBD-SAI.



Fonte: adaptado de Kumar e Siril (2020).

A justificativa apresentada no artigo para a mudança no método de adição é a uniformidade do aspecto, tamanho e taxa de adição das gotas ao antissolvente por meio da bomba. Assim, elimina-se fontes humanas de incongruências entre os experimentos realizados e valida-se a reprodutibilidade dos mesmos. Outra diferença é a maior diversidade de estabilizantes testados: foram cinco usados no trabalho de 2020 (HPMC, poli(ácido acrílico) (PAA), poli(ácido vinílico) (PVA), PVP e laurilsulfato de sódio (LSS)), contra apenas dois no artigo de 2015 (PVP e HPMC) (KUMAR e SIRIL, 2015; KUMAR e SIRIL, 2020).

Neste artigo de 2020, foram estudadas as influências dos seguintes fatores: pressão e duração da adição por meio da bomba peristáltica; taxa de agitação; concentração do fármaco na solução de solvente; e presença e concentração de estabilizantes no antissolvente. A temperatura de aquecimento do antissolvente (70°C) foi a mesma empregada no artigo de 2015.

A proporção entre solvente e antissolvente, por outro lado, aumentou nas condições ótimas encontradas. Os autores estimaram que foi adicionado 1,55 ml de solvente ao antissolvente, frente a 0,1 ml no trabalho anterior; ou seja, a proporção aumentou cerca de 15,5 vezes. Outra diferença foi a concentração ótima de fármaco no solvente, que dobrou em relação ao trabalho anterior (100 mM, frente a 50 mM). Além disso, os melhores resultados dos autores envolveram o uso de HPMC na concentração de cerca de 3%, em relação ao fármaco avaliado, e LSS na concentração em torno de 1%, também em relação ao fármaco (KUMAR e SIRIL, 2020).

A fim de verificar a aplicabilidade destas mudanças no método EASAI, injetou-se rapidamente 1,55 ml de solução de sulfametoxazol em acetona em 25 ml de água (antissolvente) a 70°C e sob agitação magnética a 1200 rpm, obtendo nanocristais de tamanho de partícula

medidos por DLS de 87 nm. Ou seja, o método EASAI foi viável para maiores quantidades de fármaco utilizado. Apesar disso, o artigo deixa claro que tal método é menos aplicável que o DBD-SAI para escalas industriais, devido ao caráter semicontínuo deste último e ao fato de suas configurações e parâmetros serem mais controláveis experimentalmente, em comparação ao EASAI (KUMAR e SIRIL, 2015; KUMAR e SIRIL, 2020).

2.5 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

O processo de desenvolvimento de novos medicamentos e de novas rotas tecnológicas para obter formulações na escala nanométrica envolve diversas etapas, parâmetros e variáveis. Muitas vezes, o estudo de um fator ou outro é deixado de lado devido à falta de tempo ou de maneiras de se avaliar o impacto de tal fator. Nesse sentido, a otimização de processos é altamente importante, e um dos maiores aliados nesse âmbito é o planejamento de experimentos (ALMEIDA, 2019).

De maneira análoga à tendência apresentada no subitem 2.3 do presente trabalho, observa-se um aumento do número de artigos publicados envolvendo o uso de planejamento de experimentos (DoE, na sigla em inglês) para a obtenção de nanopartículas. Porém, menos da metade dos trabalhos aplicam DoE na obtenção de nanopartículas de fármacos.

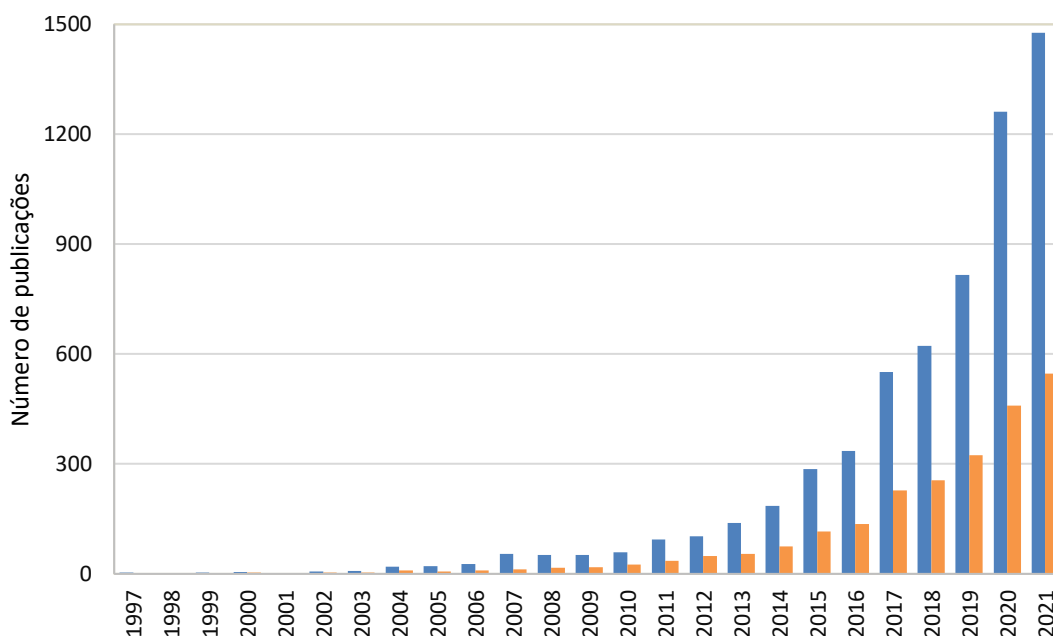
Tal discrepância na quantidade de publicações está ilustrada na Figura 2.9. Foram realizadas duas buscas na plataforma ScienceDirect, dos anos de 1997 a 2021: a primeira, com as palavras-chave “nanoparticles” e “design of experiments”; a segunda, com a palavra-chave “drug” em adição às da pesquisa anterior.

O uso de DoE para a avaliação do efeito de parâmetros e fatores operacionais (variáveis independentes) nos resultados obtidos em determinado processo (variáveis dependentes) costuma pressupor uma etapa inicial de triagem e uma etapa seguinte de otimização das condições de operação. A etapa de triagem é usada para analisar quais das variáveis independentes do processo são as mais significativas para os resultados e quais faixas de estudo são adequadas para se atingir os objetivos desejados. As variáveis independentes são analisadas, então, mais profundamente na etapa de otimização, através dos chamados Métodos de Superfície de Resposta (MSR), que poderão gerar modelos que representem a superfície em estudo (LUIZ *et al*, 2021; NIST e SEMATECH, 2002).

Dentre as técnicas comumente usadas na etapa de triagem, destacam-se o Planejamento Fatorial Completo (PFC), o Planejamento Fatorial Fracionado (PFF) e o método de Plackett-Burman; dentre os MSRs, os mais usados são o Arranjo Compósito Central (CCD, na sigla em inglês) e o Planejamento Box-Behnken (LUIZ *et al*, 2021). Um dos critérios possíveis para a

escolha entre as técnicas de triagem disponíveis é o número de variáveis independentes a serem analisadas, como mostra a Tabela 2.1.

Figura 2.9 – Quantidade de artigos publicados com as palavras-chave “nanoparticles”, “design of experiments” (barras azuis) e “drug” (barras laranjas) na plataforma ScienceDirect entre 1997 e 2021.



Fonte: elaboração própria.

Tabela 2.1 – Número de fatores versus técnica de DoE.

Número de fatores	Etapa de triagem	Etapa de otimização
2 a 4	Fatorial Completo ou Fracionado	Arranjo Compósito Central ou Box-Behnken
5 ou mais	Fatorial Fracionado ou Plackett-Burman	(etapa prévia de triagem necessária)

Fonte: adaptado de NIST e SEMATECH (2002).

2.5.1 Métodos de triagem

O método de Plackett-Burman, publicado inicialmente em 1946, encontra aplicabilidade na determinação da influência provocada por fatores singulares, dentre N fatores totais, a partir de $N+1$ experimentos. Este método é vantajoso quando há um número muito extenso de fatores envolvidos e quando há a presença de variáveis qualitativas ou categóricas, mas encontra dificuldades na interpretação do efeito interativo entre quaisquer variáveis do sistema, pois assume que este é negligenciável perante os poucos fatores singulares importantes. Para uma

análise mais compreensiva dos efeitos interativos entre variáveis, os Planejamentos Fatoriais são mais recomendados (NIST e SEMATECH, 2002; EKPENYONG *et al.*, 2017).

Por definição, um PFC implica que, para cada experimento ou réplica do mesmo, todas as possíveis combinações de níveis dos fatores são testadas. Ou seja, se existem, por exemplo, 3 fatores com 4 níveis cada, o número de experimentos a serem feitos será de $4^3 = 64$. Se o operador preferir, pode realizar cada experimento em duplicata; para o exemplo, o resultado final seria $2 \times 4^3 = 128$ experimentos (MONTGOMERY, 2013).

Como visto acima, não é difícil de se obter um número extremamente elevado de experimentos, que significaria um consumo elevado de tempo e recursos. Uma maneira de evitar este problema é realizar as análises de fatores por PFC com apenas dois níveis a cada fator. Dessa forma, tem-se uma análise fatorial do tipo 2^k , onde k é o número de variáveis independentes sendo submetidas ao estudo.

Voltando ao exemplo anterior, para a análise em duplicata de 3 fatores em 2 níveis cada, seriam necessários $2 \times 2^3 = 16$ experimentos, que é um valor mais razoável do que o encontrado previamente (MONTGOMERY, 2013; NIST e SEMATECH, 2002). Os experimentos a serem executados podem ser ilustrados na Tabela 2.2, que usa a nomenclatura codificada +1 e -1 para os níveis de cada fator na análise fatorial 2^k , considerando uma situação hipotética com $k = 4$ fatores.

Tabela 2.2 – PFC do tipo 2^k com 4 variáveis.

Ensaio	Fator A	Fator B	Fator C	Fator D
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1

Fonte: elaboração própria.

Em diversas situações, contudo, é incomum existirem apenas 3 variáveis independentes a serem estudadas. Para o modelo de análise fatorial do tipo 2^k , cada fator adicional dobra a quantidade de experimentos; e, rapidamente, este número pode alcançar as centenas. A partir da necessidade de se manter a viabilidade da marcha experimental, foi desenvolvido o PFF, uma das metodologias mais amplamente usadas no desenho de produtos e melhoria de processos.

O uso do PFF parte da noção de que certas interações de alta ordem entre fatores específicos são negligenciáveis, e que pode-se usar um número reduzido de experimentos para se obter dados sobre fatores principais e interações de baixa ordem. Para um experimento do tipo 2^k , a quantidade de experimentos é reduzida, no mínimo, à metade do valor inicial, a partir da notação 2^{k-p} , onde p é o fator de redução empregado. Além disso, seu uso na etapa de triagem permite que sejam realizados estudos mais robustos – na etapa de MSR – acerca dos fatores principais encontrados (MONTGOMERY, 2013; ALMEIDA, 2019).

Se for tomado como exemplo um experimento com 6 fatores e $p = 2$, pode-se realizar um PFF com $2^{6-2} = 16$ experimentos, representados na Tabela 2.3, em vez dos 64 que seriam necessários num PFC. Neste exemplo, o nível do fator E é dado pela multiplicação dos valores dos fatores A, B e C; em outros termos, assume-se $E = ABC$, ou seja, que a interação entre os fatores A, B e C é negligenciável se comparada ao efeito do fator E. Paralelamente, assume-se também $F = ABCD$, seguindo a mesma lógica de raciocínio.

Tabela 2.3 – PFF do tipo 2^{k-p} com 6 variáveis e 2 fatores de redução.

Ensaio	Fator A	Fator B	Fator C	Fator D	Fator E	Fator F
1	-1	-1	-1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1	-1	+1	-1
3	-1	+1	-1	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1	-1	-1	+1
5	-1	-1	+1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1
8	+1	+1	+1	-1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1	-1
10	+1	-1	-1	+1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1	+1
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1

Fonte: elaboração própria.

2.5.2 Métodos de otimização

Como mencionado anteriormente, a etapa de otimização no planejamento de experimentos consiste no uso de MSRs para se determinar as melhores condições operacionais do processo, a partir de análise realizada sobre as variáveis apontadas como mais importantes na etapa de triagem. Os métodos supracitados para esta finalidade ajudam a solucionar problemas no processo, identificar pontos fracos no mesmo e torná-lo mais robusto perante influências externas e incontroláveis (NIST e SEMATECH, 2002).

O Planejamento Box-Behnken, datado de 1960, produz superfícies de resposta a partir de um modelo de 3 níveis, obtido por combinações de fatoriais do tipo 2^k . Devido à sua natureza, este método apresenta vantagens: quando um ou mais fatores sendo estudados têm valores-limite operacionalmente inviáveis, e consome um número menor de experimentos quando são analisados até 4 fatores. Uma grande desvantagem desse método é a presença de previsões de baixa acurácia em determinadas faixas experimentais; além disso, a blocagem ortogonal (uma medida do balanceamento e da homogeneidade de um grupo de condições experimentais) fica comprometida.

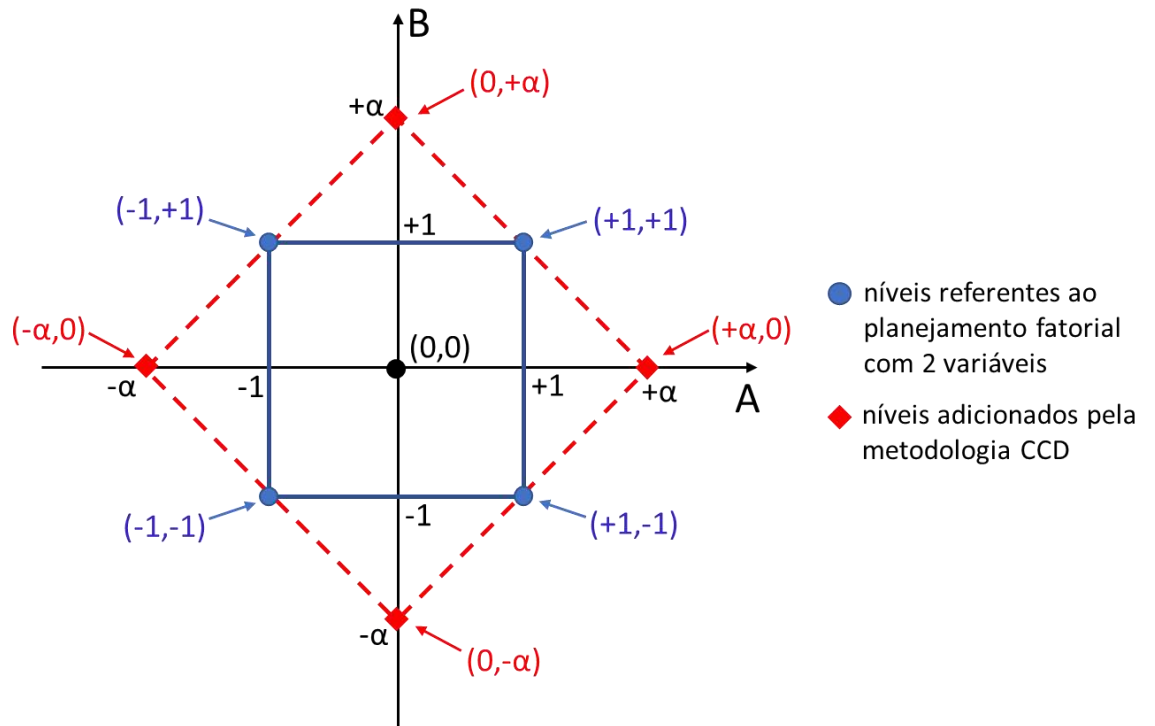
O Arranjo Compósito Central (CCD) é uma metodologia baseada em um Planejamento Fatorial Completo ou Fracionado, mas que é acrescido de pontos axiais para aumentar sua precisão, graus de liberdade e possibilitar uma análise de curvatura, ou seja, de uma superfície de resposta às variáveis. Estes novos pontos são os novos limites experimentais, e sua quantidade é sempre o dobro da quantidade de fatores analisados no Planejamento Fatorial de dois níveis (NIST e SEMATECH, 2002).

A metodologia CCD pode, ainda, ser subdividida de acordo com a posição dos novos pontos em relação aos definidos na etapa de triagem. Tal posicionamento depende de alguns aspectos, como a natureza do problema e a rotabilidade (critério que avalia a precisão e variância das estimativas no espaço experimental), dentre outros (MONTGOMERY, 2013; NIST e SEMATECH, 2002). A Figura 2.10 exemplifica a posição dos novos pontos no modelo circunscrito, bastante comum, de um CCD.

Na Figura 2.10, observa-se a presença de dois tipos de níveis – além do nível referente ao ponto central, na cor preta. Os pontos em azul são determinados pela metodologia já explicada no PFC; os pontos em vermelho, por sua vez, apresentam um novo nível, denominado α . A escolha do valor de α depende primariamente da quantidade de pontos referentes ao planejamento fatorial escolhido, sendo α normalmente calculado pela fórmula $\alpha = (2^{k-p})^{0,25}$. Ou

seja, o valor de α é o mesmo para, por exemplo, um PFC de 4 variáveis e um PFF de 6 variáveis e 2 fatores de redução (MONTGOMERY, 2013; NIST e SEMATECH, 2002).

Figura 2.10 – CCD circunscrito para um planejamento fatorial de 2 variáveis.



Fonte: elaboração própria.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS

- a) Efavirenz (EFV): fabricado pela Nortec Química;
- b) Acetona: grau HPLC, fabricada pela Tedia;
- c) Metanol: grau HPLC, fabricado pela J. T. Baker;
- d) Água ultrapurificada Milli-Q®: fornecida por equipamento da Merck;
- e) Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), grau 603: fabricada pela ShinEtsu;
- f) Laurilsulfato de sódio (LSS): lote 3617, fabricado pela Merck.

3.2 EQUIPAMENTOS

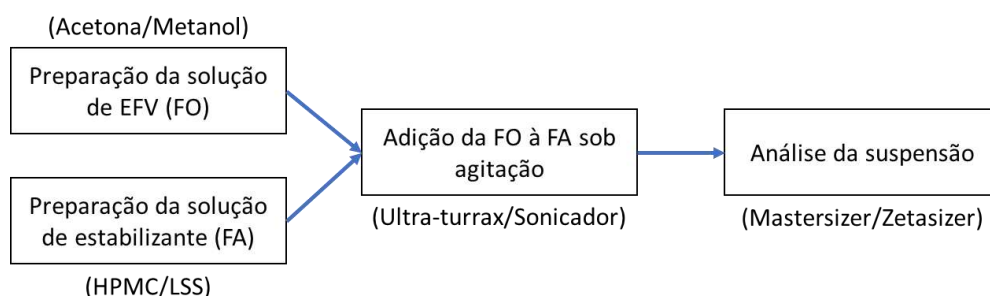
- a) Balança analítica AUX320, da marca Shimadzu;
- b) Balança analítica XP205, da marca Mettler Toledo;
- c) Placa de aquecimento C-MAG HS 7, da marca IKA;
- d) Agitador ultra-turrax T25 Digital, da marca IKA;
- e) Bomba peristáltica Flocon 1003, da marca Thölen Pumpen GmbH;
- f) Analisador de partículas Mastersizer 3000, da marca Malvern Panalytical;
- g) Analisador de partículas Zetasizer Nano ZS90, da marca Malvern Panalytical;
- h) Sonicador Q700, da marca Qsonica;
- i) *Software* para planejamento de experimentos Design-Expert, versão 9.0.3.

3.3 EXPERIMENTOS DE PRECIPITAÇÃO

A Figura 3.1 mostra o fluxograma resumido dos experimentos conduzidos neste trabalho. Preparou-se, em cada experimento, a fase orgânica (FO) contendo o EFV dissolvido no solvente de escolha (metanol ou acetona), com base nas solubilidades do EFV testadas em estudos anteriores, e a fase aquosa (FA) contendo o estabilizante estérico, hidroxipropil metil celulose (HPMC), e o de carga, lauril sulfato de sódio (LSS) quando presente, em água ultrapurificada. Todos os produtos foram escolhidos com base em resultados observados da literatura. A FO foi adicionada à FA sob agitação proporcionada pelo equipamento escolhido, mantida por tempos variando entre 30 e 60 segundos após a adição, seguida de análise da suspensão obtida pela técnica de difração a laser, no Mastersizer 3000, e depois pela técnica de

espectroscopia de correlação de fótons (DLS), no Zetasizer Nano ZS90, caso haja confirmação da presença de nanopartículas.

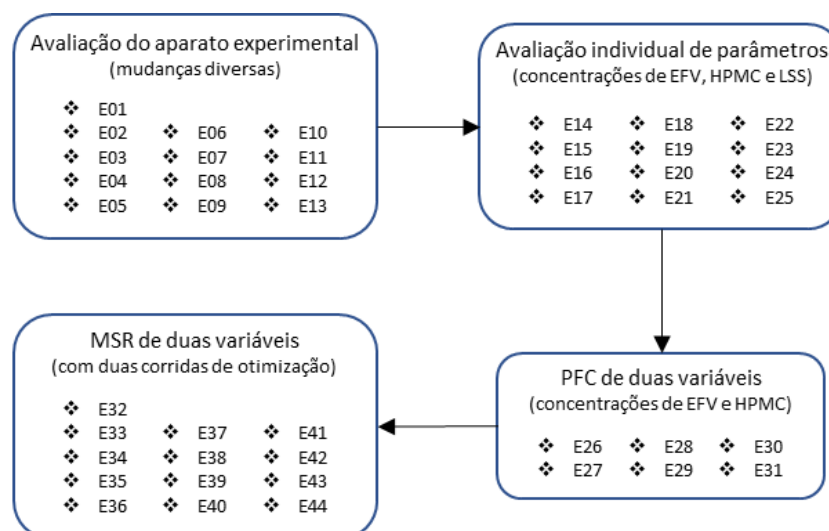
Figura 3.1 – Fluxograma resumido dos experimentos de precipitação realizados.



Fonte: elaboração própria.

A Figura 3.2 resume a marcha experimental adotada neste trabalho, que envolveu a execução de ensaios preliminares para definição da metodologia, das variáveis e das faixas de estudo, seguida de aplicação de um planejamento fatorial completo (PFC) e de metodologia de superfície de resposta (MSR) do tipo arranjo compósito central (CCD).

Figura 3.2 – Resumo da marcha experimental adotada neste trabalho.



Fonte: elaboração própria.

Para os ensaios iniciais, as concentrações de EFV e dos estabilizantes foram definidas de forma a se manter uma concentração final em torno de 1 a 5% (p/v) de EFV na suspensão produzida, de maneira similar aos valores obtidos por Sartori (2016). Nos ensaios E01 a E07, foi aplicado aquecimento externo da FA, a 70°C, sendo ele descartado a partir do ensaio E08.

A Tabela 3.1 descreve as variáveis e seus respectivos níveis analisados nos ensaios iniciais para avaliação do aparato experimental e da adequação das faixas sugeridas (E01 a E13); a Tabela 3.2, a relação dos ensaios realizados para definição dos parâmetros composicionais a serem avaliados e de suas faixas de estudo (E14 a E25); a Tabela 3.3, os ensaios referentes ao Planejamento Fatorial Completo com duas variáveis para avaliação da influência dos parâmetros na área de estudo, definida a partir dos resultados obtidos na etapa anterior (E26 a E31); e a Tabela 3.4, os ensaios referentes ao Método de Superfície de Resposta para as duas variáveis analisadas no PFC, corrigidas as suas faixas, com base nas influências identificadas no PFC e na busca por condições de minimização de uso de estabilizante na FA e maximização da quantidade de EFV na FO, visando a obtenção de modelo representativo do espaço amostral (E32 a E42), para viabilização da otimização numérica e da proposição de condições para ensaios de validação (E43 e E44).

Os ensaios de validação e otimização foram realizados com base nos resultados obtidos no MSR, a partir de cálculos feitos pelo *software* Design-Expert, versão 9.0.3, se utilizando da aba de otimização numérica. Nesta aba, critérios foram estabelecidos em relação aos parâmetros e respostas estudados, sendo possível a utilização de graus de importância diferenciados. Os cálculos foram executados, com base nos modelos válidos gerados para cada resposta, usando um método sistemático iterativo de resolução de problemas de otimização, chamado de algoritmo simplex (WRIGHT, 2022).

Nas Tabelas 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4, a concentração de EFV na FO foi calculada em relação ao volume de solvente (%p/v), enquanto as concentrações dos estabilizantes na FO foram calculadas em relação à massa de EFV na FO (%mEFV), seguindo padronização adotada no trabalho de Sartori (2016). Para todos os ensaios a partir do E13: não houve aquecimento da FA; o volume da FA foi mantido em 180 ml; a adição da FO à FA foi feita por injeção rápida; o volume de FO adicionado foi de 20 ml; a potência do sonificador foi mantida em 50% por 60 segundos; e o solvente usado na FO foi o metanol, exceto para o ensaio E44, em que se testou a acetona. Os motivos para a fixação destas condições e definição de faixas de estudo serão elucidados e aprofundados, com base no sequenciamento de experimentos conduzidos, nos Resultados deste trabalho (Capítulo 4).

Tabela 3.1 – Relação dos ensaios iniciais para definição da metodologia.

Ensaio	Concentrações ^{1,2}			Solvente da FO	Volume da FA ³	Forma de adição	Taxa de adição (ml/min)	Tempo de adição ⁴	Massa de EFV adicionada ⁵	Volume de FO adicionado ³	Intensidade de agitação ^{6,7}		Tempo de agitação pós-adicação ⁴	Conc. final de EFV (%p/v)
	EFV na FO	HPMC na FA	LSS na FA								UT	Sonicador		
E01	17,00	1	0,4	Acetona	170	Bomba	10,48	60	1,78	10,48	11000	-	60	0,99
E02	24,00	5	2,0	Acetona	210	Bomba	15,08	180	10,86	45,24	22000	-	60	4,25
E03	28,00	3	1,0	Acetona	210	Bomba	35,29	75	12,35	44,11	22000	-	30	4,86
E04	30,00	3	1,0	Acetona	210	Bomba	35,29	60	10,59	35,29	22000	-	30	4,32
E05	20,00	3	0,2	Acetona	210	Bomba	35,29	60	7,06	35,29	22000	-	30	2,88
E06	20,00	3	1,0	Metanol	210	Bomba	34,97	60	6,99	34,97	22000	-	30	2,86
E07	20,00	3	0,2	Metanol	210	Bomba	34,97	60	6,99	34,97	22000	-	30	2,86
E08	20,00	3	0,2	Metanol	210	Bomba	34,97	60	6,99	34,97	22000	-	30	2,86
E09	20,00	3	0,2	Acetona	210	Bomba	35,29	60	7,06	35,29	22000	-	30	2,88
E10	20,00	3	0,2	Acetona	210	Injeção	-	-	4,00	20,00	22000	-	60	1,74
E11	40,00	3	1,0	Metanol	210	Bomba	24,90	45	7,47	18,68	-	70	60	3,27
E12	20,00	3	0,2	Metanol	140	Bomba	24,90	60	4,98	24,90	-	70	60	3,02
E13	13,35	10	2,0	Metanol	180	Injeção	-	-	2,67	20,00	-	50	60	1,34

Fonte: elaboração própria.

UNIDADES:

¹ Concentração de EFV na FO: percentual peso/volume (%p/v).

² Concentrações de HPMC e LSS na FA: percentual em relação à massa de EFV usada (%mEFV).

³ Volume da FA e volume da FO adicionada: ml.

⁴ Tempo de adição da FO à FA e tempo de agitação após a adição da FO à FA: s.

⁵ Massa de EFV adicionada: g.

⁶ Velocidade de agitação do UT: rotações por minuto (rpm).

⁷ Potência de sonicação: amplitude relativa (%).

Tabela 3.2 – Relação dos ensaios realizados para a avaliação individual de parâmetros.

Ensaio	Concentrações		
	EFV na	HPMC na	LSS na
	FO (%p/v)	FA (%mEFV)	FA (%mEFV)
E14	10,0	10	2,0
E15	5,0	10	2,0
E16	2,5	10	2,0
E17	10,0	10	3,0
E18	10,0	10	4,0
E19	10,0	20	2,0
E20	10,0	30	2,0
E21	10,0	30	1,0
E22	10,0	30	0,5
E23	10,0	30	0,0
E24	10,0	25	0,0
E25	10,0	35	0,0

Fonte: elaboração própria.

Tabela 3.3 – Relação dos ensaios referentes ao Planejamento Fatorial Completo com duas variáveis.

Ensaio	Fatores codificados		Parâmetros e faixas reais	
	Fator A	Fator B	Conc. EFV na FO (%p/v)	Conc. HPMC na FA (%mEFV)
E26	+1	-1	15	25,0
E27	-1	-1	5	25,0
E28	0	0	10	27,5
E29	-1	+1	5	30,0
E30	+1	+1	15	30,0
E31	0	0	10	27,5

Fonte: elaboração própria.

Tabela 3.4 – Relação dos ensaios referentes ao Método de Superfície de Resposta para as duas variáveis do PFC e dos ensaios de otimização.

Ensaio	Fatores codificados		Parâmetros e faixas reais	
	Fator A	Fator B	Conc. EFV na FO (%p/v)	Conc. HPMC na FA (%mEFV)
E32	+1	+1	20,00	32,00
E33	-1,414	0	7,93	30,00
E34	0	-1,414	15,00	27,17
E35	0	0	15,00	30,00
E36	-1	-1	10,00	28,00
E37	0	0	15,00	30,00
E38	0	+1,414	15,00	32,83
E39	0	0	15,00	30,00

Fonte: elaboração própria.

Tabela 3.4 (continuação) – Relação dos ensaios referentes ao Método de Superfície de Resposta para as duas variáveis do PFC e dos ensaios de otimização.

Ensaio	Fatores codificados		Parâmetros e faixas reais	
	Fator A	Fator B	Conc. EFV na FO (%p/v)	Conc. HPMC na FA (%mEFV)
E40	+1,414	0	22,07	30
E41	-1	+1	10,00	32
E42	+1	-1	20,00	28
E43	-	-	20,00	26
E44	-	-	20,00	26

Fonte: elaboração própria.

3.4 MEDIÇÃO DE TAMANHO DE PARTÍCULA E PDI

Todas as suspensões obtidas, exceto as dos ensaios E01, E02, E03, E17 e E18, tiveram inicialmente suas distribuições de tamanhos de partícula analisadas por meio da técnica de difração a laser, no equipamento Mastersizer 3000 (Mastersizer), cuja faixa de medição é de 10 nm a 3,5 mm. Uma alíquota pura da suspensão obtida foi lentamente adicionada ao meio dispersante do equipamento, água ultrapurificada, até que a obscuração lida pelo *software* estivesse dentro da faixa delimitada pelo operador. Após o fim da medição, o meio dispersante contendo a alíquota era descartado e o recipiente, lavado e reenchido com água ultrapurificada.

A etapa de medição no Mastersizer foi realizada como triagem: se os resultados indicassem D_{50} inferior a 500 nm e D_{90} inferior a 10 μm , a amostra era levada para medição no equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Zetasizer), cuja faixa de medição é de 0,3 nm a 10 μm , por meio da técnica de DLS. Para a análise nesse equipamento, a alíquota pura da suspensão obtida era dispersa em água ultrapurificada até se atingir uma concentração de aproximadamente 0,08% a 0,1% (p/v); dessa solução, era injetado 1 ml em uma cubeta, a qual era inserida no equipamento para medição.

Os resultados lidos no Zetasizer foram o diâmetro médio de partícula (d_{AVG}) e o índice de polidispersão (PDI). Nem todas as amostras apresentaram valores de D_{50} e D_{90} que permitissem sua medição no Zetasizer. Todas as medições de tamanho de partícula no Mastersizer foram feitas pelo menos em duplicata, e todas as amostras analisadas no Zetasizer foram medidas em triplicata. As tabelas com resultados de análises de tamanho de partícula apresentadas nos Resultados (Capítulo 4) trazem o valor médio e o desvio-padrão dos valores de D_{50} , D_{90} , d_{AVG} e PDI de cada medição. Todas as medições realizadas, inclusive os valores de D_{10} também medidos pelo Mastersizer, estão apresentadas no Apêndice A.

4 RESULTADOS

4.1 DEFINIÇÃO DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A primeira etapa experimental envolveu a execução de ensaios iniciais com o intuito de avaliar as restrições operacionais inerentes ao procedimento experimental a ser adotado, a fim de se avaliar quais variáveis poderiam ser mantidas fixas. Alguns equipamentos possuem limites mínimo e máximo de funcionamento, ou características físicas que foram determinantes na atribuição de valores a parâmetros tanto fixados quanto variáveis.

Os principais parâmetros a serem estudados, as condições a serem fixadas e os seus valores foram determinados inicialmente a partir das informações disponíveis na literatura, a partir dos dados de Sartori (2016), que apresentou uma alta gama de informações sobre o EFV, a precipitação de nanopartículas por antissolvente e sobre os métodos de agitação aqui utilizados, e de Kumar e Siril (2015; 2020), que em seus artigos trouxeram adaptações e ideias interessantes para a melhoria da rota de nanoprecipitação normalmente empregada. As condições ótimas obtidas em cada trabalho serviram como base para a definição inicial de cada parâmetro e das condições a serem testadas nesse trabalho, sendo melhor explicadas nos subitens a seguir.

4.1.1 Escolha do solvente da FO

Sartori (2016) usou metanol como solvente da FO em seus experimentos de precipitação, argumentando sua boa disponibilidade e amplo uso na obtenção de nanocristais. Porém, com base nos testes de solubilidade em diferentes solventes orgânicos, apresentados na Tabela 4.1, observa-se que a maior solubilidade do EFV é em acetona, sendo esta quase 3 vezes maior do que a observada para o metanol.

Tabela 4.1 – Solubilidade do EFV em diferentes solventes orgânicos.

Solvente	Volume (ml)	Massa solúvel (g)	Concentração (% p/v)
Acetona	5	8,5	170
Acetonitrila	5	2,5	50
Etanol	5	7,0	140
Metanol	5	3,0	60

Fonte: Sartori (2016).

Em um processo de cristalização, o grau de supersaturação, que depende da solubilidade, atua como força motriz tanto da taxa de nucleação quanto da taxa de crescimento dos cristais (BENNET, 1997). Ou seja, o uso de acetona como solvente pode ser vantajoso para a redução da taxa de crescimento das partículas formadas, por possuir maior capacidade de solubilização de EFV do que o metanol, mas este fato pode reduzir também a taxa de nucleação, indo contra o desejo de se aumentá-la.

Em termos de segurança, a acetona possui menor toxicidade aguda e crônica se comparada ao metanol, sendo um solvente menos perigoso para manuseio nesse sentido pensando na etapa posterior a obtenção da nanossuspensão (TEDIA, 2019; AVANTOR, 2021). Assim, como proposta inicial de rota experimental estabeleceu-se o uso de acetona pois a ideia era aquecer a FA para promover a evaporação do solvente orgânico, como feito por Kumar e Siril (2015; 2020), que usaram acetona em seus testes. Considerando os pontos de ebulição de cada solvente, sendo 56°C para a acetona e 64°C para o metanol (SMALLWOOD, 1996), este efeito teoricamente seria mais pronunciado caso o ponto de ebulição do solvente orgânico fosse menor. Dessa forma, a escolha inicial de solvente foi a acetona.

4.1.2 Estabilizantes

A importância do uso de estabilizantes na obtenção de nanopartículas está amplamente descrita na literatura, como observado em artigos citados anteriormente (AGARWAL *et al*, 2008; SINHA *et al*, 2013; JOSHI *et al*, 2019). Em seus experimentos, Kumar e Siril (2015; 2020) avaliaram o efeito de estabilizantes tanto estéricos quanto eletrostáticos, de maneira isolada. Para a matriz avaliada pelos autores, foram obtidos nanocristais com quatro dos cinco estabilizantes testados (PVA, HPMC, PAA e LSS).

Sartori (2016), por outro lado, realizou todos os testes com pelo menos dois estabilizantes (um estérico e um eletrostático) simultaneamente, a fim de observar se a interação entre ambos ajudaria a frear o crescimento dos cristais. O estabilizante eletrostático escolhido para uso em todos os testes realizados pela autora foi o LSS, devido ao seu amplo uso como excipiente na indústria farmacêutica, inclusive na formulação dos comprimidos revestidos de EFV produzidos pela Fiocruz (ANVISA, 2022). Os estabilizantes estéricos avaliados que proporcionaram a Sartori (2016) os melhores resultados foram o HPMC e o PVP.

Corroborando a ideia de se analisar os estabilizantes estérico e de carga de maneira conjunta, Wang e colaboradores (2018) relataram que a presença de LSS aumenta a estabilidade e a uniformidade de suspensões de flurbiprofeno em HPMC diluído. Portanto, considerando os

resultados de cada trabalho citado e a disponibilidade de cada estabilizante, decidiu-se avaliar o efeito da concentração de LSS e HPMC na FA para a obtenção de nanocristais de EFV.

Assim, foi decidido proceder uma avaliação da possibilidade de uso de quantidades menores de ambos os estabilizantes, em relação às concentrações ótimas encontradas por Sartori (2016) e Kumar e Siril (2020), citadas anteriormente. Portanto, foi definida inicialmente uma faixa de estudo de 1 a 5% (%mEFV) de HPMC, e de 0,2 a 2% (%mEFV) de LSS.

4.1.3 Ensaios iniciais

4.1.3.1 Forma de promoção de agitação

Os experimentos E01, E02 e E03 serviram para avaliar principalmente a montagem do aparato experimental, incluindo a definição do recipiente usado, a aplicabilidade da bomba peristáltica para adição da FO à FA e o controle de temperatura da FA. A altura da coluna de líquido no recipiente escolhido deveria satisfazer os requisitos de operação do UT, em termos de posição e atuação do rotor (IKA, 2020). A bomba peristáltica (Figura 4.1) possui controle manual da velocidade relativa de rotação do motor, tornando necessária a calibração da vazão aplicada, cujos resultados estão no Apêndice B. O aquecimento disponível para a FA era por meio de placa de aquecimento, cuja interface não permitia um controle preciso da temperatura, sendo esse o motivo da fixação da mesma em 70°C.

Figura 4.1 – Bomba peristáltica usada neste trabalho.

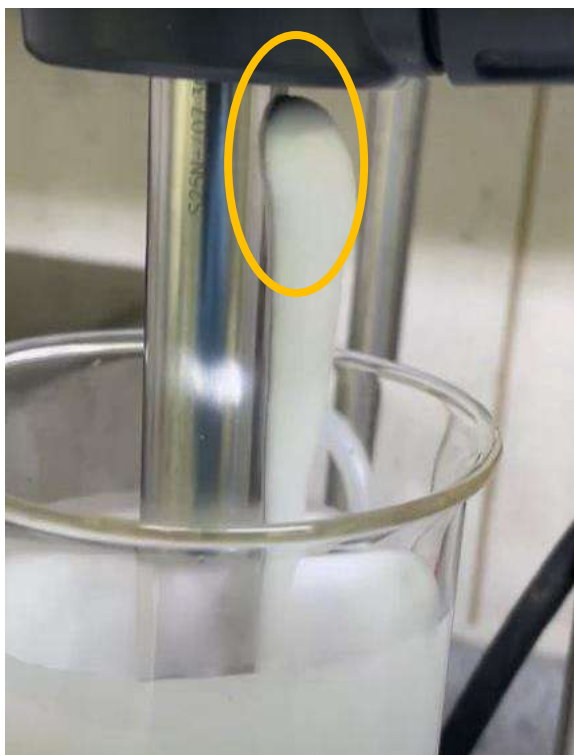


Fonte: arquivo pessoal.

Dentre as limitações observadas, a mais frequente delas foi a formação de espuma, que ocorria devido à integração de ar no sistema graças ao turbilhonamento provocado pelo UT, separando a amostra em duas fases. Este problema já havia sido relatado por Sartori (2016), e seu principal efeito é a inibição da homogeneização da suspensão obtida: partículas de EFV retidas na estrutura micelar da espuma são carregadas verticalmente pela mesma, impedindo-as de sofrerem o efeito do cisalhamento provocado pelo UT, atenuando a redução de tamanho pretendida.

Este efeito físico de ascensão da espuma chegou ao ponto de escalar o duto interno da haste do UT no experimento E02, como observado na Figura 4.2, provocando a interrupção do ensaio antes do tempo previsto.

Figura 4.2 – Visualização da espuma formada no ensaio E02.



Fonte: arquivo pessoal.

Na literatura, o uso do LSS como agente espumante encontra amplas descrições (RANJANI e RAMAMURTHY, 2010; HARYANTO et al, 2018; JIANG et al, 2020), e foi relatado e estudado o uso de espumas baseadas em matrizes compostas por HPMC (KARLSSON et al, 2015; OH e LEE, 2018). Portanto, visando a atenuação desse problema, a primeira medida adotada foi a redução na concentração absoluta dos estabilizantes entre os ensaios E02, E03 e E04, ato que seria repetido no ensaio E07. A velocidade de rotação do UT,

por sua vez, foi mantida em 22000 rpm, a fim de maximizar o efeito do cisalhamento e observar o comportamento das amostras obtidas nas condições mais propensas a formar espuma.

Paralelamente, tentou-se reduzir a integração de ar diminuindo-se o tempo total de agitação a partir do ensaio E04, avaliando-se de maneira concomitante a redução do tempo de agitação após a adição da FO à FA e o aumento da taxa de adição da FO à FA. A formação de espuma foi menos expressiva nos ensaios E04 e E05, mas voltou a ocorrer de maneira mais pronunciada nos ensaios E06 a E10. A Figura 4.3 compara os aspectos visuais dos experimentos E05, E07 e E10, a fim de ilustrar a diferença citada.

Figura 4.3 – Amostras E05 (à esquerda), E07 (centro) e E10 (à direita).



Fonte: arquivo pessoal.

As medições de tamanho de partícula das suspensões foram realizadas a partir do ensaio E04, e seus valores estão apresentados na Tabela 4.2, onde observa-se que todos os tamanhos obtidos foram micrométricos, à exceção do valor de D_{50} da amostra E09. Ainda assim, nenhum dos valores permitiu a análise das amostras no Zetasizer. Para se aproximar mais de condições descritas por Sartori (2016) como propícias à formação de nanopartículas de EFV, foi avaliado o efeito da troca de solvente de acetona para metanol na formação de espuma, do experimento E06 ao E08, mas não foi observada melhoria significativa nesse quesito, retornando-se ao uso da acetona nos ensaios E09 e E10. Outra mudança testada, no ensaio E10, foi a adição da FO por injeção rápida, a fim de se reduzir ainda mais o tempo de agitação.

Tabela 4.2 – Distribuições de tamanhos de partícula, obtidas pelo Mastersizer, das amostras E4 a E13.

Ensaio	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)
E04	2,58 ± 0,06	7,95 ± 0,92
E05	3,03 ± 0,04	6,06 ± 0,09
E06	22,50 ± 8,90	1200,00 ± 559,00
E07	24,20 ± 0,60	51,50 ± 1,20
E08	112,00 ± 9,00	181,00 ± 4,00
E09	0,30 ± 0,04	78,10 ± 13,30
E10	68,60 ± 2,50	125,00 ± 5,00
E11	37,40 ± 1,30	89,60 ± 3,40
E12	77,70 ± 21,20	1530,00 ± 635,00
E13	47,70 ± 0,00	93,90 ± 1,00

Fonte: elaboração própria.

Wang e colaboradores (2017) estudaram os efeitos da temperatura na formação de espuma por diferentes surfactantes catiônicos, aniônicos, não-iônicos e anfipróticos, e concluíram que o aumento da temperatura do meio favorece tanto a capacidade de formação de espuma, quanto o aumento do volume da espuma formada. Portanto, outra medida avaliada para a redução da formação de espuma foi a ausência de aquecimento externo, a partir do ensaio E08, o que não resultou em uma melhoria significativa nem na formação de espuma, nem nos tamanhos de partícula.

Outro problema importante verificado nesses experimentos iniciais foi a ocorrência de uma mudança de viscosidade da amostra após o fim da agitação, transformando a amostra inicialmente fluida em algo semelhante a um gel. O primeiro ensaio em que isso ocorreu foi o E04, e tal comportamento viria a se repetir nos ensaios E11, E12, E17, E18 e E44. A Figura 4.4 mostra o aspecto visual da amostra E04, após o processo de gelificação.

De acordo com Su e colaboradores (2008), a presença de LSS em soluções aquosas de HPMC é capaz de acelerar a gelificação do polímero, em diferentes temperaturas. Apesar de as menores concentrações, tanto de LSS quanto de HPMC avaliadas pelo grupo citado serem cerca de 4 vezes maiores do que as usadas até este ponto no presente trabalho, optou-se por reduzir as concentrações absolutas de ambos os estabilizantes no ensaio E05, em relação ao ensaio anterior, através da redução da massa de EFV adicionada. Não foi observado o efeito de gelificação visto no ensaio E04, e a amostra apresentou o aspecto da Figura 4.3 (à esquerda), compatível com a descrição das suspensões obtidas por Sartori (2016).

Figura 4.4 – Aspecto visual da amostra E04.



Fonte: arquivo pessoal.

Assim, após dez experimentos com resultados indesejáveis e diversas tentativas de mitigação da formação de espuma, avaliou-se o que poderia ser feito para mitigar este problema. O primeiro passo a ser testado seria a mudança no método de agitação. Como as medidas adotadas não foram suficientes para se evitar a formação de espuma, e apesar de termos escolhido o UT pensando num futuro escalonamento do processo, decidiu-se mudar a forma de agitação. Sartori (2016), apesar de ter relatado resultados melhores, também indicou este problema como algo restritivo à continuidade dos experimentos com o uso de UT, e mudou seu método de agitação para o uso de sonicador. Assim optou-se em substituir o UT, passando-se a usar um sonicador a partir do ensaio E11, que promove redução do tamanho de partícula através da cavitação acústica do meio.

O segundo passo foi substituir o solvente da FO de acetona para metanol, de maneira similar ao trabalho de Sartori (2016), considerando que a diferença de polaridade do meio poderia ter influência nos resultados obtidos frente a presença dos estabilizantes.

O sonicador QSonica Q700 usado possui controle baseado na amplitude empregada, variável de 01 a 100% (QSONICA, 2016). A potência empregada por Sartori (2016) foi de 50% para todos os experimentos por ela realizados. Com a ideia de se avaliar a influência da amplitude empregada no tamanho de partícula obtido, estipulou-se uma faixa de 50% a 70% de amplitude para ser avaliada neste trabalho. O uso da bomba peristáltica nos dois primeiros

ensaios com o sonificador, E11 e E12, não se mostrou prática em termos de posicionamento e fixação da mangueira de saída, sendo descartada a partir do ensaio E13.

O primeiro experimento realizado com sonicação, E11, apresentou formação muito leve de espuma, com separação em duas fases; e após alguns minutos, ocorreu gelificação da fase mais densa. O experimento seguinte, com menor concentração de EFV, o que significa redução na concentração absoluta de estabilizantes, apresentou fase única, inicialmente com aspecto leitoso, mas também sofreu gelificação em poucos minutos.

Apesar de não ter sido empregado aquecimento direto da FA, suspeitou-se que o tempo total de sonicação fosse suficiente para que a cavitação provocasse aumentos localizados de temperatura na suspensão, possivelmente favorecendo o processo de gelificação observado, com base no trabalho de Wang e colaboradores (2017), citado anteriormente. Em seu artigo, Joshi (2011) indica que a presença de LSS em solução, mesmo em baixas concentrações, reduz a temperatura em que se inicia o processo de gelificação do HPMC, possivelmente potencializando o efeito do aumento da temperatura sugerido.

Decidiu-se, então, tentar reproduzir as condições de alguns dos experimentos realizados por Sartori (2016) com o sonificador, a fim de avaliar a viabilidade de produção, indicada pela autora, de partículas manométricas sob estas condições. Desta forma, o ensaio E13 foi conduzido, repetindo as mesmas condições e procedimentos adotados no experimento SN11 da autora, a fim de se verificar a obtenção de nanopartículas e nortear as próximas condições a serem adotadas neste trabalho. Visualmente, o aspecto do ensaio se assemelhou ao descrito por Sartori (2016), e os resultados das medições de tamanho de partícula estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Comparação dos tamanhos de partícula obtidos nos ensaios SN11, de Sartori (2016), com o ensaio E13, deste trabalho.

Ensaio	Mastersizer		Zetasizer	
	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)	d _{AVG} (nm)	PDI
SN11	-	-	252,10	0,170
E13	47,70 ± 0,00	93,90 ± 1,00	-	-

Fonte: elaboração própria.

Em seu trabalho, Sartori (2016) apresentou os resultados com medições obtidas por análise no Zetasizer. No caso da amostra E13, a medição inicial no Mastersizer forneceu tamanhos de partículas micrométricas, não se adequando aos critérios para medição no Zetasizer, não sendo possível realizar uma confirmação entre os dois resultados. Mesmo não

sendo obtido o tamanho de partícula desejado, os experimentos foram suficientes para confirmar o sonificador como o aparato a ser utilizado para promoção de agitação dos próximos experimentos deste trabalho.

4.1.3.2 Avaliação individual dos parâmetros composicionais

Devido às dificuldades relatadas, e com o intuito de definir o procedimento padrão para execução dos experimentos, tornou-se interessante avaliar alterações individuais de cada um dos parâmetros composicionais de interesse, para facilitar a escolha das variáveis a serem estudadas e de seus limites de uso.

A forma de adição da FO à FA foi fixada como injeção rápida, com volume de 20 ml, em 180 ml de FA, sem aquecimento. A potência relativa de sonicação foi mantida em 50%, sendo mantida por 60 segundos após o fim da adição. Os fatores a serem analisados de maneira individualizada foram: concentração de EFV na FO; concentração de LSS na FA; e concentração de HPMC na FA.

4.1.3.2.1 Concentração de EFV na FO

As concentrações de EFV na FO (metanol) em 11 dos 13 ensaios realizados até o momento foram iguais ou superiores a 20% (p/v), sendo a menor concentração dentre os outros dois ensaios igual a 13,35% (p/v). Os tamanhos de partícula desejados não estavam sendo alcançados nessas condições, logo decidiu-se avaliar o efeito de uma redução nesses valores, com o uso de soluções de EFV mais diluídas, mantendo-se fixo o volume de FO adicionado à FA.

Portanto, foram realizados três ensaios sequenciais (E14, E15 e E16), com concentrações respectivas de 10%, 5% e 2,5% (p/v) de EFV na FO e com concentrações dos estabilizantes na FA foram fixadas em 10% e 2% (%mEFV), respectivamente, para o HPMC e o LSS. As três suspensões formadas apresentaram aspecto leitoso, sem separação de fases, e visualmente estáveis após o término da sonicação. A Tabela 4.4 traz os resultados das análises de tamanho de partícula para cada amostra.

Os melhores resultados foram obtidos para a amostra E15, que mesmo assim não se credenciou para análise no Zetasizer, assim como as amostras E14 e E16, devido aos valores micrométricos de tamanho de partícula. Os resultados apresentados indicam que a redução da concentração de EFV na FO abaixo de 10% (p/v) não se traduz numa redução expressiva do tamanho de partícula. Remetendo a Bennet (1997), citado no subitem 4.1.1, a redução na

concentração de EFV pode simultaneamente diminuir as taxas tanto de crescimento de partículas, quanto de nucleação das mesmas. Apesar desses efeitos não terem sido avaliados mais a fundo neste trabalho, essa dualidade pode explicar o comportamento dos tamanhos de partícula obtidos nas concentrações de EFV estudadas nos três ensaios realizados.

Tabela 4.4 – Distribuições de tamanhos de partícula, obtidas pelo Mastersizer, das amostras E14, E15 e E16.

Ensaio	Conc. EFV na FO (%p/v)	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)
E14	10,0	34,10 ± 18,10	2080,00 ± 532,00
E15	5,0	21,70 ± 7,50	1530,00 ± 86,00
E16	2,5	175,00 ± 153,00	1700,00 ± 559,00

Fonte: elaboração própria.

Considerando os valores obtidos, e com o intuito de se manter uma concentração final mais alta de EFV, decidiu-se prosseguir as avaliações seguintes com a concentração de EFV na FO igual a 10% (p/v).

4.1.3.2.2 Concentração de estabilizantes na FA

A próxima sequência de ensaios objetivou analisar a influência individual do valor adicionado de estabilizantes na suspensão, buscando avaliar se uma maior ou menor disponibilidade de estabilizante na FA refletiria em uma mitigação do crescimento das partículas.

Os primeiros testes foram com o estabilizante de carga (LSS) tendo seus valores aumentados. A concentração de EFV na FO foi mantida em 10% (p/v) e foram realizados mais dois ensaios (E17 e E18) com concentrações respectivas de 3 e 4% (%mEFV) de LSS.

Durante a sonicação, ambas as amostras pareciam estáveis, monofásicas e leitosas. Porém, logo após o término da sonicação, as amostras apresentaram mudanças praticamente imediatas de viscosidade, sofrendo processo de gelificação em poucos segundos, resultando em aspectos similares aos exibidos na Figura 4.4 (página 53). Devido a este fato, não foi possível obter uma alíquota para medição dos tamanhos de partícula obtidos nos ensaios E17 e E18, sendo decidido manter a concentração de 2% (%mEFV) de LSS e proceder à execução de experimentos com aumento da concentração de estabilizante estérico (HPMC).

Foram realizados dois ensaios (E19 e E20) com concentrações respectivas de 20 e 30% (%mEFV) de HPMC, mantendo-se 10% (p/v) de EFV na FO e 2% (%mEFV) de LSS na FA.

As duas suspensões formadas apresentaram aspecto leitoso, sem separação de fases, e não ocorreu processo de gelificação como nos ensaios E17 e E18. A análise da distribuição do tamanho de partícula para as amostras E19 e E20, assim como a amostra E14, feita previamente, e que continha 10% (%mEFV) de HPMC, está apresentada na Tabela 4.5:

Tabela 4.5 – Distribuições de tamanhos de partícula, obtidas pelo Mastersizer, das amostras E14, E19 e E20.

Ensaio	Conc. HPMC na FA (%mEFV)	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)
E14	10	34,10 ± 18,10	2080,00 ± 532,00
E19	20	435,00 ± 243,00	1970,00 ± 38,00
E20	30	0,18 ± 0,06	52,00 ± 22,00

Fonte: elaboração própria.

Avaliando-se a resposta D₅₀ dos três ensaios, observa-se na maior concentração do estabilizante estérico (30%) que houve redução significativa do tamanho de partícula, com valor de D₅₀ abaixo de 500 nm, porém ainda não suficiente para se enquadrar no objetivo desejado, devido ao alto valor de D₉₀. De qualquer forma, os resultados do ensaio E20 foram os melhores obtidos até agora, servindo de base para os ensaios seguintes.

De posse destes resultados, parecia claro que a presença do estabilizante estérico (HPMC), em valores próximos a 30% (%mEFV) ou superiores, era uma direção para a obtenção de nanopartículas, mas ainda pairava uma dúvida quanto à influência do estabilizante de carga (LSS), que promoveu gelificação das amostras com seu aumento, atuando negativamente para a formação de nanopartículas.

Na literatura, além do efeito de gelificação citado por Su e colaboradores (2008), foi relatado que o LSS interage, mesmo em baixas concentrações, com os grupos hidroxipropil e metil conectados à estrutura celulósica do HPMC (WITTGREN *et al*, 2005), reduzindo sua disponibilidade no meio, sendo esta uma conclusão compatível com as observações realizadas por Rede e colaboradores (2017) na análise de formulações de comprimidos de diclofenaco de sódio.

Portanto, pode-se inferir que a presença de LSS nos ensaios de precipitação com EFV pode estar reduzindo a eficácia da redução do crescimento das partículas formadas, assim como interferindo no efeito de estabilização pretendido com o uso do HPMC.

Logo, optou-se por avaliar o efeito de uma possível redução dessa concentração, sendo realizados três testes sequencias (E21, E22 e E23) com concentrações respectivas de 1%, 0,5%

e 0% (%mEFV) de LSS. Nos três ensaios, foi observada a formação de suspensões monofásicas de aspecto leitoso. A Tabela 4.6 traz os valores analisados pelo Mastersizer para os três ensaios, juntando-se à análise dos resultados a distribuição de tamanho de partícula já obtida para a amostra E20.

Tabela 4.6 – Distribuições de tamanhos de partícula, obtidas pelo Mastersizer, das amostras E20 a E23.

Ensaio	Conc. LSS na FA (%mEFV)	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)
E20	2,0	0,18 ± 0,06	52,00 ± 22,00
E21	1,0	0,12 ± 0,04	11,70 ± 1,20
E22	0,5	14,60 ± 1,50	49,40 ± 7,70
E23	0,0	0,12 ± 0,02	1,20 ± 0,20

Fonte: elaboração própria.

Os resultados da medição indicam valores de D₅₀ abaixo de 500 nm para três dos quatro ensaios comparados. As amostras E20 a E22 apresentaram valores de D₉₀ acima do desejado (<10 µm), mas, pela primeira vez neste trabalho, foi obtida uma amostra com valores D₅₀ e D₉₀ enquadrados nas faixas requeridas para análise no Zetasizer. Desta forma, uma alíquota da amostra E23 foi preparada para análise no referido equipamento, cujos resultados são trazidos pela Tabela 4.7:

Tabela 4.7 – Diâmetro médio de partícula (d_{AVG}) e PDI, obtidos pelo Zetasizer, da amostra E23.

Ensaio	Conc. LSS na FA (%p/v)	d _{AVG} (nm)	PDI
E23	0	247,70 ± 2,80	0,170 ± 0,040

Fonte: elaboração própria.

Como visto acima, o diâmetro médio de partícula se enquadra perfeitamente na escala nanométrica. Além disso, valores práticos de PDI abaixo de 0,2 são majoritariamente considerados satisfatórios para materiais nanoparticulados (DANAEI *et al*, 2018). Assim, como ambos os índices avaliados pelo Zetasizer para a amostra E23 indicaram resultados bastante satisfatórios, resolveu-se não utilizar mais o estabilizante de carga LSS nos experimentos seguintes.

Para a definição dos planejamentos experimentais, já havia informações suficientes para definir a faixa de estudo da concentração de EFV na FO, faltando definir apenas a faixa de estudo da outra variável escolhida: a concentração de HMPC na FA.

Para avaliar os limites de concentração de HPMC na FA foram definidos dois ensaios (E24 e E25) com concentrações de 25 e 35% (%mEFV), respectivamente. Ambas as suspensões formadas apresentaram aspecto monofásico, leitoso e visualmente estável. A amostra E25, assim como a E23 (com 30% de HPMC), apresentou valores de D_{50} e D_{90} que possibilitavam sua análise no Zetasizer. Os resultados das análises para as amostras E23 a E25, feitas no Mastersizer e no Zetasizer (quando aplicável), são apresentados na Tabela 4.8:

Tabela 4.8 – Análises das amostras E23, E24 e E25 realizadas no Mastersizer e, quando aplicável, no Zetasizer.

Ensaio	Conc. HPMC na FA (%mEFV)	Mastersizer		Zetasizer	
		D_{50} (μm)	D_{90} (μm)	d_{AVG} (nm)	PDI
E24	25	$6,78 \pm 1,93$	$57,40 \pm 6,40$	-	-
E23	30	$0,12 \pm 0,02$	$1,15 \pm 0,21$	$247,70 \pm 2,80$	$0,170 \pm 0,040$
E25	35	$0,12 \pm 0,01$	$0,86 \pm 0,17$	$248,00 \pm 4,30$	$0,110 \pm 0,020$

Fonte: elaboração própria.

Foram obtidos valores satisfatórios de D_{50} e D_{90} para os ensaios E23 e E25, que também apresentaram tamanhos nanométricos de partícula por análise no Zetasizer. Esses resultados sugerem que, para concentrações acima de 30% (%mEFV) de HPMC, não há diminuição significativa no valor de d_{AVG} . Além disso, uma concentração mais elevada de HPMC na FA pode resultar numa distribuição mais uniforme de tamanho de partícula, enquanto que concentrações muito reduzidas de HPMC talvez não sejam suficientes para impedir o crescimento das partículas de EFV obtidas. Os valores de PDI das amostras E23 e E35 estão dentro do limite considerado satisfatório ($\text{PDI} < 0,2$).

Assim, com base nos resultados obtidos nos ensaios preliminares, já é possível definir as variáveis e faixas a serem estudadas na busca pelas condições ótimas para obtenção de nanossuspensões de EFV se utilizando de um planejamento experimental.

4.2 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO (PFC)

Considerando os resultados obtidos, até então, e a preferência de emprego de uma quantidade menor de HPMC e maior concentração de EFV na FO, foram definidas as faixas de 5 a 15% (p/v) de EFV na FO e 25 a 30% (%mEFV) de HPMC na FA, para a construção do

planejamento fatorial. Um PFC de duas variáveis com dois pontos centrais foi montado, resultando em 6 ensaios, gerando a marcha experimental apresentada na Tabela 3.3 (página 45) executada seguindo a ordem descrita.

Todas as seis suspensões formadas apresentaram o mesmo aspecto leitoso, sem separação de fases e visualmente estáveis, com as médias e desvios de seus resultados apresentados na Tabela 4.9 nos dois analisadores de partículas.

Tabela 4.9 – Análise das amostras E26 a E31 no Mastersizer e no Zetasizer.

Ensaio	Mastersizer		Zetasizer	
	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)	d _{AVG} (nm)	PDI
E26	12,40 ± 6,70	78,20 ± 12,10	290,40 ± 3,80	0,106 ± 0,034
E27	0,09 ± 0,01	0,89 ± 0,21	226,90 ± 4,20	0,162 ± 0,010
E28	0,09 ± 0,01	0,62 ± 0,16	235,40 ± 1,10	0,083 ± 0,018
E29	0,11 ± 0,01	0,83 ± 0,12	308,50 ± 13,00	0,181 ± 0,040
E30	0,20 ± 0,02	1,29 ± 0,44	276,30 ± 4,70	0,104 ± 0,023
E31	0,10 ± 0,01	0,81 ± 0,09	231,70 ± 4,50	0,098 ± 0,031

Fonte: elaboração própria.

Os valores da Tabela 4.9 indicam que todas as amostras obtiveram valores de D₅₀ e de D₉₀ dentro dos limites desejados, à exceção da amostra E26 que, apesar de não estar apta a ser analisada pelo Zetasizer, teve esta análise conduzida, de forma a permitir a avaliação completa de todas as respostas, no software Design Expert. Os resultados das análises das amostras no Zetasizer atestam que todas as amostras obtiveram resultados de d_{AVG} e de PDI bastante satisfatórios.

Os valores observados no Mastersizer funcionam, neste trabalho, apenas como critério para avaliação das amostras no Zetasizer, que fornece os dados a serem avaliados neste trabalho. Portanto, apenas os valores de d_{AVG} e PDI, obtidos pelo Zetasizer, serão discutidos estatisticamente. A análise dos dados e obtenção de modelos no software foi realizada considerando as três medições realizadas pelo Zetasizer para a mesma alíquota de cada amostra. Os valores de influência e porcentagem de contribuição dos parâmetros sobre as respostas d_{AVG} e PDI, são exibidos na Tabela 4.10.

Analisando-se os dados apresentados, é possível observar influências positivas de ambos os fatores sobre o valor de d_{AVG}, e que o PDI é influenciado positivamente pela concentração de EFV e negativamente, ainda que em menor grau, pela concentração de PDI. Contudo, os efeitos individuais para o valor de d_{AVG} são ofuscados pela forte interação entre os fatores, que acaba sendo mais relevante na interpretação do comportamento dos tamanhos de

partícula observados. Além disso, observa-se a forte contribuição de curvatura, indicando que o modelo linear obtido não representa a superfície em estudo não sendo ideal para descrever os dados obtidos, pois existe, pelo menos, um ponto ótimo (que pode ser de máximo ou de mínimo) do processo ao qual o modelo linear não se ajusta.

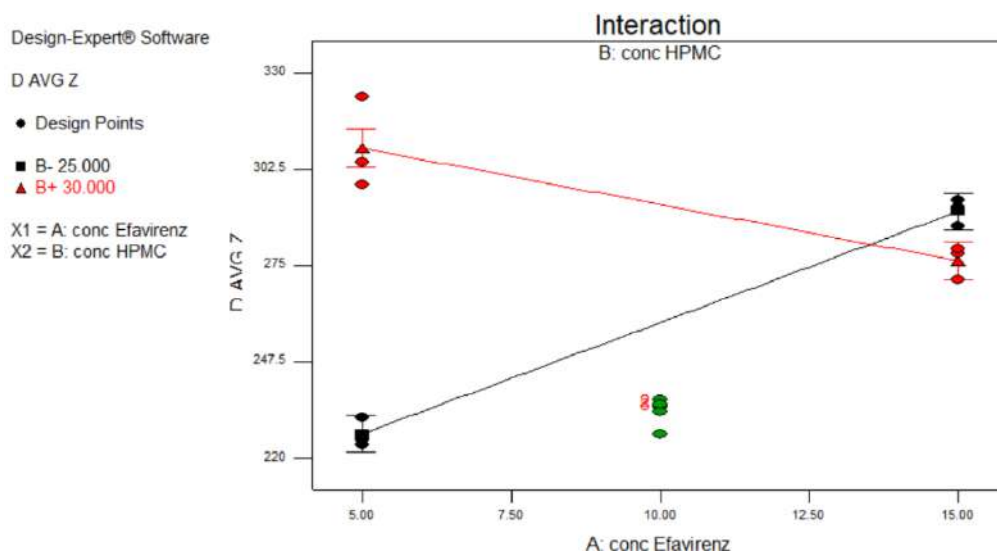
Tabela 4.10 – Efeitos de cada parâmetro do PFC para o d_{AVG} e para o PDI.

Termo	d_{AVG} (nm)		PDI	
	Influência	Contribuição (%)	Influência	Contribuição (%)
A – Conc. EFV	15,68	3,97	-0,07	40,67
B – Conc. HPMC	33,72	18,36	8,17E-03	0,61
AB	-47,88	37,03	-0,01	1,01
Curvatura	-48,45	37,91	-0,06	27,77

Fonte: elaboração própria.

A interação entre os fatores sobre o valor de d_{AVG} é visualmente representada na Figura 4.5. Nela, observa-se que o menor tamanho de partícula é obtido nas menores concentrações de EFV e de HPMC. Quando se utiliza concentração mais baixa de EFV (5%), o aumento na concentração de HPMC (30%) promove um aumento considerável do tamanho de partícula, enquanto que em concentração mais alta de EFV (15%), promove uma pequena redução no tamanho final da partícula. Pensando num possível aumento de escala, tem mais sentido buscar uma condição em que haja a possibilidade de uso de uma concentração maior de EFV na FO. Para que isso seja viável, a concentração de HPMC deve ter que ser aumentada.

Figura 4.5 – Interação entre os fatores A e B e sua influência no valor medido de d_{AVG} .



Fonte: software Design-Expert.

As Tabelas 4.11 e 4.12 trazem a análise de variância (ANOVA, na sigla em inglês) de cada parâmetro, de sua interação, do modelo e da curvatura para, respectivamente, os valores de d_{AVG} e PDI. Assumindo uma distribuição normal e um intervalo de confiança de 95%, o modelo matemático, os parâmetros e a curvatura são estatisticamente significativos se o valor da probabilidade de F apresentar p-valor $< 0,05$.

Tabela 4.11 – ANOVA dos parâmetros do PFC para o d_{AVG} .

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de F	p-valor Prob > F
Modelo	11026,78	3	3675,59	93,92	< 0,0001
<i>A – Conc. EFV</i>	737,90	1	737,90	18,86	0,0008
<i>B – Conc. HPMC</i>	3410,44	1	3410,44	87,15	< 0,0001
<i>AB</i>	6878,44	1	6878,44	175,77	< 0,0001
Curvatura	7042,01	1	7042,01	179,95	< 0,0001

Fonte: elaboração própria.

Tabela 4.12 – ANOVA dos parâmetros do PFC para o PDI.

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de F	p-valor Prob > F
Modelo	0,014	3	4,60E-03	6,12	0,0079
<i>A – Conc. EFV</i>	0,013	1	0,01	17,66	0,0010
<i>B – Conc. HPMC</i>	2,00E-04	1	2,00E-04	0,27	0,6144
<i>AB</i>	3,31E-04	1	3,31E-04	0,44	0,5185
Curvatura	9,06E-03	1	9,06E-03	12,06	0,0041

Fonte: elaboração própria.

As Equações (4.1) e (4.2) representam os modelos que melhor se ajustaram para descrever os dados, respectivamente, de d_{AVG} e PDI.

$$d_{AVG} = -452,33 + 54,24 * A + 25,90 * B - 1,92 * AB \quad (4.1)$$

$$PDI = 0,044 + 4,900 \cdot 10^{-3} * A + 5,833 \cdot 10^{-3} * B - 4,200 \cdot 10^{-3} * AB \quad (4.2)$$

Observa-se, para os dados obtidos no PFC, que apesar dos modelos lineares serem aparentemente estatisticamente significativos para as duas respostas (d_{AVG} e PDI), a avaliação significativa de curvatura impede a utilização do modelo linear por não representar a área total de estudo. Sendo assim, para que possam ser propostos modelos válidos para representação das

superfícies de resposta, é imprescindível aumentar os graus de liberdade (níveis avaliados de cada parâmetro), aplicando o método de superfície de resposta (MSR), a fim de poder avaliar a proposição de modelos não lineares representativos para explicar os dados observados.

4.3 MÉTODO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR)

Como apontado acima, foi possível obter quase todas as condições com tamanho de partícula nanométrico, mas não foi possível descrever um modelo válido para a área estudada; assim, um MSR foi montado. Visando obter condições otimizadas para este sistema, com viabilidade de escalonamento, resolveu-se alterar as faixas de estudo dos parâmetros, com base nos resultados observados no PFC. Portanto, a faixa de concentração de EFV na FO foi alterada para 10 a 20% e, considerando a suposição de necessidade de aumento da concentração de HPMC citada na análise da interação da Figura 4.5, ela foi aumentada para 28 a 32%. O valor de alfa aplicado foi de $\sqrt{2}$ (1,414), a fim de se manter a rotabilidade do desenho montado com a adição dos novos níveis. Dessa forma, foi montado pelo *software* um MSR do tipo CCD circunscrito com dois fatores e três pontos centrais, cujos valores e ordenamento dos ensaios foram apresentados na Tabela 3.4 (página 45), executados seguindo a ordem sugerida pelo *software*.

As 11 suspensões obtidas apresentaram aspectos similares entre si, sem separação de fases e visualmente estáveis. Todas as amostras produzidas obtiveram valores de D_{50} e D_{90} que as encaixaram nos requisitos para serem avaliadas no Zetasizer. A Tabela 4.13 traz as distribuições de tamanho de partícula para os ensaios do MSR no Mastersizer, assim como as análises feitas no Zetasizer. Os resultados comprovam que todas as 11 amostras configuram ótimos resultados, tanto de diâmetro de partícula, quanto de PDI.

Seguindo o mesmo critério já explicado no PFC, foram avaliados no *software* os valores de todas as medições, realizadas três vezes para a mesma alíquota de cada amostra, dos valores de d_{AVG} e PDI. A Tabela 4.14 apresenta os resultados de ANOVA para a resposta d_{AVG} , assumindo todos os parâmetros calculados com os graus de liberdade disponíveis.

Tabela 4.13 – Análise das amostras E32 a E42 no Mastersizer e no Zetasizer.

Ensaio	Mastersizer		Zetasizer	
	D ₅₀ (μm)	D ₉₀ (μm)	d _{AVG} (nm)	PDI
E32	0,11 ± 0,01	0,70 ± 0,11	254,40 ± 2,10	0,134 ± 0,047
E33	0,08 ± 0,01	0,49 ± 0,10	222,10 ± 1,90	0,099 ± 0,026
E34	0,47 ± 0,06	1,29 ± 0,03	275,70 ± 6,30	0,114 ± 0,034
E35	0,16 ± 0,01	1,19 ± 0,17	269,90 ± 4,40	0,107 ± 0,024
E36	0,14 ± 0,01	0,55 ± 0,03	264,70 ± 2,30	0,067 ± 0,019
E37	0,16 ± 0,01	0,83 ± 0,08	281,70 ± 3,70	0,113 ± 0,056
E38	0,16 ± 0,03	0,78 ± 0,02	291,50 ± 3,20	0,069 ± 0,016
E39	0,35 ± 0,03	3,64 ± 0,10	271,90 ± 4,40	0,061 ± 0,016
E40	0,08 ± 0,03	2,21 ± 0,82	266,10 ± 6,30	0,118 ± 0,020
E41	0,09 ± 0,01	0,52 ± 0,03	238,00 ± 3,80	0,118 ± 0,030
E42	0,11 ± 0,01	0,66 ± 0,02	270,70 ± 7,40	0,126 ± 0,029

Fonte: elaboração própria.

Tabela 4.14 – ANOVA dos parâmetros do MSR para o d_{AVG}.

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de F	p-valor Prob > F
Modelo	10145,96	7	1449,42	41,39	< 0,0001
<i>A – Conc. EFV</i>	2895,21	1	2895,21	82,68	< 0,0001
<i>B – Conc. HPMC</i>	376,04	1	376,04	10,74	0,0040
<i>AB</i>	82,69	1	82,69	2,36	0,1409
<i>A²</i>	2130,68	1	2130,68	60,85	< 0,0001
<i>B²</i>	147,90	1	147,90	4,22	0,0539
<i>A²B</i>	1601,89	1	1601,89	45,75	< 0,0001
<i>AB²</i>	590,97	1	590,97	16,88	0,0006
Residual	665,30	19	174,98		
<i>Lack of fit</i>	285,66	1	285,66	13,54	0,0017
<i>Erro puro</i>	379,64	18	21,09		

Fonte: elaboração própria.

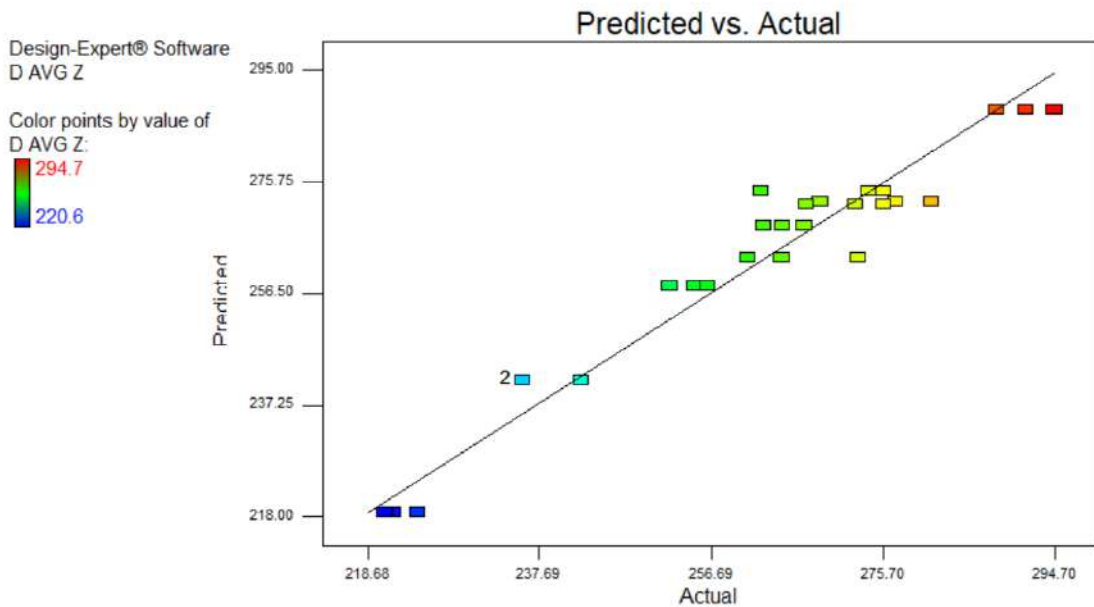
O modelo completo é estatisticamente significativo, apesar de conter parcelas não significativas, como *AB* e *B²*, que foram mantidas a fim de se manter a hierarquia dentro do modelo. O *lack of fit* (falta de ajuste) é um teste estatístico cujo resultado, se considerado significativo, normalmente indica que o modelo matemático adotado é incapaz de descrever adequadamente a relação entre os fatores e a resposta estudada (NIST e SEMATECH, 2002). Porém, o baixo valor do erro puro pode indicar que a variância entre as triplicatas de uma mesma amostra é pequena, o que pode elevar o valor de F do *lack of fit* (ANDERSON, 2010).

O modelo obtido apresentou valor alto de R² (0,9385), o qual ficou relativamente próximo do valor de R² ajustado (0,9158), e o p-valor do modelo ajustado ficou abaixo de 0,01%. A Equação (4.3) representa o modelo que melhor se ajusta para explicar os valores,

levemente dispersos, obtidos para a resposta d_{AVG} , conforme pode ser visualizado graficamente na Figura 4.6. Assim, o modelo pode ser usado, mas sabendo que podem ocorrer desvios mais altos que os esperados.

$$d_{AVG} = 9949,93 - 726,73 * A - 583,02 * B + 39,84 * AB + 9,18 * A^2 + 8,47 * B^2 - 0,33 * A^2B - 0,50 * AB^2 \quad (4.3)$$

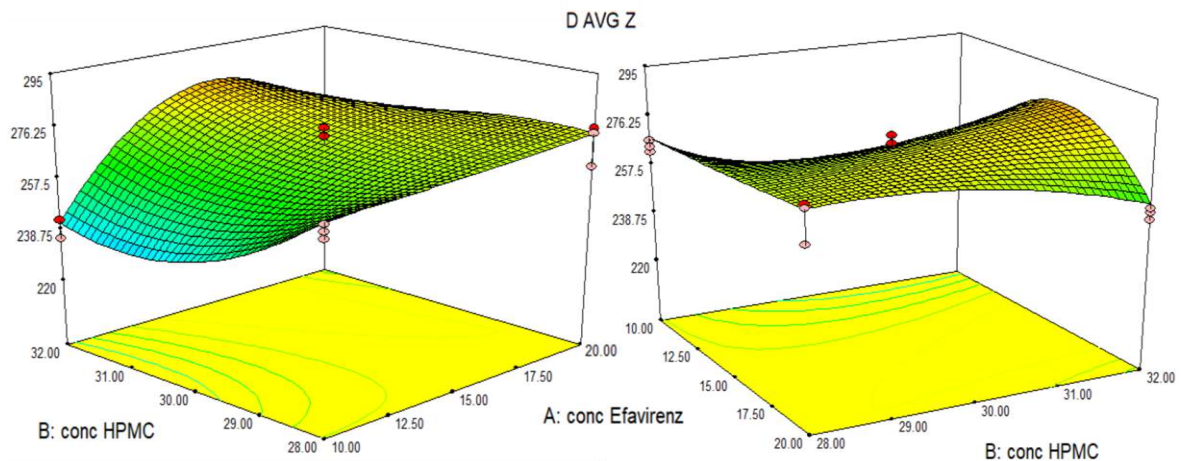
Figura 4.6 – Comparação entre os dados obtidos e os previstos no ajuste de d_{AVG} .



Fonte: *software* Design-Expert.

A superfície de resposta obtida, se utilizando o modelo escolhido, pode ser vista na Figura 4.7, sob dois ângulos diferentes, gerados por simples rotação do gráfico. A visualização da esquerda dá destaque aos valores mínimos de cada parâmetro, sendo possível observar que os menores valores de d_{AVG} ocorrem quando a concentração de EFV na FO é menor e a de HPMC na FO acima de 30%. Em concentrações maiores de EFV também é possível obter valores de d_{AVG} desejáveis, em torno de 270 nm adotando-se a concentração mais baixa de HPMC, como indica a visualização da direita, o que é uma opção bastante interessante para um escalonamento do processo.

Figura 4.7 – Visualizações da superfície de resposta do modelo obtido para o valor de d_{AVG} .



Fonte: adaptado do *software* Design-Expert.

A Tabela 4.15 apresenta os resultados de ANOVA para a resposta PDI, assumindo todos os parâmetros calculados com os graus de liberdade disponíveis.

Tabela 4.15 – ANOVA dos parâmetros do MSR para o PDI.

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de F	p-valor Prob > F
Modelo	0,018	7	2,58E-03	3,29	0,0183
A – Conc. EFV	5,61E-04	1	5,61E-04	0,72	0,4083
B – Conc. HPMC	2,99E-03	1	2,99E-03	3,82	0,0656
AB	1,47E-03	1	1,47E-03	1,88	0,1863
A ²	6,24E-03	1	6,24E-03	7,95	0,0109
B ²	2,90E-03	1	2,90E-03	3,70	0,0696
A ² B	5,60E-03	1	5,60E-03	7,14	0,0151
AB ²	8,28E-04	1	8,28E-04	1,06	0,3170
Residual	0,015	19	7,84E-04		
Lack of fit	7,15E-04	1	7,15E-04	0,91	0,3534
Erro puro	0,014	18	7,88E-04		

Fonte: elaboração própria.

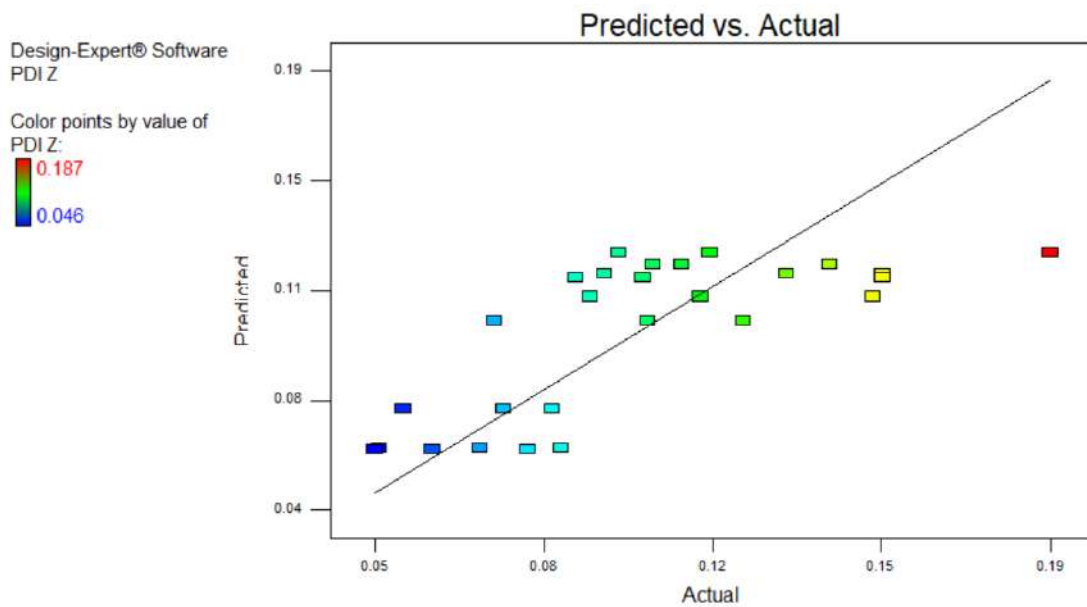
No caso do PDI, o modelo completo é estatisticamente significativo apesar de conter muitas parcelas não significativas, apresentando R^2 obtido (0,5477) e ajustado (0,3811) muito baixos e um *lack of fit* estatisticamente não significativo.

A Equação (4.4) representa o modelo que melhor se ajusta para explicar os valores, bem dispersos, obtidos para a resposta PDI, conforme pode ser visualizado graficamente na Figura 4.8. Assim, o modelo não pode ser usado, pois não representa a superfície em estudo, podendo

gerar desvios bem altos em condições intermediárias aos limites de valores utilizados para cada variável. Mas as respostas experimentais, representadas pelos extremos da superfície podem ser consideradas para uma tomada de decisão, pois refletem o valor real obtido nestas condições.

$$PDI = -7,933 + 1,081 * A + 0,401 * B - 0,055 * AB - 0,017 * A^2 - 4,254 \cdot 10^{-3} * B^2 + 6,108 \cdot 10^{-4} * A^2B + 5,874 \cdot 10^{-4} * AB^2 \quad (4.4)$$

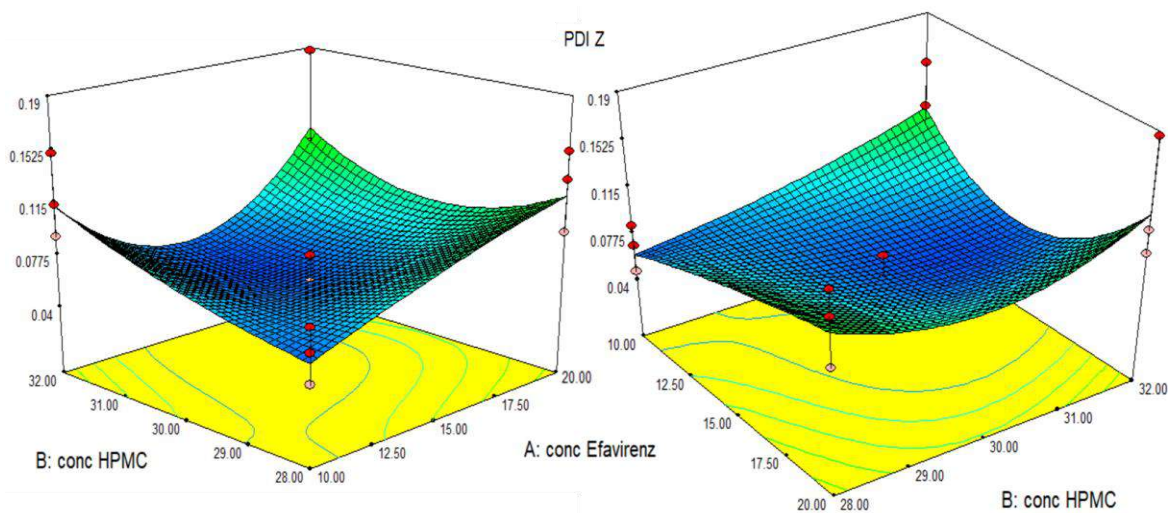
Figura 4.8 – Comparação entre os dados obtidos e os previstos no ajuste de PDI.



Fonte: *software* Design-Expert.

A superfície de resposta vista na Figura 4.9 confirma a falta de adequação do modelo aos resultados experimentais obtidos, visualizada pelos pontos vermelhos em destaque. Observa-se que, diferentemente do caso do d_{AVG} , um aumento na concentração de estabilizante não significa um menor índice de polidispersão. Além disso, reforça-se que, assim como para o d_{AVG} , é possível obter valores satisfatórios de PDI (abaixo de 0,2) em toda a superfície, mostrando que o sistema é homogêneo ao longo do desenho experimental, confirmando que podem ser adotadas a maior concentração de EFV e a menor concentração de HPMC das faixas estudadas.

Figura 4.9 – Visualizações da superfície de resposta do modelo obtido para o valor de PDI.



Fonte: adaptado do *software* Design-Expert.

Para garantir a estabilidade das nanossuspensões formadas, todas as amostras obtidas no MSR (E32 a E42) foram reavaliadas quanto ao d_{AVG} e ao PDI, após 60 minutos de sua preparação. Os valores medidos das amostras no Mastersizer após uma hora estão apresentados na Tabela 4.16:

Tabela 4.16 – Distribuições de tamanhos de partícula, obtidas pelo Mastersizer, das amostras E32 a E42 após uma hora, e comparação com valores iniciais.

Ensaio	D_{50} (μm)		D_{90} (μm)	
	Resultado	Variação	Resultado	Variação
E32	$0,12 \pm 0,01$	10,38%	$0,68 \pm 0,06$	-2,84%
E33	$0,08 \pm 0,01$	1,85%	$0,63 \pm 0,05$	29,18%
E34	$0,21 \pm 0,06$	-55,93%	$0,86 \pm 0,18$	-33,18%
E35	$0,18 \pm 0,01$	8,70%	$0,81 \pm 0,06$	-31,85%
E36	$0,12 \pm 0,01$	-14,18%	$1,05 \pm 0,12$	91,96%
E37	$0,14 \pm 0,01$	-9,03%	$1,07 \pm 0,17$	28,45%
E38	$0,12 \pm 0,01$	-26,22%	$0,64 \pm 0,05$	-17,82%
E39	$0,18 \pm 0,05$	-47,74%	$0,72 \pm 0,03$	-80,25%
E40	$0,09 \pm 0,01$	17,76%	$0,54 \pm 0,07$	-75,38%
E41	$0,09 \pm 0,01$	-1,14%	$0,49 \pm 0,01$	-5,81%
E42	$0,10 \pm 0,01$	-8,04%	$0,57 \pm 0,04$	-13,75%

Fonte: elaboração própria.

Observa-se um perfil complexo de variações, sendo impossível afirmar, pelos valores medidos no Mastersizer, se houve aglomeração de partículas na suspensão, sedimentação das partículas mais pesadas, ou ambos os efeitos simultaneamente. De qualquer forma, todas as

amostras mantiveram o encaixe nos requisitos para serem avaliadas no Zetasizer, com os resultados da análise e a comparação com os valores iniciais apresentados na Tabela 4.17.

Pela Tabela 4.17, observa-se que todas as 11 amostras produzidas configuram ótimos resultados, tanto de diâmetro de partícula, quanto de PDI, mantendo-se enquadradas como nanossuspensões. A amostra E42 é a única cuja variação no valor de d_{AVG} indica redução, ainda que pequena, do tamanho de partícula; para todas as outras amostras, há incremento nos valores, o que indica possível aglomeração leve nas suspensões obtidas. O perfil de valores de PDI apresentou variação mais expressiva, tanto positiva quanto negativa, sendo necessária uma avaliação mais criteriosa para se tirar alguma conclusão sobre o comportamento das suspensões a partir deste índice.

Tabela 4.17 – Diâmetro médio de partícula e PDI, obtidos pelo Zetasizer, das amostras E32 a E42 após uma hora.

Ensaio	d_{AVG} (nm)		PDI	
	Resultado	Variação	Resultado	Variação
E32	265,70 ± 1,80	4,44%	0,100 ± 0,033	-25,37%
E33	234,60 ± 3,90	5,63%	0,157 ± 0,049	58,59%
E34	280,60 ± 2,70	1,78%	0,134 ± 0,008	17,54%
E35	284,10 ± 0,60	5,26%	0,093 ± 0,020	-13,08%
E36	268,10 ± 2,50	1,28%	0,124 ± 0,055	85,07%
E37	289,80 ± 0,20	2,88%	0,093 ± 0,028	-17,70%
E38	294,10 ± 7,00	0,89%	0,091 ± 0,027	31,88%
E39	280,20 ± 3,20	3,05%	0,077 ± 0,016	26,23%
E40	267,10 ± 3,10	0,38%	0,117 ± 0,014	-0,85%
E41	253,80 ± 3,30	6,64%	0,119 ± 0,010	0,85%
E42	267,70 ± 3,50	-1,11%	0,109 ± 0,020	-13,49%

Fonte: elaboração própria.

Estes resultados de d_{AVG} e PDI foram também avaliados estatisticamente, conforme dados de ANOVA apresentados na Tabela 4.18. Assim como para a ANOVA do modelo de d_{AVG} para as medições imediatas, o modelo completo foi significativo estatisticamente, assumindo um intervalo de confiança de 95%, com R^2 de 0,9467 e ajustado de 0,9271 e valor de *lack of fit* considerado estatisticamente significativo. Contudo, novamente o valor do erro puro é baixo, indicando variância pequena entre as triplicatas e elevando o *lack of fit*.

Tabela 4.18 – ANOVA dos parâmetros do MSR para o d_{AVG} após 1h.

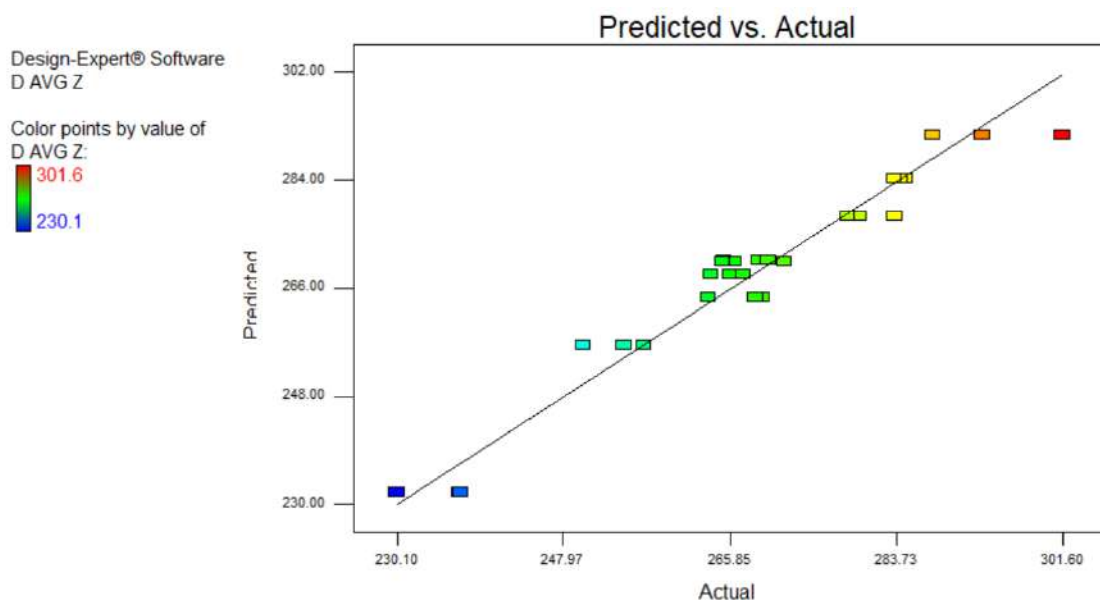
Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de F	p-valor Prob > F
Modelo	7094,58	7	1013,51	48,20	< 0,0001
<i>A – Conc. EFV</i>	1587,63	1	1587,63	75,51	< 0,0001
<i>B – Conc. HPMC</i>	273,37	1	273,37	13,00	0,0019
<i>AB</i>	114,08	1	114,08	5,43	0,0310
<i>A²</i>	2811,30	1	2811,30	133,71	< 0,0001
<i>B²</i>	0,67	1	0,67	0,032	0,8602
<i>A²B</i>	470,60	1	470,60	22,38	0,0001
<i>AB²</i>	443,99	1	443,99	21,12	0,0002
Residual	399,49	19	21,03		
<i>Lack of fit</i>	170,13	1	170,13	13,35	0,0018
<i>Erro puro</i>	229,35	18	12,74		

Fonte: elaboração própria.

A Equação (4.5) representa o modelo que melhor se ajusta aos dados obtidos para a resposta d_{AVG} após 1h, com pequenos desvios esperados nos valores, visualizados graficamente na Figura 4.10.

$$d_{AVG} \text{ após } 1h = 7219,73 - 531,93 * A - 433,35 * B + 31,43 * AB + 4,60 * A^2 + 6,52 * B^2 - 0,18 * A^2B - 0,43 * AB^2 \quad (4.5)$$

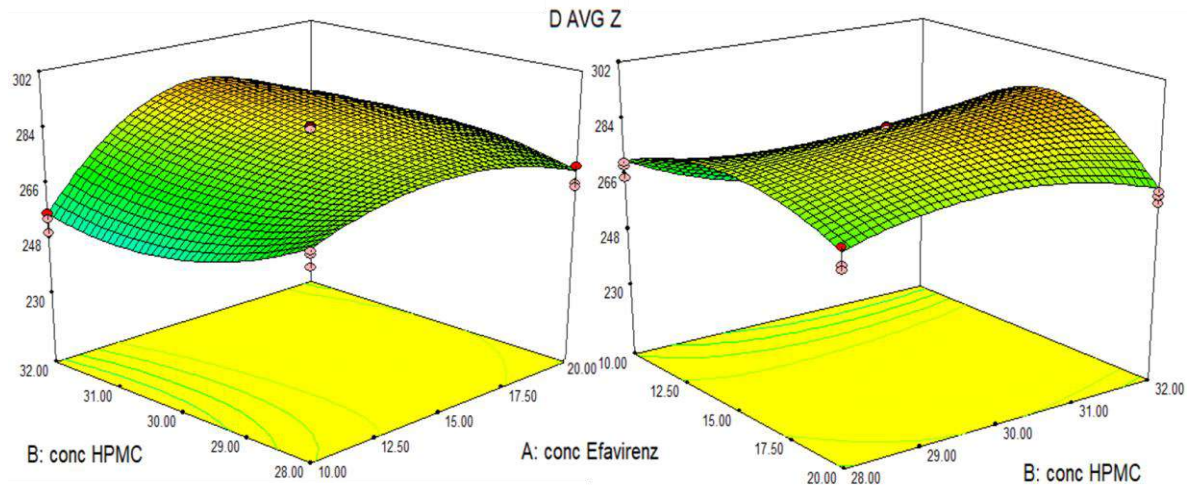
Figura 4.10 – Comparação entre os dados obtidos e os previstos no ajuste de d_{AVG} após 1h.



Fonte: software Design-Expert.

A superfície obtida usando o modelo proposto está apresentada na Figura 4.11, sob dois ângulos diferentes, apenas pela forma de rotação. Novamente, as visualizações são similares às observadas na Figura 4.7, confirmando que pode-se obter nanossuspensões estáveis após 1 hora, adotando maior concentração de EFV e menor concentração de HPMC, obtendo d_{AVG} desejáveis, em torno de 270 nm.

Figura 4.11 – Visualizações da superfície de resposta do modelo obtido para o valor de d_{AVG} após 1h.



Fonte: adaptado do *software* Design-Expert.

A Tabela 4.19 mostra os valores de ANOVA para a resposta PDI medida nas amostras após 1 hora.

Tabela 4.19 – ANOVA dos parâmetros do MSR para o PDI após 1h.

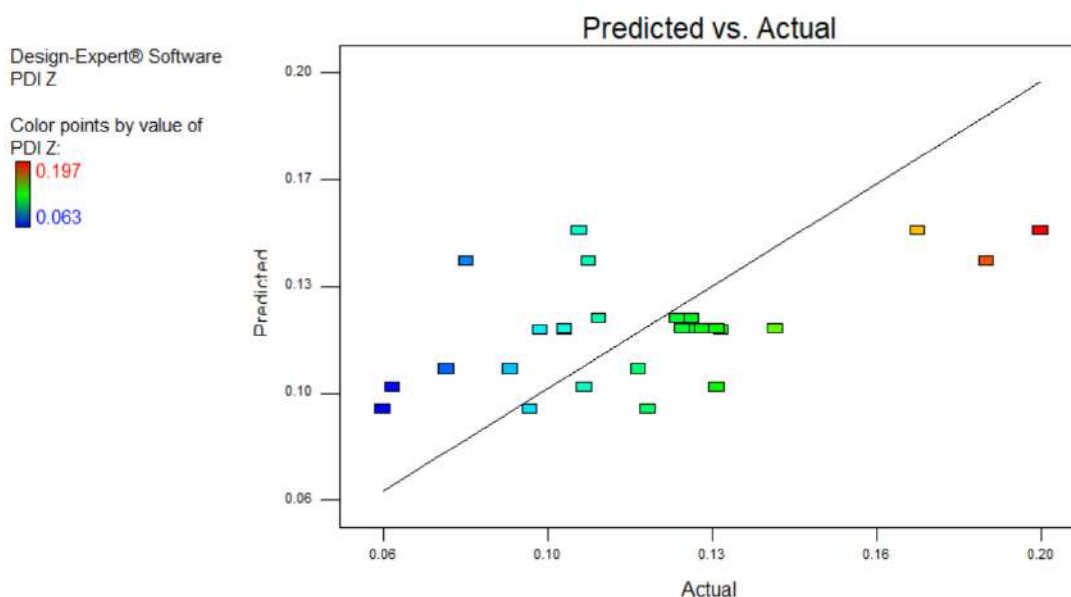
Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	Valor de F	p-valor Prob > F
Modelo	8,34E-03	3	2,78E-03	3,33	0,0371
A – Conc. EFV	3,10E-03	1	3,10E-03	3,71	0,0665
B – Conc. HPMC	2,10E-03	1	2,10E-03	2,52	0,1263
A ²	3,15E-03	1	3,15E-03	3,78	0,0644
Residual	0,019	23	8,34E-04		
Lack of fit	2,29E-03	5	4,57E-04	0,49	0,7815
Erro puro	0,017	18	9,39E-04		

Fonte: elaboração própria.

Assim como para a ANOVA do modelo de PDI medido imediatamente, o modelo foi significativo estatisticamente, com *lack of fit* não significativo estatisticamente, porém com R^2

do modelo obtido (0,3031) e ajustado (0,2122) muito baixos, não permitindo o uso deste modelo para representar os dados experimentais obtidos, situação corroborada visualmente pelo gráfico de comparação entre os valores previstos pelo modelo com os valores reais obtidos experimentalmente (Figura 4.12).

Figura 4.12 – Comparação entre os dados obtidos e os previstos no ajuste de PDI após 1h.



Fonte: *software* Design-Expert.

4.4 OTIMIZAÇÃO NUMÉRICA

Mesmo já tendo sido obtidos resultados satisfatórios atendendo ao objetivo do trabalho, resolveu-se fazer um teste a mais, utilizando os modelos propostos, visando obter uma condição otimizada, envolvendo o emprego da maior concentração de EFV na FO, com a menor quantidade possível de HPMC na FA. Os cálculos foram realizados pelo *software* Design-Expert, por meio do algoritmo simplex, com restrições, critérios e graus de importância baseados nos modelos obtidos no MSR realizado.

A Tabela 4.20 traz os critérios e o resultado do cálculo realizado para os dados obtidos nas medições imediatas dos valores e a Tabela 4.21 traz as mesmas informações, para os dados obtidos nas medições após 1h. Em ambas as tabelas, os valores de d_{AVG} e PDI esperados nos ensaios estão sublinhados e escritos em itálico.

Tabela 4.20 – Restrições e resultado da minimização da concentração de HPMC para os valores de d_{AVG} e PDI obtidos em medição imediata.

Fator/ <i>resposta</i>	Objetivo	Limite inferior	Limite superior	Solução
A – Conc. EFV	= 20%	10%	20%	20%
B – Conc. HPMC	Minimizar	25%	32%	26,36%
d_{AVG} (nm)	Na faixa	220,60	294,70	<u>267,30</u>
PDI	Na faixa	0,046	0,187	<u>0,187</u>

Fonte: elaboração própria.

Tabela 4.21 – Restrições e resultado da minimização da concentração de HPMC para os valores de d_{AVG} e PDI obtidos após 1h.

Fator/ <i>resposta</i>	Objetivo	Limite inferior	Limite superior	Solução
A – Conc. EFV	= 20%	10%	20%	20%
B – Conc. HPMC	Minimizar	25%	32%	26,00%
d_{AVG} (nm)	Na faixa	230,10	301,60	<u>246,40</u>
PDI	Na faixa	0,063	0,200	<u>0,125</u>

Fonte: elaboração própria.

Observa-se que fixando a concentração de EFV em 20%, a concentração mínima de HPMC sugerida envolve o valor de cerca de 26%, independentemente de a medição ter sido imediata ou após 1 hora. Assim, foi executado o ensaio E43, com a concentração de EFV mantida em 20% (p/v), a de HPMC em 26% (%mEFV) e os outros parâmetros mantidos iguais aos adotados a partir do ensaio E23.

A suspensão obtida apresentou aspecto leitoso, sem separação de fases, e visualmente estável, mantendo esse aspecto até o momento da medição após 1h de sua obtenção. A Tabela 4.22 traz os resultados das análises realizadas no Mastersizer e no Zetasizer para a amostra E43, realizadas imediatamente após a obtenção da amostra. Não foi possível, contudo, realizar a análise da distribuição do tamanho de partícula no Mastersizer após 1h, pois infelizmente o equipamento apresentou um erro de funcionamento, mas a amostra foi analisada no Zetasizer.

Tabela 4.22 – Análises da amostra E43 realizadas imediatamente e após 1h.

Ensaio	Mastersizer		Zetasizer	
	D_{50} (μm)	D_{90} (μm)	d_{AVG} (nm)	PDI
E43	$0,08 \pm 0,01$	$0,46 \pm 0,04$	$271,30 \pm 5,00$	$0,124 \pm 0,013$
E43 após 1h	-	-	$280,40 \pm 6,20$	$0,098 \pm 0,038$

Fonte: elaboração própria.

Os valores de d_{AVG} obtidos apresentaram resultados positivos, confirmando a obtenção de uma nanossuspensão, seguindo o comportamento observado na análise de estabilidade das amostras obtidas no MSR.

Em comparação com o valor estimado pelo programa para a medição imediata (267,3 nm), o valor apresentou desvio positivo de 1,5%, mostrando que o modelo conseguiu ser validado para o critério estabelecido; e, no caso da medição após 1h, o desvio foi de 13,8% em relação ao valor esperado (246,4 nm). Isso sugere que o modelo para os valores de d_{AVG} medidos imediatamente ficou melhor ajustado do que o modelo para os valores de d_{AVG} medidos após 1h; de qualquer forma, ambos os valores de d_{AVG} obtidos foram considerados satisfatórios.

Os valores de PDI, por sua vez, ficaram razoavelmente abaixo dos esperados de acordo com os cálculos realizados, apresentando desvios de -33,7% para o valor medido imediatamente e -21,6% para o valor medido após 1h. Esses dados refletem que os modelos para ambos os casos de medição do PDI de fato não tiveram um bom ajuste, mas indicam que os valores obtidos foram menores do que os esperados, o que também é um resultado satisfatório.

4.4.1 Teste exploratório de mudança de solvente

Frente aos resultados positivos obtidos no ensaio E43 e as considerações feitas no subitem 4.1.1 acerca da escolha inicial por acetona como solvente da FO, em detrimento do metanol, resolveu-se fazer um último teste, avaliando o comportamento do ensaio E43, mudando-se o solvente de metanol para acetona, para avaliar a assertividade da decisão assumida de substituição do solvente. Todas as concentrações e parâmetros adotados no ensaio E44, exceto o solvente da FO usado, foram iguais aos do E43. A suspensão formada apresentou aspecto inicialmente leitoso, e a Tabela 4.23 traz o resultado de sua medição tanto pelo Mastersizer, quanto pelo Zetasizer.

Tabela 4.23 – Análises da amostra E44 realizadas no Mastersizer e no Zetasizer.

Ensaio	Mastersizer		Zetasizer	
	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)	d _{AVG} (nm)	PDI
E44	0,14 ± 0,06	1,61 ± 0,10	313,40 ± 8,80	0,141 ± 0,013

Fonte: elaboração própria.

Em comparação à amostra E43, o aspecto inicial foi o mesmo, mas todos os valores de tamanho de partícula obtidos, assim como o valor do PDI, se mostraram superiores. Entretanto, após alguns minutos de obtenção da amostra E44, foi observado o mesmo processo de

gelificação relatado em outros ensaios (E04, E11, E12, E17 e E18), não sendo possível realizar qualquer análise após 1h. Observa-se na Figura 4.13 que o gel formado na amostra E44 adere à parede do béquer, mesmo quando este é inclinado.

Figura 4.13 – Aspecto visual da amostra E44 1h após sua obtenção.



Fonte: arquivo pessoal.

Pode-se inferir que, para as condições adotadas no ensaio E43, a acetona facilitou o processo de gelificação do HPMC, que só havia sido observado quando em associação com o LSS, confirmando a assertividade na substituição da mesma para a condução deste trabalho. Em seu estudo, Mugheirbi e colaboradores (2018) estudaram a solubilidade do HPMC em diferentes álcoois, e identificaram uma relação, mesmo que não linear, entre o aumento da solubilidade e o aumento da polaridade do álcool avaliado. Segundo Smallwood (1996), a polaridade relativa do metanol é de cerca de 0,762, mais que o dobro da polaridade da acetona (0,355). Ou seja, a mudança na polaridade do meio em que o HPMC está dissolvido pode influenciar o processo de gelificação do polímero. Contudo, seriam necessários mais estudos sobre esse efeito nos sistemas usados neste trabalho, a fim de se confirmar essa hipótese. Além desta opção interessante para desenvolvimento de trabalhos futuros, a busca por solventes biocompatíveis deve ser considerada.

5 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a metodologia proposta neste trabalho, com o emprego de planejamento de experimentos do tipo PFC e MSR, permitiu a identificação dos fatores relevantes e de seus respectivos níveis para o estabelecimento das condições operacionais favoráveis de obtenção de nanossuspensões de EFV.

Os modelos gerados para previsão do diâmetro médio de partícula (d_{AVG}) foram validados sendo possível estabelecer uma condição otimizada que produziu resultados satisfatórios maximizando a concentração de EFV e minimizando a concentração de estabilizante, se utilizando de 20% (p/v) de EFV na FO e 26% de HPMC na FA fornecendo um diâmetro médio de partícula (d_{AVG}) de $271,3 \pm 5,0$ nm e um índice de polidispersão (PDI) de $0,124 + 0,013$, mostrando ser promissor o emprego desta metodologia. Confirmando assim, o atendimento ao objetivo geral proposto de fornecer um procedimento experimental para a obtenção de uma nanossuspensão estável de EFV por meio da metodologia *bottom-up*.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- a) Aprofundar a análise sobre os motivos que provocaram a gelificação observada com o uso de acetona nas condições do ensaio E44;
- b) Verificar se o uso de estabilizantes de carga e estéricos diferentes permitem a obtenção de amostras estáveis, com menor formação de espuma e sem ocorrência de gelificação;
- c) Avaliar a viabilidade de uso da bomba peristáltica e do ultra-turrax nas condições ótimas encontradas;
- d) Avaliar a viabilidade de uso de solventes biocompatíveis em substituição ao metanol;
- e) Levar as suspensões obtidas nas condições ótimas a uma etapa de secagem, a fim de se analisar a morfologia das partículas obtidas;
- f) Realizar análises de potencial zeta e sedimentação das suspensões obtidas, para aprofundar os dados de estabilidade das mesmas;
- g) Fazer ensaios de dissolução das partículas obtidas;
- h) Estudar a viabilidade de escalonamento do processo de obtenção das nanossuspensões, acoplado a uma etapa de secagem.

6 REFERÊNCIAS

AGARWAL, A. et al. Stable nanocolloids of poorly soluble drugs with high drug content prepared using the combination of sonication and layer-by-layer technology. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 3, p. 255–260, jun. 2008.

ALMEIDA, M. O. Q. **Avaliação das Influências de Variáveis Composicionais na Formulação de Óleos Lubrificantes Industriais Usando Design de Experimentos**. 2019. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2019.

ANDERSON, M. J. DOE FAQ Alert. *In*: Statistics Made Easy. **Statistics Made Easy Blog**. Minneapolis, EUA, jun. 2010. Disponível em: <<https://cdnm.statease.com/news/faqalert10-06.html>>. Acesso em: 23/11/2022.

ANVISA. **Consultas** – ANVISA. Efavirenz. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/q/?substancia=20685>>. Acesso em: 20 out. 2022

AVANTOR. **Ficha de informação de segurança de produto químico – FISPQ**. Metanol. Disponível em <https://www.avantorsciences.com/stibo/search/sds000005004_ie_6n.pdf>. Acesso em: 07/10/2022.

BARRÉ-SINOUSI, F. et al. Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 868–871, 20 mai. 1983.

BEDOR, D. C. G. et al. Characterization, *in vitro* dissolution, and pharmacokinetics of different batches of efavirenz raw materials. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 47, n. 5, p. 725–734, 4 mai. 2021.

BENNET, R. C. Crystallization from solution. *In*: PERRY, R. H.; GREEN, D. W.; MALONEY, J. O. Perry's Chemical Engineers' Handbook. 7 ed. EUA: McGraw-Hill, 1997. p. 1473-1493.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis: Tratamento**. Brasília: Ministério da Saúde, 25 abr. 2022. Disponível em <<https://www.gov.br/aids/pt-br/assuntos/hiv-aids/tratamento>>. Acesso em: 13/06/2022.

BURGER, D. et al. Interpatient variability in the pharmacokinetics of the HIV non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz: the effect of gender, race, and CYP2B6 polymorphism. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 61, n. 2, p. 148–154, fev. 2006.

CDC. Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) – United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 31, n. 37, p. 507-514, set. 1982.

CHEMSRC. **Efavirenz**. Disponível em: <https://www.chemsrc.com/en/cas/154598-52-4_1026743.html>. Acesso em 28/05/2022.

CHIAPPETTA, D. A. et al. Intranasal administration of antiretroviral-loaded micelles for anatomical targeting to the brain in HIV. **Nanomedicine**, v. 8, n. 2, p. 223–237, fev. 2013.

COCUZZA, A. J. et al. Synthesis and Evaluation of Efavirenz (Sustiva™) Analogues as HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors: Replacement of the Cyclopropylacetylene Side Chain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 9, p. 1177–1179, mai. 2001.

DANAEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 18 mai. 2018.

EKPENYONG, M. G. et al. Plackett-Burman Design and Response Surface Optimization of Medium Trace Nutrients for Glycolipopeptide Biosurfactant Production. **Iranian Biomedical Journal**, v. 21, n. 4, p. 249–260, 1 jul. 2017.

EVIR (EFAVIRENZ): solução. Responsável técnico José Carlos Módolo. Itapira: CRISTÁLIA – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, 2020. 1 bula de remédio. 9 p. Disponível em: <https://www.cristalia.com.br/arquivos_medicamentos/232/Evir_Bula_Paciente.pdf>. Acesso em: 17/08/2022.

FANDARUFF, C. et al. Correlation between microstructure and bioequivalence in Anti-HIV Drug Efavirenz. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 91, p. 52–58, abr. 2015.

FU, X. et al. Top-down fabrication of shape-controlled, monodisperse nanoparticles for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 132, p. 169–187, jul. 2018.

GAO, L. et al. Drug nanocrystals: In vivo performances. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 3, p. 418–430, jun. 2012.

HARI, B. N. V. et al. Engineered polymeric nanoparticles of Efavirenz: Dissolution enhancement through particle size reduction. **Chemical Engineering Science**, v. 155, p. 366–375, nov. 2016.

HARYANTO, B. et al. Foam capacity and stability of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) on the presence of contaminant coffee and Cd ions in solution. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 309, p. 012042, fev. 2018.

IKA. **IKA ULTRA-TURRAX T25 digital**: Operating instructions. 2020. Disponível em: <<https://www.ika.com/en/Products-Lab-Eq/Dispersers-Homogenizer-csp-177/T-25-digital-ULTRA-TURRAX-Downloads-cpdl-3725000/>>. Acesso em: 25/10/2022.

JAKUBOWSKA, E.; LULEK, J. The application of freeze-drying as a production method of drug nanocrystals and solid dispersions – A review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 62, p. 102357, abr. 2021.

JIANG, N. et al. Role of salts in performance of foam stabilized with sodium dodecyl sulfate. **Chemical Engineering Science**, v. 216, p. 115474, abr. 2020.

JOSHI, K. et al. Nanocrystallization: An Emerging Technology to Enhance the Bioavailability of Poorly Soluble Drugs. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 7, n. 4, p. 259–278, 24 set. 2019.

JOSHI, S. C. Sol-Gel Behavior of Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC) in Ionic Media Including Drug Release. **Materials**, v. 4, n. 10, p. 1861–1905, 24 out. 2011.

KARLSSON, K. et al. Foaming behavior of water-soluble cellulose derivatives: hydroxypropyl methylcellulose and ethyl hydroxyethyl cellulose. **Cellulose**, v. 22, n. 4, p. 2651–2664, ago. 2015.

KECK, C.; MULLER, R. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 62, n. 1, p. 3–16, jan. 2006.

KUMAR, R. et al. Solid lipid nanoparticles for the controlled delivery of poorly water soluble non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 40, p. 686–696, jan. 2018.

KUMAR, R.; SIRIL, P. F. Controlling the size and morphology of griseofulvin nanoparticles using polymeric stabilizers by evaporation-assisted solvent–antisolvent interaction method. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 6, p. 256, jun. 2015.

KUMAR, R.; SIRIL, P. F. Drop-by-drop solvent hot antisolvent interaction method for engineering nanocrystallization of sulfamethoxazole to enhanced water solubility and bioavailability. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, p. 101359, fev. 2020.

LIVERSIDGE, G. G.; CUNDY, K. C. Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 125, n. 1, p. 91–97, out. 1995.

LUIZ, M. T. et al. Design of experiments (DoE) to develop and to optimize nanoparticles as drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 165, p. 127–148, ago. 2021.

MATOS, A. **Farmanguinhos atua no enfrentamento da Aids**. Disponível em: <<https://www.far.fiocruz.br/2021/12/farmanguinhos-atua-no-enfrentamento-da-aids/>>. Acesso em: 09/06/2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico HIV/AIDS 2020**. dez. 2020. 68 p. Disponível em: <https://www.gov.br/aids/pt-br/centrais-de-conteudo/boletins-epidemiologicos/2020/hiv-aids/boletim_hiv_aids_2020_com_marcas.pdf>. Acesso em: 10/06/2022.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. Eighth edition ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc, 2013b.

MUGHEIRBI, N. A. et al. Phase Behavior of Drug-Hydroxypropyl Methylcellulose Amorphous Solid Dispersions Produced from Various Solvent Systems: Mechanistic Understanding of the Role of Polymer using Experimental and Theoretical Methods. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15, n. 8, p. 3236–3251, 6 ago. 2018.

NAGARWAL, R. C. et al. Nanocrystal Technology in the Delivery of Poorly Soluble Drugs: An Overview. **Current Drug Delivery**, v. 8, n. 4, p. 398–406, 1 jul. 2011.

NIST; SEMATECH. **e-Handbook of Statistical Methods**. EUA: NIST, 2002. Disponível em: <<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>>. Acesso em: 02/09/2022.

NITISH, B. et al. Nanocrystals: A review. **International Journal of Biosciences**, v. 16, n. 4, p. 331-344, 2020.

OH, I. K.; LEE, S. Utilization of foam structured hydroxypropyl methylcellulose for oleogels and their application as a solid fat replacer in muffins. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 796–802, abr. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **HIV**. Disponível em: <<https://www.who.int/data/gho/data/themes/hiv-aids>>. Acesso em: 14/08/2022.

PANDEY, S. K. et al. Controlled release of drug and better bioavailability using poly(lactic acid-co-glycolic acid) nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 99–110, ago. 2016.

PANDYA, P. et al. Nanocarriers based oral lymphatic drug targeting: Strategic bioavailability enhancement approaches. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 64, p. 102585, ago. 2021.

PELTONEN, L.; HIRVONEN, J. Drug nanocrystals – Versatile option for formulation of poorly soluble materials. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 537, n. 1–2, p. 73–83, fev. 2018.

QSONICA. **Sonicator Ultrasonic Processor Part No. Q700**: Operation Manual. 2016. Disponível em: <<https://www.manualslib.com/manual/1351024/Qsonica-Sonicator-Q700.html>>. Acesso em: 07/11/2022.

RAFFI, F.; POZNIAK, A. L.; WAINBERG, M. A. Has the time come to abandon efavirenz for first-line antiretroviral therapy? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 7, p. 1742–1747, 1 jul. 2014.

RANJANI, G. I. S.; RAMAMURTHY, K. Analysis of the Foam Generated Using Surfactant Sodium Lauryl Sulfate. **International Journal of Concrete Structures and Materials**, v. 4, n. 1, p. 55–62, 30 jun. 2010.

REDE, K.; FELICIJAN, T.; BOGATAJ, M. Exploring the unexpected behavior of HPMC matrix tablets in dissolution media with SDS. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 66, p. 102801, dez. 2021.

SARTORI, G. J. **Desenvolvimento de nanocristais de efavirenz para incremento do perfil de dissolução**. 2016. 99 f. Dissertação (Mestrado em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica) - Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz.

SARTORI, G. J.; PRADO, L. D.; ROCHA, H. V. A. Efavirenz dissolution enhancement V - A combined top down/bottom up approach on nanocrystals formulation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, 14 p., 2022.

SAVAGE, A. C. et al. Improving maraviroc oral bioavailability by formation of solid drug nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 138, p. 30–36, mai. 2019.

SEAGER, R. J. et al. Solid dissolution in a fluid solvent is characterized by the interplay of surface area-dependent diffusion and physical fragmentation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 7711, dez. 2018.

SHAKER, M. A. et al. Enhancement of atorvastatin oral bioavailability via encapsulation in polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 592, p. 120077, jan. 2021.

SHEGOKAR, R.; MÜLLER, R. H. Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 399, n. 1–2, p. 129–139, out. 2010.

SHEN, H. et al. Enhanced oral bioavailability of a cancer preventive agent (SR13668) by employing polymeric nanoparticles with high drug loading. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 10, p. 3877–3885, out. 2012.

SHI, Y. et al. Experimental and Mathematical Studies on the Drug Release Properties of Aspirin Loaded Chitosan Nanoparticles. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–8, 2014.

SINGH, S. K.; LILLARD, J. W.; SINGH, R. Reversal of drug resistance by planetary ball milled (PBM) nanoparticle loaded with resveratrol and docetaxel in prostate cancer. **Cancer Letters**, v. 427, p. 49–62, jul. 2018.

SINHA, B.; MÜLLER, R. H.; MÖSCHWITZER, J. P. Bottom-up approaches for preparing drug nanocrystals: Formulations and factors affecting particle size. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 453, n. 1, p. 126–141, ago. 2013.

SMALLWOOD, I. M. Acetone. Em: **Handbook of Organic Solvent Properties**. 1 ed. EUA: Wiley, 1996, p. 171–173.

SMALLWOOD, I. M. Methanol. Em: **Handbook of Organic Solvent Properties**. 1 ed. EUA: Wiley, 1996, p. 61–63.

SPITZER, D. et al. Continuous and reactive nanocrystallization: New concepts and processes for dual-use advances. **Comptes Rendus Chimie**, v. 20, n. 4, p. 339–345, abr. 2017.

STEPANOV, V. et al. Production of Nanocrystalline RDX by Rapid Expansion of Supercritical Solutions. **Propellants, Explosives, Pyrotechnics**, v. 30, n. 3, p. 178–183, jun. 2005.

SU, J. C. et al. Effect of SDS on the gelation of hydroxypropylmethylcellulose hydrogels. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 93, n. 2, p. 495–501, ago. 2008.

SYLVESTRE, J.-P. et al. Nanonization of megestrol acetate by laser fragmentation in aqueous milieu. **Journal of Controlled Release**, v. 149, n. 3, p. 273–280, fev. 2011.

TEDIA. **Ficha de informação de segurança de produto químico – FISPQ**. Acetona. Disponível em: <<http://reports.tedia.com/msds/M0003.pdf>>. Acesso em: 26/10/2022.

TUOMELA, A. et al. Production, applications and in vivo fate of drug nanocrystals. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 34, p. 21–31, ago. 2016.

WANG, H. et al. Effect of Temperature on Foaming Ability and Foam Stability of Typical Surfactants Used for Foaming Agent. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 20, n. 3, p. 615–622, mai. 2017.

WANG, H. et al. Association between the physical stability of flurbiprofen suspension and the interaction of HPMC/SDS. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 63–71, jan. 2018.

WITTGREN, B.; STEFANSSON, M.; PORSCH, B. Interactions between sodium dodecyl sulphate and non-ionic cellulose derivatives studied by size exclusion chromatography with online multi-angle light scattering and refractometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1082, n. 2, p. 166–175, ago. 2005.

WONG, G; COLLINS, C. C. Dissolution Testing. *In*: ADEYEYE, M. C.; BRITTAIN, H. G. **Preformulation in Solid Dosage Form Development**. EUA: Informa Healthcare. p. 477-556.

WRIGHT, S. J. Simplex method: linear programming. **Britannica**, 2022. Disponível em: <<https://www.britannica.com/topic/simplex-method>>. Acesso em: 01/12/2022.

APÊNDICE A – DADOS DE MEDIÇÃO DO MASTERSIZER E DO ZETASIZER

A Tabela A.1 traz a relação de todas as medições realizadas no Mastersizer para cada amostra analisada neste trabalho; a Tabela A.2, as medições realizadas no Zetasizer com os valores expressos como disponibilizados diretamente nos equipamentos. Os valores exibidos nas Tabelas do item 4 (Resultados) correspondem aos valores em negrito, já com os desvios-padrão calculados.

Tabela A.1 – Distribuições de tamanhos de partícula de todas as medições realizadas pelo Mastersizer.

Ensaio	Medição	D ₁₀ (µm)	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)
E04	1	1,12	2,51	7,2
	2	1,12	2,51	6,51
	3	1,13	2,59	7,56
	4	1,13	2,63	8,85
	5	1,13	2,63	8,34
	Média	1,13 ± 0,01	2,58 ± 0,06	7,95 ± 0,92
E05	1	1,33	2,98	5,96
	2	1,34	3,04	6,1
	3	1,34	3,06	6,13
	Média	1,34 ± 0,01	3,03 ± 0,04	6,06 ± 0,09
E06	1	2,43	33,9	1796
	2	1,49	20,5	1089
	3	0,958	17,1	693,5
	Média	1,74 ± 0,75	22,5 ± 8,9	1200 ± 559
E07	1	3,31	24,9	52,8
	2	3,24	24	50,4
	3	3,28	23,8	51,4
	Média	3,28 ± 0,04	24,2 ± 0,6	51,5 ± 1,2
E08	1	55,5	103	176
	2	66	113	181
	3	74,7	120	183
	Média	64,6 ± 9,6	112 ± 9	181 ± 4
E09	1	0,0338	0,265	67,3
	2	0,0345	0,287	73,8
	3	0,0363	0,351	92,9
	Média	0,0348 ± 0,0013	0,297 ± 0,045	78,1 ± 13,3
E10	1	7,41	71,3	131
	2	7,51	68,4	125
	3	7,74	66,3	121
	Média	7,55 ± 0,17	68,6 ± 2,5	125 ± 5
E11	1	11,3	37,5	90,7
	2	11,4	37,5	90,5
	3	11,5	37,1	87,6
	Média	11,4 ± 0,1	37,4 ± 1,3	89,6 ± 3,4

Fonte: elaboração própria.

Tabela A.1 (continuação) – Distribuições de tamanhos de partícula de todas as medições realizadas pelo Mastersizer.

Ensaio	Medição	D ₁₀ (µm)	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)
E12	1	0,0607	54,1	801
	2	0,102	83,9	1450
	3	0,229	95,1	2070
	Média	0,0961 ± 0,0877	77,7 ± 21,2	1530 ± 635
E13	1	10,5	47,7	93
	2	11,8	47,7	93,8
	3	12,7	47,7	94,9
	Média	11,7 ± 1,1	47,7 ± 0,0	93,9 ± 1,0
E14	1	0,0294	15,5	1320
	2	0,0464	35,2	2170
	3	0,0707	51,6	2300
	Média	0,0406 ± 0,0208	34,1 ± 18,1	2080 ± 532
E15	1	0,0323	13,7	1610
	2	0,0396	22,7	1440
	3	0,0528	28,5	1550
	Média	0,0391 ± 0,0104	21,7 ± 7,5	1530 ± 86
E16	1	0,0429	123,9	2270
	2	0,0439	54,3	1190
	3	0,0722	347	1480
	Média	0,0492 ± 0,0166	175 ± 153	1700 ± 559
E19	1	1,98	155	2020
	2	1,44	550	1950
	3	2,07	598	1960
	Média	1,83 ± 0,34	435 ± 243	1970 ± 38
E20	1	0,0279	0,147	36,6
	2	0,0294	0,181	39,1
	3	0,0319	0,255	76,6
	Média	0,0296 ± 0,0020	0,183 ± 0,055	52 ± 22
E21	1	0,0239	0,0943	10,6
	2	0,0255	0,117	11,5
	3	0,0283	0,177	12,9
	Média	0,0256 ± 0,0022	0,119 ± 0,043	11,7 ± 1,2
E22	1	2,55	13,2	43,1
	2	4	14,6	49,3
	3	4,94	16,2	58,4
	Média	4,03 ± 1,20	14,6 ± 1,5	49,4 ± 7,7
E23	1	0,0256	0,11	0,915
	2	0,0264	0,122	1,14
	3	0,0274	0,141	1,33
	Média	0,0264 ± 0,0009	0,123 ± 0,016	1,15 ± 0,21
E24	1	0,272	4,64	57,1
	2	0,6	7,71	64,9
	3	0,783	8,21	52,2
	Média	0,507 ± 0,259	6,78 ± 1,93	57,4 ± 6,4

Fonte: elaboração própria.

Tabela A.1 (continuação) – Distribuições de tamanhos de partícula de todas as medições realizadas pelo Mastersizer.

Ensaio	Medição	D ₁₀ (µm)	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)
E25	1	0,0264	0,114	0,681
	2	0,0266	0,119	0,851
	3	0,0272	0,13	1,02
	Média	0,0267 ± 0,0004	0,120 ± 0,008	0,862 ± 0,170
E26	1	0,098	6,13	65,8
	2	0,529	14,4	83,1
	3	0,712	19,4	89,2
	Média	0,443 ± 0,315	12,4 ± 6,7	78,2 ± 12,1
E27	1	0,023	0,0858	0,663
	2	0,0237	0,0952	0,894
	3	0,0245	0,108	1,08
	Média	0,0237 ± 0,0008	0,0952 ± 0,0111	0,89 ± 0,21
E28	1	0,025	0,0939	0,487
	2	0,0236	0,0891	0,606
	3	0,0239	0,0931	0,809
	Média	0,0241 ± 0,0007	0,092 ± 0,003	0,616 ± 0,163
E29	1	0,0237	0,0942	0,706
	2	0,0246	0,106	0,823
	3	0,0257	0,123	0,943
	Média	0,0246 ± 0,0010	0,106 ± 0,014	0,832 ± 0,119
E30	1	0,0374	0,178	0,78
	2	0,0368	0,195	1,33
	3	0,0374	0,223	1,66
	Média	0,0372 ± 0,0003	0,196 ± 0,023	1,29 ± 0,44
E31	1	0,0236	0,0918	0,71
	2	0,0239	0,0963	0,808
	3	0,0242	0,101	0,888
	Média	0,0239 ± 0,0003	0,0962 ± 0,0046	0,808 ± 0,089
E32	1	0,025	0,102	0,594
	2	0,0252	0,106	0,705
	3	0,0253	0,11	0,816
	Média	0,0252 ± 0,0002	0,106 ± 0,004	0,705 ± 0,111
E33	1	0,0234	0,0814	0,391
	2	0,0221	0,0759	0,417
	3	0,0234	0,0831	0,527
	4	0,0234	0,0836	0,616
	Média	0,0231 ± 0,0007	0,0809 ± 0,0035	0,490 ± 0,104
E34	1	0,122	0,416	1,26
	2	0,144	0,461	1,3
	3	0,181	0,531	1,32
	Média	0,148 ± 0,030	0,472 ± 0,058	1,29 ± 0,03

Fonte: elaboração própria.

Tabela A.1 (continuação) – Distribuições de tamanhos de partícula de todas as medições realizadas pelo Mastersizer.

Ensaio	Medição	D ₁₀ (µm)	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)
E35	1	0,0314	0,158	0,984
	2	0,0304	0,159	1,18
	3	0,0303	0,167	1,32
	Média	0,0307 ± 0,0006	0,161 ± 0,005	1,19 ± 0,17
E36	1	0,0289	0,138	0,517
	2	0,0289	0,141	0,546
	3	0,0287	0,143	0,578
	Média	0,0289 ± 0,0001	0,141 ± 0,003	0,547 ± 0,031
E37	1	0,0301	0,148	0,777
	2	0,0303	0,163	0,885
	Média	0,0302 ± 0,0001	0,155 ± 0,011	0,833 ± 0,076
E38	1	0,0321	0,188	0,793
	2	0,027	0,14	0,767
	Média	0,0292 ± 0,0036	0,164 ± 0,034	0,780 ± 0,018
E39	1	0,0356	0,324	3,73
	2	0,0355	0,354	3,65
	3	0,036	0,382	3,53
	Média	0,0357 ± 0,0003	0,354 ± 0,029	3,64 ± 0,10
E40	1	0,0239	0,109	2,82
	2	0,0206	0,0654	1,66
	Média	0,022 ± 0,0023	0,0805 ± 0,0308	2,21 ± 0,82
E41	1	0,0234	0,0897	0,494
	2	0,0229	0,0863	0,538
	Média	0,0231 ± 0,0004	0,0880 ± 0,0024	0,516 ± 0,031
E42	1	0,0245	0,111	0,65
	2	0,0245	0,113	0,673
	Média	0,0245 ± 0,0000	0,112 ± 0,001	0,662 ± 0,016
E43	1	0,0231	0,0838	0,429
	2	0,0231	0,0837	0,462
	3	0,023	0,0835	0,504
	Média	0,0231 ± 0,0001	0,0837 ± 0,0002	0,462 ± 0,038
E44	1	0,0237	0,101	1,49
	2	0,025	0,175	1,66
	3	0,0249	0,227	1,66
	Média	0,0245 ± 0,0007	0,138 ± 0,063	1,61 ± 0,10
E32 após 1h	1	0,0271	0,116	0,642
	2	0,027	0,119	0,731
	Média	0,0271 ± 0,0001	0,117 ± 0,002	0,685 ± 0,063
E33 após 1h	1	0,0235	0,0851	0,576
	2	0,0235	0,0856	0,661
	3	0,0219	0,0767	0,664
	Média	0,0231 ± 0,0001	0,0824 ± 0,0050	0,633 ± 0,050

Fonte: elaboração própria.

Tabela A.1 (continuação) – Distribuições de tamanhos de partícula de todas as medições realizadas pelo Mastersizer.

Ensaio	Medição	D ₁₀ (µm)	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)
E34 após 1h	1	0,0341	0,173	0,72
	2	0,0409	0,257	0,982
	Média	0,022 ± 0,0023	0,208 ± 0,059	0,862 ± 0,185
E35 após 1h	1	0,0328	0,176	0,764
	2	0,0314	0,175	0,855
	Média	0,0231 ± 0,0004	0,175 ± 0,001	0,811 ± 0,064
E36 após 1h	1	0,0261	0,129	1,14
	2	0,0248	0,114	0,975
	Média	0,0245 ± 0,0000	0,121 ± 0,011	1,05 ± 0,12
E37 após 1h	1	0,0292	0,146	0,876
	2	0,0281	0,141	1,1
	3	0,027	0,135	1,2
	Média	0,0307 ± 0,0006	0,141 ± 0,006	1,07 ± 0,17
E38 após 1h	1	0,0279	0,127	0,592
	2	0,0268	0,12	0,647
	3	0,0259	0,115	0,69
	Média	0,0289 ± 0,0001	0,121 ± 0,006	0,641 ± 0,049
E39 após 1h	1	0,047	0,218	0,699
	2	0,0282	0,147	0,738
	Média	0,0245 ± 0,0000	0,185 ± 0,050	0,719 ± 0,028
E40 após 1h	1	0,0244	0,0949	0,487
	2	0,0242	0,0944	0,539
	3	0,0242	0,0951	0,624
	Média	0,0307 ± 0,0006	0,0948 ± 0,0004	0,544 ± 0,069
E41 após 1h	1	0,0234	0,089	0,472
	2	0,0231	0,0874	0,488
	3	0,0228	0,0846	0,497
	Média	0,0307 ± 0,0006	0,087 ± 0,002	0,486 ± 0,013
E42 após 1h	1	0,0252	0,104	0,531
	2	0,025	0,103	0,574
	3	0,0248	0,102	0,612
	Média	0,0289 ± 0,0001	0,103 ± 0,001	0,571 ± 0,041

Fonte: elaboração própria.

Tabela A.2 – Diâmetros médios de partícula e PDIs de todas as medições realizadas pelo Zetasizer.

Ensaio	Medição	d _{AVG} (nm)	PDI
E23	1	245,1	0,218
	2	247,3	0,131
	3	250,7	0,162
	Média	247,7 ± 2,8	0,170 ± 0,044
E25	1	253	0,128
	2	246,3	0,107
	3	244,9	0,093
	Média	248,0 ± 4,3	0,109 ± 0,018
E26	1	293,7	0,067
	2	286,2	0,13
	3	291,4	0,122
	Média	290,4 ± 3,8	0,106 ± 0,034
E27	1	223,8	0,17
	2	225,2	0,151
	3	231,6	0,166
	Média	226,9 ± 4,2	0,162 ± 0,010
E28	1	235,2	0,07
	2	236,7	0,077
	3	234,5	0,104
	Média	235,4 ± 1,1	0,083 ± 0,018
E29	1	304,3	0,138
	2	323	0,218
	3	298,1	0,187
	Média	308,5 ± 13,0	0,181 ± 0,040
E30	1	278,4	0,104
	2	279,5	0,081
	3	270,9	0,127
	Média	276,3 ± 4,7	0,104 ± 0,023
E31	1	226,6	0,127
	2	233,1	0,102
	3	235,2	0,065
	Média	231,7 ± 4,5	0,098 ± 0,031
E32	1	252,1	0,187
	2	254,9	0,097
	3	256,3	0,116
	Média	254,4 ± 2,1	0,134 ± 0,047
E33	1	221,6	0,071
	2	224,2	0,103
	3	220,6	0,123
	Média	222,1 ± 1,9	0,099 ± 0,026
E34	1	277,1	0,102
	2	268,8	0,152
	3	281,1	0,088
	Média	275,7 ± 6,3	0,114 ± 0,034

Fonte: elaboração própria.

Tabela A.2 (continuação) – Diâmetros médios de partícula e PDIs de todas as medições realizadas pelo Zetasizer.

Ensaio	Medição	d _{AVG} (nm)	PDI
E35	1	265,1	0,108
	2	273,7	0,083
	3	270,8	0,131
	Média	269,9 ± 4,4	0,107 ± 0,024
E36	1	262,5	0,068
	2	267	0,085
	3	264,6	0,047
	Média	264,7 ± 2,3	0,067 ± 0,019
E37	1	285,2	0,177
	2	282,1	0,089
	3	277,9	0,074
	Média	281,7 ± 3,7	0,113 ± 0,056
E38	1	288,3	0,052
	2	294,7	0,073
	3	291,5	0,083
	Média	291,5 ± 3,2	0,069 ± 0,016
E39	1	272,7	0,078
	2	275,8	0,046
	3	267,2	0,058
	Média	271,9 ± 4,4	0,061 ± 0,016
E40	1	273,0	0,141
	2	260,7	0,11
	3	264,5	0,104
	Média	266,1 ± 6,3	0,118 ± 0,020
E41	1	235,8	0,114
	2	242,3	0,15
	3	235,8	0,091
	Média	238,0 ± 3,8	0,118 ± 0,030
E42	1	275,7	0,094
	2	274,1	0,152
	3	262,2	0,132
	Média	270,7 ± 7,4	0,126 ± 0,029
E43	1	267,6	0,132
	2	269,2	0,131
	3	276,9	0,109
	Média	271,3 ± 5,0	0,124 ± 0,013
E44	1	308	0,128
	2	323,6	0,142
	3	308,6	0,154
	Média	313,4 ± 8,8	0,141 ± 0,013
E32 após 1h	1	263,8	0,131
	2	266	0,104
	3	267,3	0,065
	Média	265,7 ± 1,8	0,100 ± 0,033

Fonte: elaboração própria.

Tabela A.2 (continuação) – Diâmetros médios de partícula e PDIs de todas as medições realizadas pelo Zetasizer.

Ensaio	Medição	d _{AVG} (nm)	PDI
E33 após 1h	1	236,8	0,103
	2	230,1	0,197
	3	237	0,172
	Média	234,6 ± 3,9	0,157 ± 0,049
E34 após 1h	1	279,7	0,128
	2	278,5	0,143
	3	283,6	0,131
	Média	280,6 ± 2,7	0,134 ± 0,008
E35 após 1h	1	284,7	0,115
	2	284,2	0,089
	3	283,5	0,076
	Média	284,1 ± 0,6	0,093 ± 0,020
E36 após 1h	1	265,2	0,186
	2	269	0,105
	3	270	0,08
	Média	268,1 ± 2,5	0,124 ± 0,055
E37 após 1h	1	289,6	0,072
	2	290	0,124
	3	289,8	0,082
	Média	289,8 ± 0,2	0,093 ± 0,028
E38 após 1h	1	301,6	0,063
	2	293	0,117
	3	287,7	0,093
	Média	294,1 ± 7,0	0,091 ± 0,027
E39 após 1h	1	281,9	0,067
	2	276,6	0,069
	3	282,3	0,095
	Média	280,2 ± 3,2	0,077 ± 0,016
E40 após 1h	1	269,3	0,126
	2	268,6	0,124
	3	263,6	0,1
	Média	267,1 ± 3,1	0,117 ± 0,014
E41 após 1h	1	250,1	0,126
	2	256,6	0,107
	3	254,5	0,123
	Média	253,8 ± 3,3	0,119 ± 0,010
E42 após 1h	1	266,3	0,132
	2	271,7	0,095
	3	265,1	0,1
	Média	267,7 ± 3,5	0,109 ± 0,020
E43 após 1h	1	273,9	0,141
	2	281,2	0,071
	3	286,2	0,082
	Média	280,4 ± 6,2	0,098 ± 0,038

Fonte: elaboração própria.

APÊNDICE B – CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA BOMBA PERISTÁLTICA

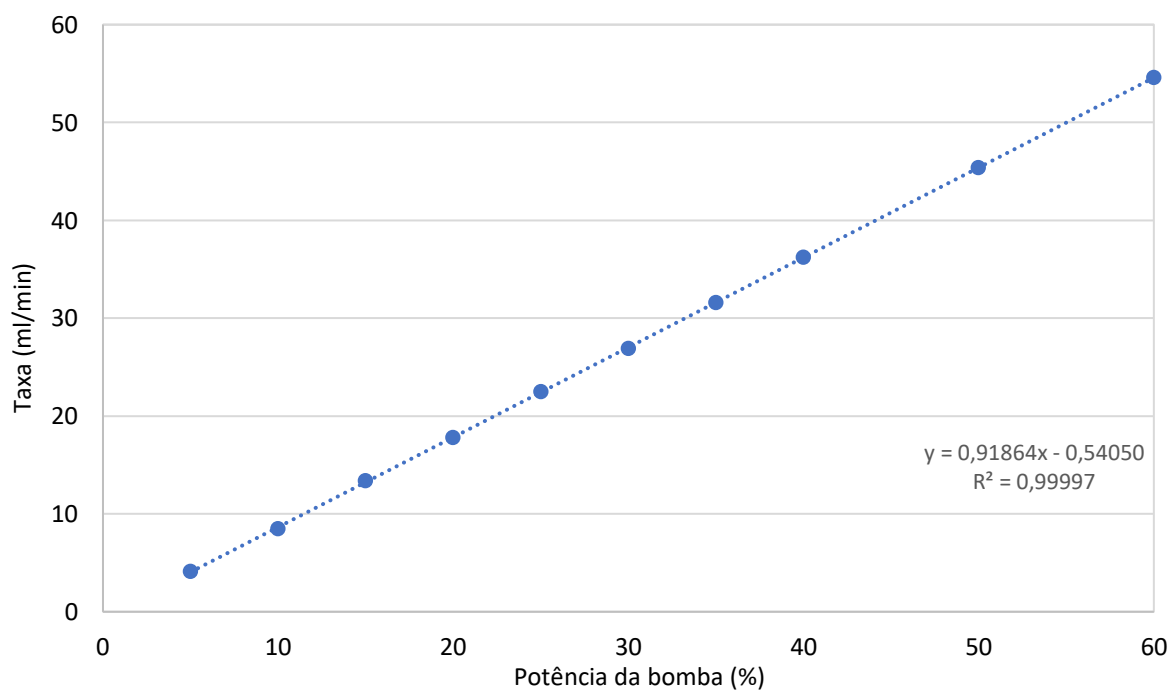
Foram realizadas duas calibrações da bomba peristáltica. A primeira foi feita com acetona, e os resultados estão apresentados na Tabela B.1 e na Figura B.1. A segunda foi feita com metanol, e os resultados estão apresentados na Tabela B.2 e na Figura B.2.

Tabela B.1 – Pontos usados na calibração da bomba peristáltica com acetona.

Potência (%)	Taxa (ml/min)
5	4,1
10	8,5
15	13,4
20	17,8
25	22,5
30	26,9
35	31,6
40	36,2
50	45,4
60	54,6

Fonte: elaboração própria.

Figura B.1 – Curva de calibração da bomba peristáltica com acetona.

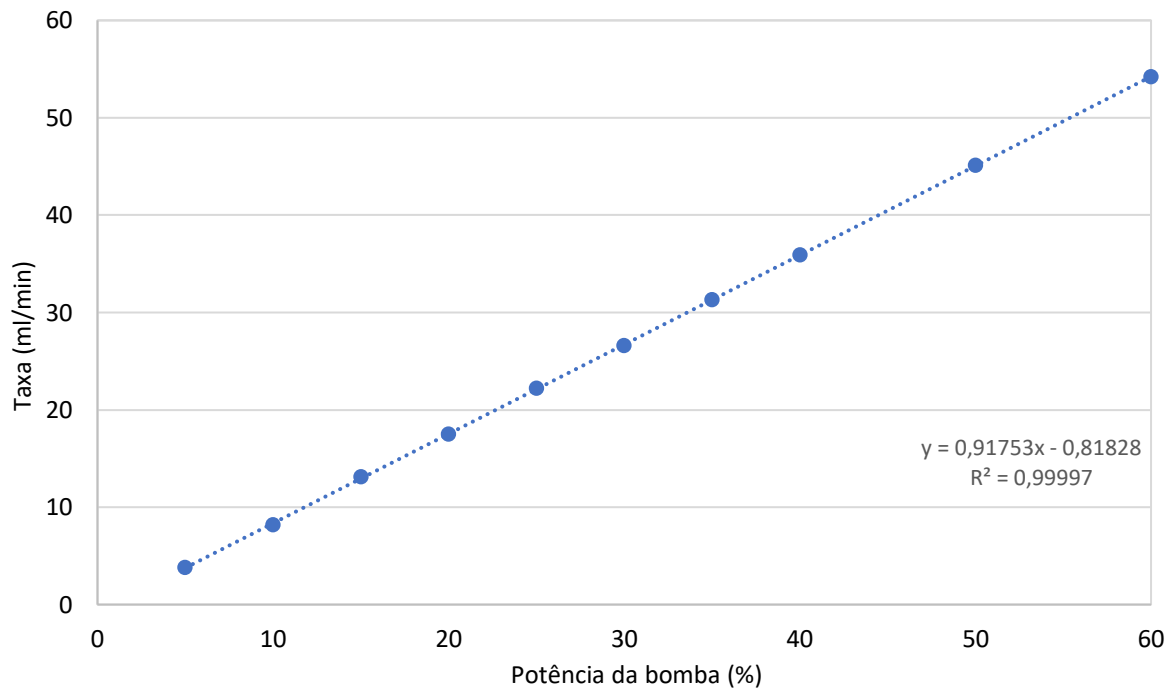


Fonte: elaboração própria.

Tabela B.2 – Pontos usados na calibração da bomba peristáltica com metanol.

Potência (%)	Taxa (ml/min)
5	3,8
10	8,2
15	13,1
20	17,5
25	22,2
30	26,6
35	31,3
40	35,9
50	45,1
60	54,2

Fonte: elaboração própria.

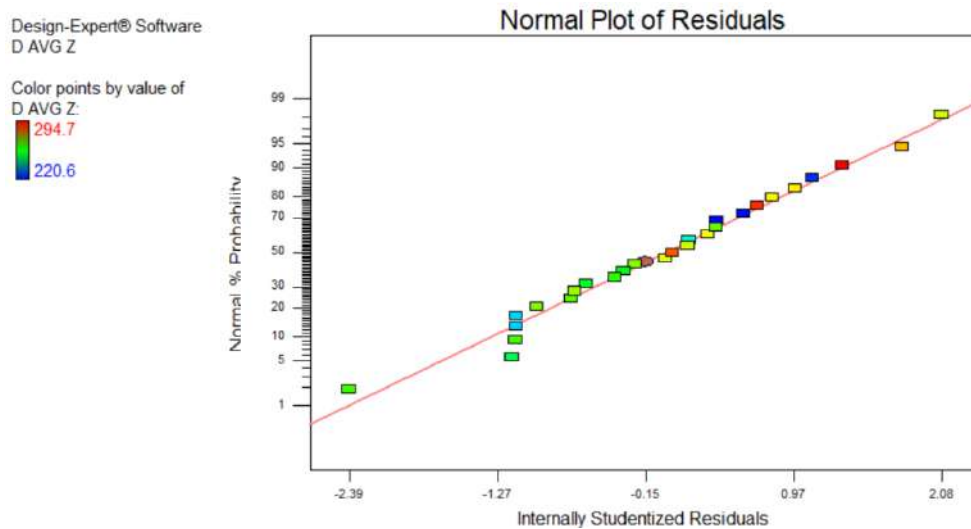
Figura B.2 – Curva de calibração da bomba peristáltica com metanol.

Fonte: elaboração própria.

APÊNDICE C – GRÁFICOS NORMALIZADOS DE RESÍDUOS DOS MODELOS OBTIDOS NA ETAPA DE MSR

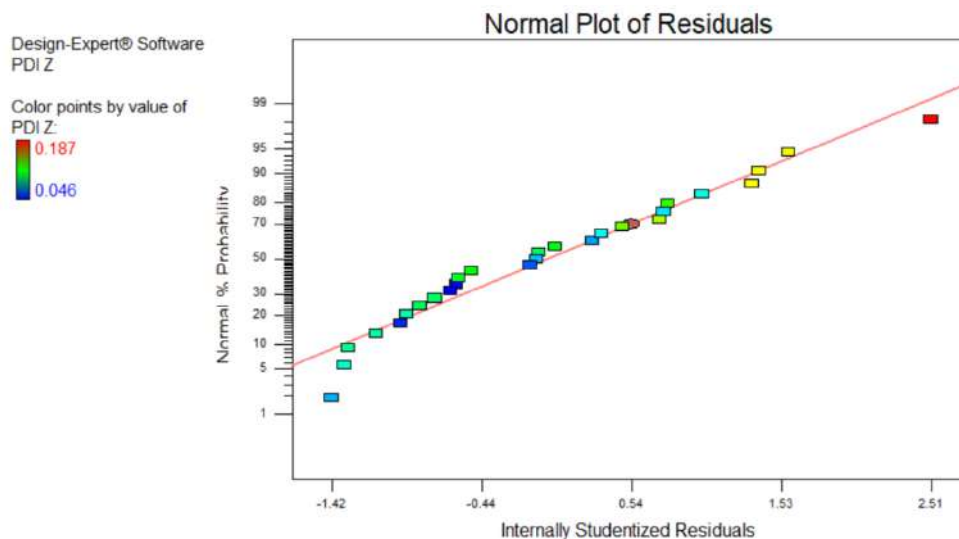
Para complementar a análise dos modelos de d_{AVG} e PDI obtidos na etapa de MSR, são apresentados aqui os gráficos normalizados de resíduos. As Figuras C.1, C.2, C.3 e C.4 trazem os gráficos para os modelos obtidos, respectivamente, para o d_{AVG} medido imediatamente, o PDI medido imediatamente, o d_{AVG} medido após 1h e o PDI medido após 1h.

Figura C.1 – Gráfico normalizado de resíduos do modelo obtido para o valor de d_{AVG} medido imediatamente.



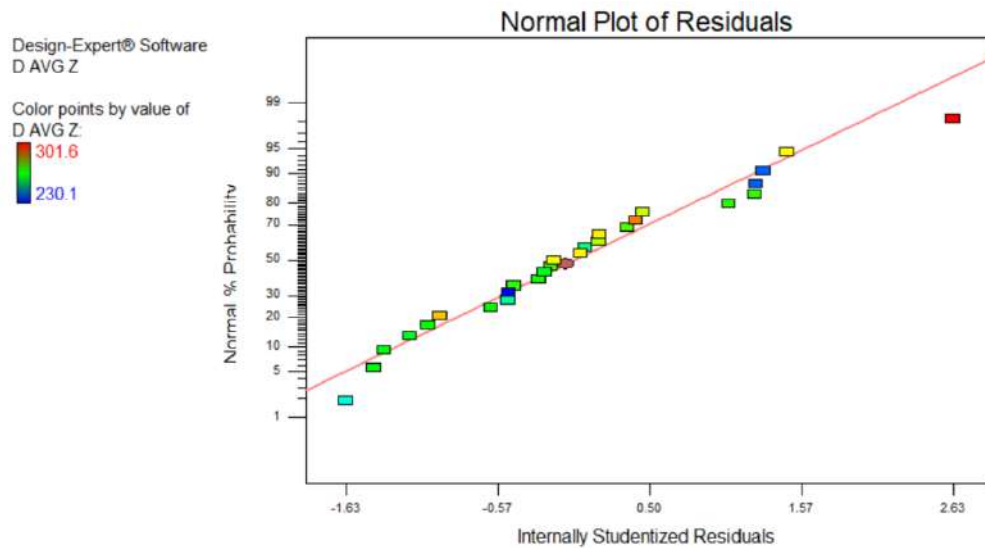
Fonte: *software* Design-Expert.

Figura C.2 – Gráfico normalizado de resíduos do modelo obtido para o valor de PDI medido imediatamente.



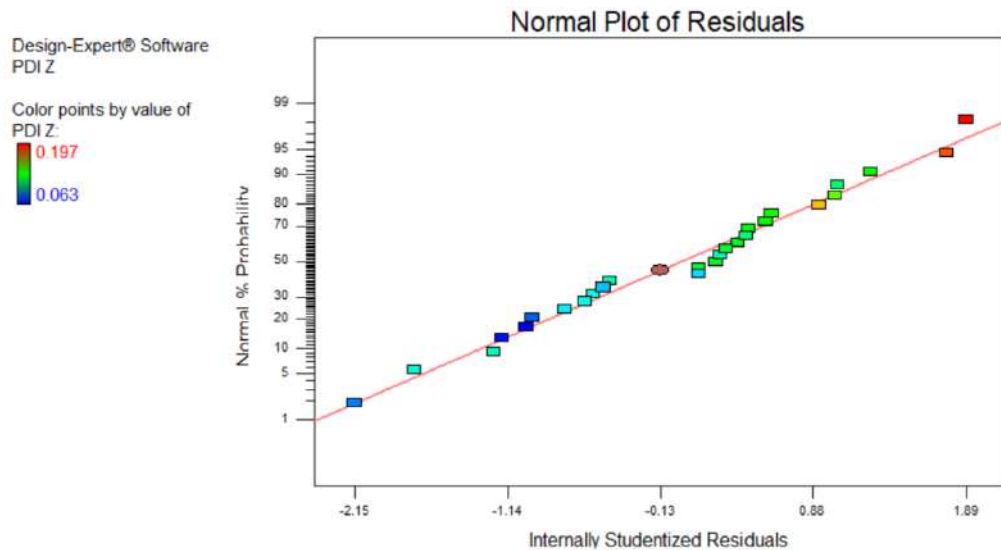
Fonte: *software* Design-Expert.

Figura C.3 – Gráfico normalizado de resíduos do modelo obtido para o valor de d_{AVG} medido após 1h.



Fonte: *software* Design-Expert.

Figura C.4 – Gráfico normalizado de resíduos do modelo obtido para o valor de PDI medido após 1h.



Fonte: *software* Design-Expert.