

Gean Pablo Silva Aguiar

**MICRONIZAÇÃO DE N-ACETILCISTEÍNA E TRANS-
RESVERATROL PELA TÉCNICA SEDS E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lanza

Coorientadores: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira e Prof. Dr. Angelo L. Piato

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Aguiar, Gean Pablo Silva

Micronização de n-acetilcisteína e trans
resveratrol pela técnica SEDS e avaliação das
atividades biológicas in vitro e in vivo / Gean
Pablo Silva Aguiar ; orientador, Marcelo Lanza,
coorientador, José Vladimir de Oliveira,
coorientador, Angelo L. Piato, 2017.

217 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós
Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis,
2017.

Inclui referências.

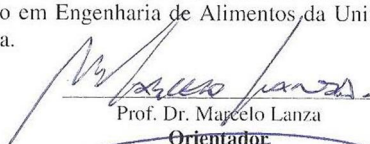
1. Engenharia de Alimentos. 2. SEDS. 3. CO2
Supercrítico. 4. Zebrafish. 5. micronização. I.
Lanza, Marcelo. II. Oliveira, José Vladimir de .
III. Piato, Angelo L. IV. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos. V. Título.

“MICRONIZAÇÃO DE N-ACETILCISTEÍNA E TRANS-RESVERATROL PELA TÉCNICA SEDS E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO* E *IN VIVO*”

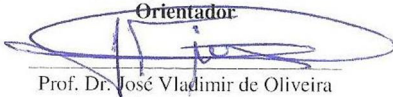
Por

Gean Pablo Silva Aguiar

Tese julgada para obtenção do título de **Doutor em Engenharia Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.


Prof. Dr. Marcelo Lanza

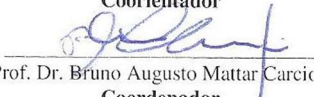
Orientador


Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Coorientador

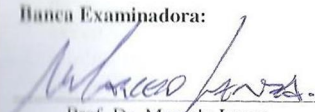

Prof. Dr. Angelo Luis Stapassoli Piato

Coorientador


Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi

Coordenador

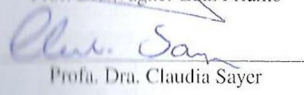
Banca Examinadora:


Prof. Dr. Marcelo Lanza


Prof. Dr. Elton Franceschi


Prof. Dr. Wagner Luiz Priamo


Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger


Profa. Dra. Claudia Sayer


Dra. Daiane Lúcia Boschetto

Florianópolis, 10 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me guiado e não me deixar desistir, me dando forças para enfrentar todos os obstáculos e conseguir chegar ao final de mais uma etapa importante da minha vida.

Aos meus pais, irmãos e familiares, principalmente à minha mãe, que sempre estiveram ao meu lado dando apoio e incentivo aos meus sonhos porque sem eles eu nada seria.

Ao meu orientador Marcelo Lanza que, desde o início, me acolheu de braços abertos, me orientou, me ajudou a ser mais independente e ensinou que o trabalho de tese era meu e que ele iria dar orientações e conselhos acerca de qual caminho a seguir, porém sempre deixando livre para executar trabalho de forma que mais me agradasse, além de confiança depositada em meu trabalho, orientador de quem tenho orgulho de ser primeiro orientando de doutorado.

Ao meu coorientador J. Vladimir de Oliveira, pela ótima orientação, pelos debates, pelas ideias, por reuniões produtivas, pela amizade, pelo incentivo e pela confiança depositada em meu trabalho. Aprendi muito a nível acadêmico e pessoal e sinto-me honrado de tê-lo com um dos meus orientadores. Obrigado por ter palavras de incentivo sempre que algo não saia conforme imaginamos.

Ao meu coorientador Angelo L. Piato, que me recebeu de braços abertos na UFRGS, me ajudou bastante e orientou muito na parte de teste *in vivo*, dispondo dos seus alunos e seu laboratório para execução deste trabalho, além de sempre estar disponível para tirar minhas inúmeras dúvidas via email, whatsapp etc. Meu muito obrigado, sua orientação foi fundamental para realização deste trabalho.

Aos meus amigos do LATESC por todo apoio e ajuda: Camila Dal Magro, Aline, Eto, Katia, Gláucia, Camila, Mirian, Josa, Paulia, Alcidênio, Mirelle, Pedro, Sara, Bruno, Simone e todos outros integrantes do laboratório pelas conversas, pelo apoio e por vários momentos de descontração. Aos outros amigos de outros laboratórios do EQA obrigado pela amizade e parceria de vocês: Cíntia, Jade, Juliana Ribeiro, Marina e muitos outros meu muito obrigado.

À Daiane L. Boschetto pela paciência, pela parceria, pela amizade, pela confiança e por ter me ajudando muito, por todos os ensinamentos que foram de grande valia para o meu doutorado e por sempre estar disposta a auxiliar sempre que necessitei. Espero que nossas contribuições mútuas e amizade continuem sempre.

Ao Matheus Marcon e Riciéri Mocelin por toda ajuda nas análises realizadas no Laboratório de Psicofarmacologia e Comportamento (LAPCOM), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Ao aluno de iniciação científica Lorenzo Matteo por te me acompanhado e me auxiliado nas inúmeras análises e por sempre estar empolgado com o trabalho, por ser alguém que não somente ensinei, mas com quem aprendi muito. Tenho total confiança que serás um ótimo profissional.

Ao Ederson por ser amigo, parceiro e companheiro para todas as horas meu muito obrigado pelo seu apoio e por está disposto sempre ajudar e por me aturar falando e discutindo sobre uma diversidade de assuntos aleatórios com frequência.

Aos alunos de TCC Gabriel e Bianca foi um prazer coorientá-los e fazer parte deste momento especial da vida de vocês. Tenho certeza que se tornarão ótimos profissionais.

Ao Leandro, da Central de análises da Engenharia de Química e Engenharia de Alimentos, por ter me auxiliado diversas vezes nas análises.

À Amarílis pos-doutoranda da Central de Análises da Química por auxiliar nas análises e nos dados de DR-X.

Aos técnicos do LCME pelo auxílio nas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A CAPES e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca pela disponibilidade.

Às instituições de ensino e pesquisa UFSC e UFRGS pela estrutura cedida e a todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram e deram forças para a realização deste trabalho.

Nunca ninguém se torna mestre num domínio em que não conheceu a impotência, e, quem aceita esta ideia, saberá também que tal impotência não se encontra nem no começo nem antes do esforço empreendido, mas sim no seu centro.

(Walter Benjamin)

RESUMO

Os compostos trans-resveratrol e N-acetilcisteína são potentes antioxidantes de grande importância industrial. O trans-resveratrol é um polifenol encontrado em diversos alimentos, especialmente em amoras, uvas e seus derivados. Esse composto apresenta inúmeros benefícios para saúde: antioxidante, antiplaquetário, antifúngico, anti-inflamatório, cardioprotetor entre outros. A N-acetilcisteína é um composto de tiol (-SH) com um potente efeito antioxidante. Esse composto vem demonstrando efeitos relevantes em diversas condições como na doença renal crônica, no câncer, na insuficiência pulmonar e nas doenças mentais. A técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (*Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids*, na sigla em inglês SEDS) é um método que pode ser aplicado para micronizar compostos com propriedades bioativas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o emprego da técnica SEDS na micronização de trans-resveratrol e N-acetilcisteína utilizando um DCC 2³ com três pontos centrais, avaliando-se a influência da concentração do composto, temperatura e pressão de operação em relação ao tamanho médio de partícula (D_p), além das propriedades biológicas *in vitro* e *in vivo*. O trans-resveratrol antes do processo de micronização apresentava o tamanho médio de 36,65 μm e da NAC de 709,82 μm , sendo o melhor resultado de ambos compostos obtido nas mesmas condições de operação: concentração de 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pressão de 80 bar e temperatura de 35 °C, o que reduziu o tamanho original em cerca de 166,59 vezes obtendo um diâmetro médio de partículas de 0,22 μm para trans-resveratrol e redução de cerca de 248,19 vezes obtendo D_p de 2,86 μm para N-acetilcisteína. Em relação às propriedades do trans-resveratrol após o processo de micronização verificou-se o aumento da solubilidade do composto em água, cerca de 2,8 vezes comparado ao composto não-micronizado, incremento da velocidade de dissolução em 1,8 vezes e além de aumentar a atividade antioxidante do composto. Pelas análises de DSC e DR-X observou-se que houve modificações na estrutura cristalina do trans-resveratrol. Já as propriedades físico-químicas da NAC micronizada versus não-micronizado observou-se aumento na velocidade de dissolução, sendo que somente o contato do solvente com o composto ocorre total dissolução do mesmo, além do aumento da atividade antioxidante. Pelas análises de DR-X verificou-se que a cristalinidade da NAC micronizada foi reduzida após o processo, e pela análise de DSC verificou-se que houve deslocamento do ponto de fusão

do composto, indícios de modificações da estrutura. Foi comprovado pelo FTIR que não houve degradação dos compostos. Pela análise de solvente residual utilizando CG-EM e CG-FID, pode ser assinalado que os compostos micronizados estão de acordo com as normas para consumo humano. Assim, o fato de o melhor resultado ter sido obtido nas condições mais brandas de temperatura e pressão é relevante, pois além de redução do custo do processo há a possibilidade de trabalhar com compostos termossensíveis. Por fim, nos testes *in vivo* em *zebrafish* observou-se que a NAC micronizada diminuiu a concentração eficaz mínima em 100 vezes, obtendo o mesmo efeito tipo ansiolítico do composto não-micronizado. Portanto, a micronização aumentou a biodisponibilidade e potencializou os efeitos terapêuticos tanto *in vitro* como *in vivo* dos fármacos o que abre novos horizontes na área de micronização por fluido supercrítico tanto para indústria farmacêutica, química como de alimentos.

Palavras-chave: SEDS, CO₂ Supercrítico, trans-resveratrol, NAC, micronização, Zebrafish.

ABSTRACT

Trans-resveratrol compounds and N-acetylcysteine are potent antioxidants of great industrial interest. The trans-resveratrol is a polyphenol found in various foods, especially in Blueberry, grape seeds, in the skin of the grapes and in red wine. This compound offers numerous health benefits, such as: antioxidant, antifungal, anti-inflammatory, antiplatelet, cardioprotective among others. N-Acetylcysteine is a thiol (-SH) with a potent antioxidant effect. This compound comes demonstrating preventive effect as protector in chronic kidney disease, cancer, pulmonary insufficiency among others. The technique Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids (SEDS), is a method that can be applied to micronization compounds with bioactive properties. In this context, the objective of this work was to evaluate the use of the method in the micronization of SEDS trans-resveratrol and N-acetylcysteine using both a DCC 2³ with 3 central points, evaluating the influence of the concentration of the compound (4, 12, and 20 mg·mL⁻¹), temperature (308, 313 and 318 F) and pressure (80, 100 and 120 bar) operating in relation to average particle diameter (D_p). In addition to evaluating biological properties *in vitro* and *in vivo*. The average size of the drug before processing of the trans-resveratrol was 36.65 μm and the NAC of 709.82 μm and the best result of both compounds were obtained in the same conditions: concentration of 20 mg·mL⁻¹, 80 bar pressure and a temperature of 308 F, which reduced the original size at about 166.59 times getting an average diameter of 0.22 μm particles for trans-resveratrol and reduction of about 248.19 times getting D_p of 2.86 μm for N-acetylcysteine. In relation to the properties of Trans-resveratrol after the micronization process, the solubility of the compound increased in water, about 2.8 times compared to the non-micronized compound, increasing the dissolution rate by 1.8 times and increasing the activity Antioxidant of the compound. From DSC and PXRD analyzes, we observed that there were modifications in the trans-resveratrol crystal structure. The physicochemical properties of the micronized versus non-micronized NAC observed an increase in the dissolution rate, and only the contact of the solvent with the compound occurs totally dissolution of the same, besides the increase of the antioxidant activity. From the PXRD analysis it was found that micronized NAC reduced crystallinity after the process, and by DSC analysis it was found that there was a shift of the compound melting point indicative of structure modifications. It was

proved by the FTIR found that there was no degradation of the compounds. Finally, the residual solvent analysis using GC-MS and GC-FID, it was proven that the micronized compounds are in accordance with the standards for human consumption. Thus, the fact that the best results have been obtained in milder conditions of temperature and pressure is relevant, as well as reducing the cost of the process there is the possibility of working with heat-sensitive compounds. Finally, in the *in vivo* tests in Zebrafish it was observed that the micronized NAC decreased the minimum effective concentration in 100 times, obtaining even anxiolytic type effect of the non-micronized compound. Therefore, micronization increased the bioavailability and potentiated the therapeutic effects, *in vitro* and *in vivo*, of the drugs, which opens new horizons in the area of supercritical fluid micronization for both the pharmaceutical, chemical and food industries.

Keywords: SEDS, CO₂, trans-resveratrol, NAC, average particle size, micronization; Zebrafish.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organograma do documento de tese.....	33
Figura 1.1 - Diagrama esquemático da técnica RESS.....	52
Figura 1.2 - Fundamentação da técnica RESS.	52
Figura 1.3 - Diagrama esquemático da técnica PGSS.....	54
Figura 1.4 - Fundamentação da técnica PGSS.	54
Figura 1.5 - Diagrama esquemático da técnica SEDS.....	57
Figura 1.6 - Diagrama esquemático da técnica SEDS.....	58
Figura 2.1 - Diagrama esquemático do aparato experimental SEDS.....	89
Figura 2.2 - Representação gráfica do protocolo experimental.....	98
Figure 4.1 - Pareto Chart showing the effect of micronization process parameters.....	109
Figure 4.2 - Response surfaces of temperature x pressure.	112
Figure 4.3 - Control curve of temperature x pressure.	113
Figure 4.4 - Scanning Electron Microscope (SEM) of the produced particles.	114
Figure 4.5 - Infrared spectrum of micronized (red line) and non-micronized (dark line) trans-resveratrol by SEDS technique. (1) C-C aromatic double bond. (2) C-C olefin bond. (3) C-C bonds. (4) Band that characterizes the trans form of compound.....	115
Figure 5.1 - Scanning Electron Microscope (SEM) the particles of resveratrol micronized and non-micronized: (A) Run 1, (B) Run 2 and (C) Raw trans-resveratrol.....	125

Figure 5.2 - Solubility the particles of resveratrol micronized and non-micronized in different solvents.....	126
Figure 5.3 - Dissolution rate of micronized and non-micronized resveratrol.	127
Figure 5.4 - Antioxidant activity of micronized and non-micronized samples.....	129
Figure 5.5 - Powder X-Ray Diffraction (PXRD) of micronized and non-micronized resveratrol particles.	130
Figure 5.6 - Infrared spectroscopy (FTIR) of micronized and non-micronized compound.....	132
Figure 6.1 - Schematic diagram of the experimental apparatus using the SEDS technique. CV – Check – Valve; V1, V2, V3 and V4 – Ball valve; V5 and v6 – Needle valve; BRP – Back Pressure Regulator.....	140
Figure 6.2 - Pareto Chart showing the effect of micronization process parameters on the solute particle size.....	144
Figure 6.3 - Scanning Electron Microscope (SEM) of the produced particles.....	146
Figure 6.4 - Infrared spectrum of micronized (red line) and non-micronized (dark line) NAC by SEDS technique. (1) NH the 3390 cm^{-1} . (2) SH the 2549 cm^{-1} . (3) C = 0 the 1720 cm^{-1}	147
Figure 6.5 - Dissolution profiles of NAC in distilled water.....	148
Figure 6.6 - Powder X-Ray Diffraction (PXRD) of micronized and non-micronized NAC particles.....	149
Figure 7.1 - Schematic diagram of the experimental apparatus using the SEDS technique.CV – Check – Valve; V1, V2, V3 and V4 – Ball valve;	

V5 and V6 – Needle valve; BRP – Back Pressure Regulator.....	161
Figure 7.2 - Graphical representation of the experimental protocol. Pode usar essa mesma figura lá em cima. E padronizar o nome dos protocolos experimentais em ingles.	165
Figure 7.3 - Pareto Chart showing the effect of micronization process parameters.	168
Figure 7. 4 - Scanning electron microscope (SEM) of the produced particles.	169
Figure 7.5 - (a) Response surfaces of pressure x concentration. (b) Control curve of pressure × concentration.	172
Figure 7.6 - Dissolution rate of micronized and non-micronized NAC.	173
Figure 7.7 - Powder X-Ray Diffraction (PXRD) of micronized and non-micronized NAC particles.	175
Figure 7.8 - Differential Scanning Calorimetry (DSC) of the micronized and non-micronized sample.	177
Figure 7.9 - Behavioral effects of micronized and non-micronized NAC in zebrafish. (A) Time spent in the upper zone of the tank and (B) total distance moved in the novel tank test in zebrafish; fluoxetine (FLU) was used as the positive control. (C) Time spent in the lit side of the tank and (D) number of crossings in the light/dark test; bromazepam (BMZ) was used as the positive control. Drug concentrations are indicated inside the bars as mg·L ⁻¹ . All values are mean + S.E.M; *p<0.05, based on ANOVA followed by Tukey post hoc test.	179
Figura A.1 - Diagrama P, x, y experimental para sistema ternário CO2 (1) + diclorometano (2) + acetona (3).....	195

Figura B.1 - Curva de calibração para determinação da concentração de trans-resveratrol.....	197
Figura B.2 - Curva de calibração para determinação da concentração de NAC.....	198
Figura D.1 - Curva de calibração para quantificação de ppm residual de diclorometano.....	211
Figura D.2 - Curva de calibração para quantificação de ppm residual de Acetona.....	212
Figura E.1 - DSC da amostra de Trans-resveratrol micronizado e não-micronizado.....	213

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. 1 - Diferentes métodos de encapsulamento e micronização que utilizam SC-CO ₂	59
Tabela 1.2 - Solventes residuais classe 1.	63
Tabela 1.3 - Solventes residuais classe 2.	63
Tabela 1.4 - Solventes residuais classe 3.	64
Tabela 2. 1 - Variáveis estudadas no processo de micronização das amostras.....	91
Tabela 2. 2 - Condições de operação.....	96
Table 4.1 - Variables studied in the micronization process of the samples.....	107
Table 4.2 - Results of 2 ³ CCD experimental design of trans-resveratrol micronization.....	108
Table 4.3 - Variance analysis for the average particle size for resveratrol.....	110
Table 5.1 - Particle size values of micronized and non-micronized compound.....	125
Table 5.2 - EC ₅₀ of trans-resveratrol micronized and non-micronized.....	129
Table 6. 1 - Variables studied in the micronization process of the samples.....	141
Table 6.2 - Results of 2 ³ CCD experimental design of NAC micronization.....	143
Table 7.1 - Variables studied in the micronization process of the samples.....	162

Table 7. 2 - Results of 2^2 CCD experimental design of NAC micronization.	167
Table 7.3 - Variance analysis for the average particle size of NAC... ..	170
Table 7. 4 - Results of 2^2 CCD experimental design real and predicted of NAC micronization.	171
Table 7.5 - EC_{50} of NAC micronized and non-micronized.	174

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA – Atividade antioxidante
- Abs_{amostra} – Absorbância da amostra
- Abs_{branco} – Absorbância do branco
- Abs_{controle} – Absorbância do controle
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ANOVA – Análise de variância
- C – Concentração de composto na solução orgânica
- CG-FID – Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama
- CG-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
- CV – Coeficiente de variação
- CO₂ – Dióxido de carbono
- DCC – Delineamento composto central
- D_p – Particle size
- DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
- DSC – Calorimetria diferencial de varredura
- DR-X – Difração de raio-X
- EC₅₀ – Mínima concentração efetiva necessária para decrescer em 50% a concentração inicial do radical DPPH
- EQA – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos
- F – Teste de Fisher
- FTIR – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
- GL – Graus de liberdade
- HCl – Ácido clorídrico
- ICH – *International Conference on Harmonization*
- LAPCOM – Laboratório de Psicofarmacologia e Comportamento
- LATESC – Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica
- LEXDON – Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas
- LCME – Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
- M – massa molar
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- MQ – Média quadrática
- NAC – N-acetilcisteína
- P – Pressão

PBS – Solução tampão fosfato

P_c – Pressão crítica

ppm – Partes por milhão

RESS – Expansão Rápida da Solução Supercrítica

SEDS – Expansão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos

SQ – Soma quadrática

T_c – Temperatura crítica

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UV – Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta visível

X_{\min} – Tamanho mínimo de partícula

X_{\max} – Tamanho máximo de partícula

\bar{X} – Tamanho médio de partícula

σ – Desvio padrão

SUMÁRIO

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO.....	31
ORGANOGRAMA DO DOCUMENTO DE TESE.....	33
CAPÍTULO 1.....	35
1.1 INTRODUÇÃO.....	35
1.2 OBJETIVOS.....	39
1.2.1 Objetivo Geral.....	39
1.2.2 Objetivos Específicos.....	39
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	41
1.3.1 Importância do tamanho de partícula.....	41
1.3.2 Trans-resveratrol.....	42
1.3.3 N-Acetilcisteína (NAC).....	44
1.3.4 Micronização.....	46
1.3.5 Polimorfismo.....	49
1.3.6 CO₂ supercrítico.....	50
1.3.6.1 Aplicação do CO₂ supercrítico na área farmacêutica.....	50
1.3.7 Formação de micro e nanopartículas empregando fluido supercrítico.....	51
1.3.7.1. CO₂ supercrítico como solvente.....	51
1.3.7.2. Fluido supercrítico como soluto.....	53
1.3.7.3. Fluido supercrítico como antissolvente.....	55
1.3.7.3.1. SEDS - Solution Enhanced Dispersion with Supercritical Fluid.....	56

1.3.8 Resíduos de solvente em fármacos.....	61
1.3.9 Zebrafish.....	65
1.4 Considerações a respeito do estado da arte.....	67
1.5 Referências bibliográficas.....	69
CAPÍTULO 2.....	89
2. Materiais e Métodos.....	89
2.1 Técnica de dispersão da solução melhorada por fluido supercrítico (SEDS).....	89
2.2 Materiais.....	91
2.3 Micronização utilizando a técnica SEDS.....	91
2.3.1 Determinação do tamanho de partícula.....	93
2.3.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	93
2.3.3 Velocidade de dissolução.....	94
2.3.4 Solubilidade.....	94
2.3.5. Ensaio de eliminação radical DPPH.....	94
2.3.6 Difração de raios-X em pó (DR-X).....	95
2.3.7 Identificação e quantificação de solvente residual dos compostos micronizados.....	95
2.3.8 Testes comportamentais com N-acetilcisteína.....	97
2.3.8.1 Animais.....	97
2.3.8.2 Design Experimental.....	97
2.3.8.3 <i>Novel tank</i>	98
2.3.8.4 Teste claro/escuro.....	98

2.3.8.5 Testes estatísticos nos ensaios comportamentais.....	99
2.4 Referências bibliográficas.....	99
CAPÍTULO 3.....	101
CAPÍTULO 4.....	103
RESULTADOS I.....	103
Trans-resveratrol micronization by SEDS technique.....	103
Abstract.....	104
4.1. INTRODUCTION.....	105
4.2 MATERIALS AND METHODS.....	106
4.2.1 Materials.....	106
4.2.2 Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids Technique (SEDS)	106
4.2.3 Conditions for precipitation.....	106
4.2.4 Morphology and determination of particle size.....	107
4.2.5 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)	107
4.2.6 Identification and quantification of residual solvent.....	107
4.3 RESULTS AND DISCUSSIONS.....	108
4.3.1 Trans-resveratrol micronization.....	108
4.3.2. FTIR.....	114
4.3.3 Residual solvent analysis.....	115
4.4 CONCLUSIONS.....	116
Acknowledgements.....	116

4.6 REFERENCES.....	117
CAPÍTULO 5.....	121
RESULTADOS II.....	121
Micronization of trans-resveratrol by supercritical fluid: dissolution, solubility and in vitro antioxidant activity.....	121
Abstract.....	122
5.1 INTRODUCTION.....	123
5.2 MATERIALS AND METHODS.....	123
5.2.1 Materials.....	123
5.2.2 Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids Technique (SEDS)	123
5.2.3 Conditions for precipitation.....	124
5.2.4 Particles Characterization.....	124
5.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	125
5.3.1 Solubility analysis.....	126
5.3.2 Analysis of dissolution rate.....	127
5.3.3 DPPH radical scavenging assay.....	128
5.3.4 Powder X-ray diffraction (PXRD)	130
5.3.5 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)	131
5.4 CONCLUSION.....	132
Acknowledgement.....	133
5.5 References.....	133
CAPÍTULO 6.....	137
RESULTADOS III.....	137

N-acetylcysteine micronization by SEDS technique using supercritical CO₂	137
ABSTRACT	138
6.1 INTRODUCTION	139
6.2 MATERIALS AND METHODS	140
6.2.1 Materials	140
6.2.2 Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids Technique (SEDS)	140
6.2.3 Experimental conditions for precipitation and coprecipitation	141
6.2.4 Morphology and determination of particle size	141
6.2.5 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)	141
6.2.6 Dissolution rate analysis	142
6.2.7 Powder X-ray diffraction (PXRD)	142
6.2.8 Identification and quantification of residual solvent	142
6.3 RESULTS AND DISCUSSIONS	143
6.3.1 N-acetylcysteine micronization	143
6.3.2 FTIR	147
6.3.4 Powder X-ray diffraction (PXRD)	148
6.3.5. Residual solvent analysis	150
6.4. Conclusions	151
Acknowledgments	151
6.5. REFERENCES	151
CAPÍTULO 7	157

RESULTADOS IV.....	157
Micronization of N-acetylcysteine by supercritical fluid: evaluation of <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> biological activity	157
ABSTRACT.....	158
Purpose	158
Methods	158
Results	158
Conclusions	158
Abbreviations.....	159
7.1 INTRODUCTION.....	160
7.2 MATERIALS AND METHODS.....	161
7.2.1 Materials.....	161
7.2.2 Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids Technique (SEDS)	161
7.2.3 Experimental conditions for precipitation.....	162
7.2.4 Morphology and determination of particle size.....	162
7.2.5 Dissolution rate analysis.....	162
7.2.6 DPPH radical scavenging assay.....	163
7.2.7 Powder X-ray diffraction (PXRD)	163
7.2.8 Thermal analysis.....	164
7.2.9 Identification and quantification of residual solvent.....	164
7.2.10 Behavioral testing.....	164
7.2.10.1 Animals.....	164
7.2.10.2 Experimental design.....	165

7.2.10.3 Novel tank.....	165
7.2.10.4 Light/dark.....	166
7.2.10.5 Statistics.....	166
7.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	166
7.3.1 Analysis of dissolution rate.....	173
7.3.2 DPPH radical scavenging assay.....	174
7.3.3 Powder X-ray diffraction (PXRD)	174
7.3.4 Thermal analysis.....	177
7.3.5 Behavioral testing.....	178
7.4 CONCLUSION.....	180
Acknowledgements.....	180
7.5 REFERENCES.....	181
CAPÍTULO 8.....	187
8. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	187
8.1. Conclusões gerais.....	187
8.2 Sugestões para trabalhos futuros.....	188
CAPÍTULO 9.....	191
9. PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA DECORRENTE (DIRETA OU INDIRETAMENTE) DA EXECUÇÃO DESTE TRABALHO.....	191
9.1 Trabalhos publicados/submetidos em periódicos.....	191
9.2 Trabalhos publicados em anais de eventos científicos.....	192
APÊNDICE A.....	195
APÊNDICE B.....	197

APÊNDICE C.....	199
APÊNDICE D.....	211
APÊNDICE E.....	213
ANEXO A.....	215
ANEXO B.....	217

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

Micronização de N-acetilcisteína e trans-resveratrol pela técnica SEDS e avaliação das atividades biológica *in vitro* e *in vivo*

Por quê?

- Utilização na indústria química, farmacêutica e de alimentos para aumentar a solubilidade e velocidade de dissolução de compostos pouco solúveis em soluções aquosas;
- A redução do tamanho de partícula possibilita maior biodisponibilidade;
- Micronização por fluido supercrítico é uma alternativa para técnicas tradicionais de micronização.

Quem já fez?

- Não constam na literatura trabalhos de micronização por fluido supercrítico da N-acetilcisteína e nem do composto trans-resveratrol;
- Há escassez de trabalhos que vão além das características das partículas produzidas, pois a maioria das pesquisas realizadas não avalia as partículas em relação às atividades biológicas *in vitro* e, principalmente, *in vivo*, limitando-se a avaliar solubilidade, velocidade de dissolução, morfologia, propriedades térmicas.

Hipótese?

- É possível micronizar trans-resveratrol e N-acetilcisteína que propicie o aumento da solubilidade e velocidade de dissolução?
- O composto micronizado apresentará melhores propriedades tanto *in vitro* como *in vivo* comparado à versão não processada?
- É possível reduzir a dosagem terapêutica dos compostos obtendo o mesmo efeito farmacológico?

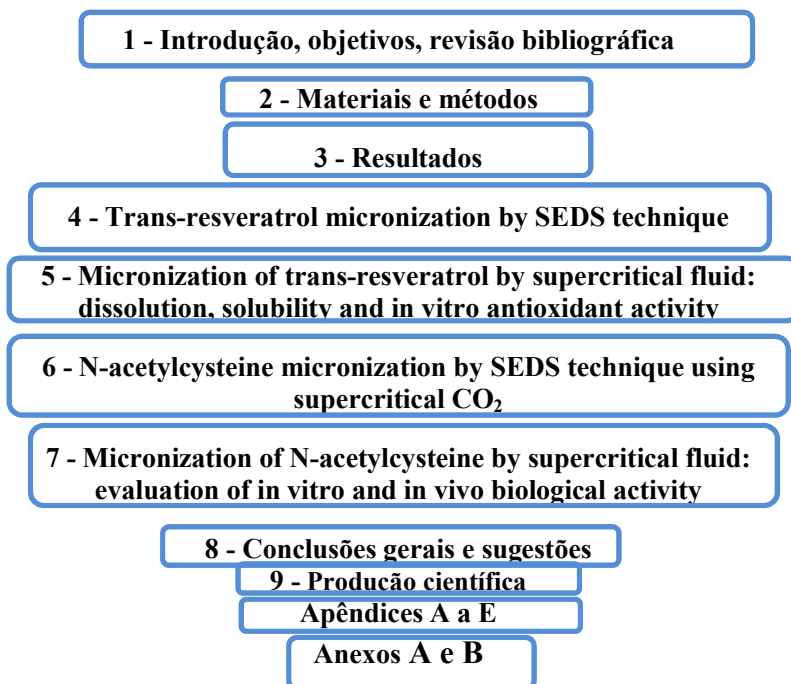
Como fazer?

- Estudar o processo de micronização a fim de otimizá-lo;
- Avaliar propriedades como solubilidade, velocidade de dissolução, ponto de fusão, atividade antioxidante e solvente residual;
- Avaliar o composto NAC micronizado em modelo animal *zebrafish* a fim de verificar se o composto ainda possui efeito tipo ansiolítico, conforme já relatado na literatura, e se aumentou a biodisponibilidade.

ORGANOGRAMA DO DOCUMENTO DE TESE

O presente documento foi organizado de acordo com a figura 1. No Capítulo 1 foram descritos a introdução e os objetivos do trabalho, além de trazer uma breve revisão sobre os temas abordados. O Capítulo 2 traz a descrição dos materiais e métodos utilizados. Os resultados foram divididos nos Capítulos 3, 4, 5, 6 e 7. O capítulo 8 traz as conclusões gerais e sugestões para trabalhos futuros. O capítulo 9 apresenta as produções científicas obtidas ao longo do desenvolvimento do trabalho. Os apêndices de A a E apresentam os materiais suplementares da tese. Por fim, o Anexo A apresentam o laudo técnico dos compostos utilizados e Anexo B apresenta a carta do conselho de ética.

Figura 1 - Organograma do documento de tese.



CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

O processo de micronização é caracterizado pela redução do tamanho médio da partícula com a finalidade de fornecer mudanças na estrutura física. Este processo é aplicado em diferentes materiais (CHAU; WANG; WEN, 2007) com diferentes finalidades desde a indústria química, farmacêutica até a indústria de alimentos. Cabe ressaltar, neste contexto, que as técnicas convencionais de produção de micro/nanopartículas comparadas com técnicas que utilizam fluido supercrítico apresentam inúmeras desvantagens: o uso excessivo de solvente, degradação térmica, alta concentração de solvente residual e, principalmente, dificuldade no controle do tamanho das partículas e distribuição de tamanho durante o processo (HE et al., 2004).

Existem inúmeras vantagens da redução do tamanho de partículas de fármacos, portanto, o estudo de processo de micronização de fármacos visa modificar o tamanho da partícula, a porosidade e a densidade a fim de permitir a incorporação de um princípio ativo para que a administração seja dirigida a um alvo específico (ROGERS et al., 2001). Neste contexto, segundo Durán et al. (2010), uma alta biodisponibilidade (até 100%) de um fármaco pode ser obtida com partículas com diâmetro médio entre 200 a 400 nm.

O uso do CO₂ supercrítico no processo de micronização vem ganhando espaço visto que a utilização do fluido supercrítico como antissolvente induz ao polimorfismo em compostos, que não são reproduzidos por outras técnicas. Isto é relevante porque se sabe que a importância dos polimorfos para a indústria farmacêutica é bem conhecida, visto que o polimorfismo constitui uma ferramenta para alavancar e ganhar participação de mercado uma vez que as formas polimórficas têm potencial para transformar características físico-químicas dos pós (RODRIGUES et al., 2016; RODRIGUES et al., 2014). Isso ocorre devido ao fato que o polimorfismo tem impacto no ponto de fusão, na densidade aparente, na reatividade química, na solubilidade aparente e na velocidade de dissolução. Em outras palavras, o polimorfismo pode afetar a estabilidade, a manipulação e a biodisponibilidade do fármaco (MARTÍN et al., 2009; RODRIGUES et al., 2016, RODRIGUES et al.2014).

O resveratrol (3,4,5-tri-hidroxiestilbeno) é um antioxidante composto polifenólico da classe do estilbeno e também é uma fitoalexina presente numa grande variedade de alimentos, como amoras,

amendins, cranberries, chocolate amargo e uvas. Tem sido relatada uma ampla gama de propriedades biológicas e farmacológicas (ULRICH; WOLTER; STEIN, 2005). Nos estudos de Walle et al. (2004) e Wenzel e Somoza (2005) observou-se que após administração oral da dose de 25 mg de resveratrol ocorreu cerca de 70% de absorção do composto. Porém, a sua biodisponibilidade foi quase nula; somente traços da molécula na forma inalterada foram encontrados no plasma (WALLE et al., 2011). O processo de micronização vem como alternativa a baixa biodisponibilidade, visto que quando o composto micronizado tem sua velocidade de dissolução aumentada, favorece o composto a atingir níveis plasmáticos terapêuticos, aumentando assim a sua biodisponibilidade (DURÁN et al., 2010).

Em relação aos benefícios à saúde com o uso do *trans*-resveratrol é preciso situar que, inicialmente, o resveratrol foi estudado pelo seu potencial como substância anticancerígena e, mais tarde, foi verificado seu potencial para reduzir doenças cardiovasculares. Mas, recentemente, estudos têm demonstrado que o resveratrol alivia sintomas de depressão induzidos pelo stress (HURLEY et al., 2014; OGLE; SPEISMAN; ORMEROD, 2013; GE et al., 2013; LIU et al., 2014; PATHAK; AGRAWAL; DHIR, 2013).

A N-acetilcisteína (NAC) apresenta-se como um pó cristalino branco com leve odor acético. Foi introduzido no mercado na década 70 e foi o primeiro agente mucolítico empregado comercialmente (SILVA, 1994). Quimicamente, a NAC é composta de tiol com um potente efeito antioxidante, por meio da eliminação de radicais reações redox (cisteína-cistina) e da produção de glutatona (TUMUR et al., 2010). Como fonte de grupos sulfidril nas células, a NAC combate diretamente os radicais livres mediante interação com o radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (KELLY, 1998).

A N-acetilcisteína (NAC), um precursor da glutatona, possui um mecanismo de ação original composto pela modulação de vias antioxidantes, glutamatérgicas, inflamatórias e neurotróficas (BERK et al., 2013; DEAN; GIORLANDO; BERK, 2011; SAMUNI et al., 2013). NAC é comercializado para o tratamento de intoxicação por paracetamol, doença pulmonar, e nos últimos anos, um número crescente de dados clínicos revela os benefícios da NAC no tratamento de condições psiquiátricas (DEEPMALA et al., 2015). Especificamente, estudos comprovam os efeitos de NAC em diversas condições como esquizofrenia, autismo, doença de Alzheimer, transtorno bipolar, depressão, dependência de drogas e transtorno obsessivo-compulsivo (COSTA-CAMPOS et al., 2013; GERE-PÁSZTI e JAKUS, 2009;

HASHIMOTO et al., 2004; HASTINGS, 2009; HERRMANN et al., 2014; MOCELIN et al., 2015; SANTOS et al., 2017; STEULLET et al., 2006; NOCITO et al., 2017; BENTZLEY et al., 2016; OKAMURA et al., 2016; RÉUS et al., 2016; MINARINI et al., 2016).

No entanto, a baixa biodisponibilidade é uma das principais limitações para maximizar os efeitos terapêuticos (BAVARSAID SHAHRIPOUR; HARRIGAN; ALEXANDROV, 2014).

No panorama da área de alimentos, atualmente os agentes antioxidantes vêm sendo incorporados em revestimentos ativos em embalagens para alimentos. A aplicação em revestimento ativo proporciona ao produto a manutenção de firmeza e cor. Na literatura há pesquisas que relatam o uso de NAC em revestimentos ativos em embalagens para maçã, o que proporcionou ao produto a manutenção da firmeza e da cor durante 23 dias (ROJAS-GRAÜ et al., 2008).

Devido ao potencial do trans-resveratrol e da NAC o objetivo desse trabalho foi estudar o processo de micronização desses compostos visando à redução do tamanho de partícula para escala micro/nano, incrementando, por consequência, sua biodisponibilidade. Objetiva-se, com esta hipótese, avaliar o efeito tipo ansiolítico da NAC micronizada versus não-micronizada em *zebrafish*. Já em relação ao trans-resveratrol micronizado versus não-micronizado foi analisado o potencial neuroprotetor em modelo da doença de Alzheimer utilizando camundongos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi estudar o processo de micronização de trans-resveratrol e N-acetilcisteína pela técnica de Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos (SEDS, do inglês “Solution Enhanced Dispersion with Supercritical Fluid”) empregando CO₂ como fluido supercrítico visando reduzir a dosagem terapêutica destes compostos em modelos animais.

1.2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho são:

- Avaliar qual variável do processo de micronização (temperatura, pressão e concentração) tem maior influência em relação ao tamanho de partícula utilizando delineamento composto central (DCC) 2³ como ferramenta estatística;
- Verificar possíveis degradações dos compostos por meio da análise de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier – FTIR;
- Identificar e quantificar possíveis resíduos de solventes nas partículas micronizadas e utilizar alternativas de eliminar solvente residual;
- Caracterizar os compostos micronizados em termos de estrutura cristalina (DR-X), ponto de fusão, solubilidade, velocidade de dissolução e atividade antioxidante *in vitro*;
- Avaliar o efeito ansiolítico da NAC micronizada *versus* não-micronizada em modelo animal *zebrafish* objetivando analisar possível redução da dosagem terapêutica do composto micronizado *in vivo*;

1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 Importância do tamanho de partícula

A nanotecnologia amplia o alcance da ciência de materiais para o domínio de partículas e interfaces com dimensões extremamente pequenas. As partículas nesta escala ou apresentam uma alta superfície de contato e exibem propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas ou químicas distintas de partículas e superfícies macroscópicas, além de apresentarem um grande número de partículas por unidade de massa. O aproveitamento dessas propriedades em aplicações tecnológicas forma a base da nanotecnologia de materiais (QUINA, 2004; MIHRANYAN; FERRAZ; STRØMME, 2012).

Com o surgimento da nanotecnologia houve o desenvolvimento de técnicas envolvendo processamento, fabricação e aplicação de estruturas, com forma e tamanho controlados, sendo que na indústria de alimentos e química estas formulações, tanto na escala micrométrica como nanométrica, vêm sendo aplicadas com os objetivos de favorecer o produto final (ASSUNÇÃO et al., 2014). Portanto, a produção de partículas em escala micrométrica como nanométrica vem atraindo cada vez mais interesse da comunidade científica e principalmente das indústrias farmacêutica, alimentícia e química.

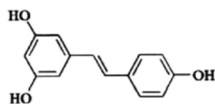
Na indústria de alimentos, formulações na escala micrométrica e/ou nanométrica vêm sendo utilizadas para aumentar a vida de prateleira de alimentos perecíveis bem como incorporar vitaminas e compostos nutracêuticos a fim de obter um produto diferenciado no mercado e que possibilite também ações benéficas a saúde humana como anti-hipertensiva, antimicrobiana, antioxidante ou anti-inflamatória (HERRERO CIFUENTES; IBANEZ, 2006).

Quanto a classificação em nano, sub-micro, micro e macro, Silva et al. (2014) e Sutherland et al. (2010) classificam de acordo com seu tamanho, sendo consideradas nano $<0,1 \mu\text{m}$, submicro entre $>0,1$ a $1 \mu\text{m}$, micro entre 1 a $5.000 \mu\text{m}$. Acima de $5.000 \mu\text{m}$ são denominadas de macropartículas.

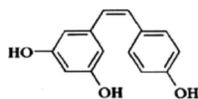
1.3.2 Trans-resveratrol

O resveratrol (3,4,5-tri-hidroxiestilbeno) [Figura 1.1], composto polifenólico da classe do estilbeno, é uma fitoalexina presente numa grande variedade de alimentos, como amoras, amendoins, cranberries, chocolate amargo e uvas. Tem sido relatada uma ampla gama de propriedades biológicas e farmacológicas (ULRICH; WOLTER; STEIN, 2005). Este composto, tal como outros membros da família do estilbeno, é produzido nos vegetais em resposta ao ataque de patógenos, à radiação ultravioleta e à exposição ao ozônio. A *Vitis vinifera*, ou uva, sintetiza o resveratrol como meio de proteção às infecções fúngicas sendo, portanto, encontrado em altas concentrações no vinho (IGNATOWICZ; BAER-DUBOWSKA, 2001; BURNS et al., 2002; YU et al., 2002).

Figura 1. 1 - Estrutura química do Resveratrol.



Trans-Resveratrol



Cis-Resveratrol

Fonte: Sautter et al. (2005).

O resveratrol apresenta dois isômeros: o cis-resveratrol (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e o trans-resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) [Figura 1.1], entretanto, ambos executam as mesmas funções, mas tradicionalmente a forma mais estudada é a trans devido ao fato de ser mais estável (AMRI et al., 2012; FILIP et al., 2003; CHUNG FU et al., 2013), além de ser biologicamente mais ativa que seu isômero cis.

Segundo Li et al. (2012) o trans-resveratrol foi isolado pela primeira vez em 1940, porém pouca atenção foi dada até que seus benefícios em doenças cardíacas foram estudados em 1992. Desde então, a evidência crescente que apontam que o trans-resveratrol pode ser útil no tratamento de doenças cardiovasculares, inflamação e em reduzir os riscos de desordens neurodegenerativas, especialmente à doença de Alzheimer (DA). A doença de Alzheimer é caracterizada por déficits cognitivos e de memória progressiva, é uma das doenças neurodegenerativas mais comuns nos idosos (AHMED et al., 2016; LI et

al., 2012) que afeta mais de 24 milhões de pessoas em todo o mundo (KOLEV et al., 2009).

Além dos benefícios já mencionados, inúmeros estudos vêm destacando e comprovando os benefícios do resveratrol à saúde. Este composto tem demonstrado propriedade quimiopreventivas (FULDA; DEBATIN, 2006; YU et al., 2002; VITRAC et al., 2003; SHANKAR; SINGH; SRIVASTAVA, 2007; ULRICH; WOLTER; STEIN, 2005; BOVE; LINCOLN; TSAN, 2002), antioxidante (ASENSI et al., 2002; GAUTAM et al., 2000), antiplaquetária (FUHRMAN; LAVY; AVIRAM, 1995), antifúngica (RASTIJA; MEDIC-SARIC, 2009), anti-inflamatória (OLAS; WACHOMICZ, 2005), cardioprotetora (JUNG; SEU; LEE, 2007; MARTÍN et al., 2006) entre outras. Ainda sobre benefícios a saúde pode ser destacado que, nos últimos anos, estudos científicos vêm demonstrando que o trans-resveratrol alivia sintomas de depressão induzidos pelo stress em ratos, resultando, portanto em um efeito antidepressivo (HURLEY et al., 2014; OGLE; SPEISMAN; ORMEROD, 2013; GE et al., 2013; LIU et al., 2014; PATHAK; AGRAWAL; DHIR, 2013).

O trans-resveratrol apresenta ação antioxidante, em particular, e é de grande interesse na indústria de alimentos, pois apresenta um papel importante na redução da oxidação lipídica dos tecidos. Portanto, quando incorporado nos produtos alimentícios, ajuda a conservar a qualidade do alimento, além de reduzir o risco de desenvolvimento de algumas doenças quando incorporado na alimentação (ANGELO; JORGE, 2007).

Nos estudos de Walle et al. (2004) e Wenzel e Somoza (2005) os autores observaram que após administração oral da dose de 25 mg de resveratrol ocorreu cerca de 70% de absorção do fármaco. Porém, a sua biodisponibilidade foi quase nula; somente traços da molécula na forma inalterada foram encontrados no plasma. Certamente a rápida conjugação com sulfato no intestino e fígado foi responsável pela baixa biodisponibilidade oral do resveratrol. Portanto, a biodisponibilidade real é menos de 1% (WALLE et al., 2011).

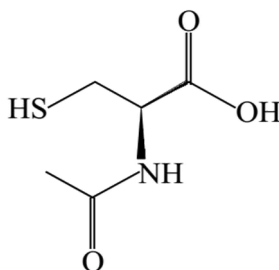
As propriedades de substâncias ativas, como o resveratrol, podem ser melhoradas por meio de formulações adequadas do material transportador. Os principais objetivos ao realizar este tipo de formulação são: a proteção do composto ativo; otimização da biodisponibilidade e garantia de funcionalidade do composto. Quando composto ativo é administrado por via oral deve ser escolhido um material que proteja contra a degradação do trato gastrointestinal e também favoreça a absorção (MARTIN et al., 2013).

Por fim, apesar dos diversos benefícios que o resveratrol comprovadamente apresenta para a saúde humana, o seu uso ainda é limitado pela sua baixa solubilidade, baixa biodisponibilidade e tendência à instabilidade devido à auto-oxidação e fotossensibilidade (FRANCIOSO et al., 2014).

1.3.3 N-Acetilcisteína (NAC)

A N-Acetilcisteína (L- α -acetamido- β -ácido mercaptopropiônico, Figura 1.2) é um pó cristalino de cor branca que apresenta leve odor acético. Esse composto foi introduzido no mercado na década de 70 e foi o primeiro agente mucolítico empregado comercialmente (SILVA, 1994). Este fármaco também pode ser utilizado em casos de superdosagem de paracetamol. Ademais, este composto apresenta ação antioxidante e tem sido relatado que a mesma pode contribuir na prevenção de alguns tipos de câncer (GOODMAN; GILMAN, 1974; ESTENDEN et al., 1999). Seu potencial mucolítico existe devido a sua ação sobre as mucoproteínas e sua atividade é máxima em valores de pH entre 7 a 9.

Figura 1. 2 - Estrutura molecular da N-acetilcisteína.



Fonte: Suarez (2005).

Pela Figura 1.2, pode-se observar que N-acetilcisteína (NAC) contém um grupo tiol e é utilizado terapêuticamente há cerca de cinco décadas como agente mucolítico que atua direta ou indiretamente como agente antioxidante por meio da eliminação de radicais reações redox (cisteína-cistina) e da produção de glutatona (TUMUR et al., 2010).

O composto NAC é o derivado do N-acetil do aminoácido L-cisteína e quando ingerido por via oral, a L-cisteína é rapidamente oxidada à cistina no meio pró-oxidante do cérebro. Cistina é o substrato do antiporter cistina-glutamato, o qual transporta glutamato para fora da célula em troca de cistina, regulando assim os níveis extracelulares de glutamato e facilitando a entrada de cisteína no interior da célula (KAU et al., 2008). Dentro da célula, cistina pode ser reduzida à cisteína, que é o componente limitante da síntese da molécula endógena antioxidante glutatona (LUSHCHAK, 2012). A NAC tem ainda a capacidade de modular a atividade dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) via glutatona e seus derivados (LESLIE et al., 1992; VARGA et al., 1997) e de dopamina (BERK et al., 2013).

Segundo Bergink; Van Megen; Westenberg (2004), Cortese e Phan (2005) e Krystal et al. (2010) o aumento da transmissão glutamatérgica no hipocampo e em regiões corticais é um componente chave em transtornos de ansiedade e, por isso, o sistema glutamatérgico pode ser um potencial alvo de modulação farmacológica. Diante disso, vem crescendo os estudos que avaliam o uso de NAC como agente ansiolítico, devido ao seu efeito como modulador glutamatérgico (DEAN; GIORLANDO; BERK, 2011). Os transtornos de ansiedade são o grupo mais comum de transtornos psiquiátricos, afetando milhões de pessoas ao redor do mundo e ocorrendo em pelo menos um episódio durante a vida (GRIEBEL; HOLMES, 2013; KESSLER et al., 2007).

Além dos benefícios anteriormente mencionados, este composto vem demonstrando efeito preventivo em doença renal crônica, câncer, insuficiência pulmonar e de outras doenças sistêmicas (NOLIN; MCMENAMIN; HIMMELFARB, 2007), melhorar a função endotelial e atenua as doenças inflamatório-vasculares (aterosclerose), antagonizando os efeitos das substâncias reativas intracelulares (TUMUR et al., 2010). Ainda referente aos efeitos benéficos na saúde pode ser mencionado que, nos últimos anos, há um número crescente de pesquisas que comprovam os benefícios do NAC em uma ampla gama de transtorno psiquiátricos como o transtorno bipolar, esquizofrenia e dependência de drogas (BERK et al., 2013; DEAN; GIORLANDO; BERK, 2011) como, por exemplo, Mocelin et. al (2015) que em seu estudo comprovou efeito ansiolítico do composto NAC.

No panorama da área de alimentos, atualmente os agentes antioxidantes, ácidos ascórbico, cítrico, caféico e N-acetilcisteína vêm sendo incorporados em revestimentos ativos em embalagens para alimentos (SOARES et al., 2008). Exemplo disso é o estudo de Rojas-Graü et al. (2008) que avaliou o efeito de revestimentos de alginato de

sódio incorporados com N-acetilcisteína em maçãs cv. “Fuji” minimamente processadas. A aplicação do revestimento ativo proporcionou ao produto a manutenção da firmeza e cor durante 23 dias a 4 °C, demonstrando assim o grande potencial de aplicação para N-acetilcisteína.

A NAC em sua forma intacta tem uma biodisponibilidade oral baixa, cerca de 10%. Após uma dose oral, a maior parte da NAC é metabolizada em outros compostos, tais como cisteína e sulfito inorgânico e credita-se a estes metabólitos a maioria da atividade e efeitos protetores da droga (KELLY, 1998; OLSSON et al., 1988).

1.3.4 Micronização

A biodisponibilidade de composto é influenciada por diversos fatores como a velocidade de dissolução, tamanho da partícula, área superficial, polimorfismo de compostos, formação de sais, permeabilidade, lipofilia, pKa (JUNGHANNS et al., 2008; MIAO et al., 2011). No caso de compostos insolúveis, a biodisponibilidade pode ser melhorada por meio da micronização do composto bruto, o que promove o aumento da sua área superficial.

Na área farmacêutica a micronização ou redução granulométrica é utilizada a fim de aumentar a área de superfície das partículas, melhorar a velocidade de dissolução do fármaco, manter uma distribuição média de tamanho das partículas e, conseqüentemente, alcançar a obtenção de amostra homogênea (YOSHIDA, 2014).

A micronização consiste em reduzir partículas de um composto ou materiais para aproximadamente 10 µm ou a valores mais baixos. Exemplo comum da aplicação desta tecnologia ocorre em formas farmacêuticas de liberação pulmonar. A distribuição do tamanho de partícula e a área de superfície de fármacos são propriedades que afetam não só etapas do processo de fabricação como também a biodisponibilidade (CARTENSEN, 1998; BARBER; KEUTER; KRAVIG, 1998), portanto, a micronização é um processo comum em compostos que apresentam problemas de dissolução e, conseqüentemente, biodisponibilidade reduzida. As vantagens da micronização são: reduzir o tamanho de partícula; melhorar a dissolução e, conseqüentemente, a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis devido ao aumento da área específica da superfície em contato com o meio (LEVY, 1963; HOENER; BENET, 1996; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; LEE et al., 2000).

Mosharraf e Nyström (1995) em seus estudos relataram que a velocidade de dissolução de fármacos pouco solúveis em água está relacionada não somente ao tamanho, mas também à forma da partícula, o que afeta as propriedades da superfície do fármaco. Segundo os autores, partículas com formato esférico apresentaram maior dissolução do que partículas irregulares e maiores.

Geralmente a micronização aumenta a velocidade de dissolução, porém a micronização em alguns casos pode ter efeito contrário ao esperado em compostos pouco solúveis, ou seja, uma redução na velocidade de dissolução. Este fenômeno é atribuído à tendência de aglomeração das partículas micronizadas resultando em uma diminuição da área de superfície específica (BOLHUIS; ZUURMAN; TE WIERIK, 1997; LEE et al., 2000; HORTER; DRESSMAN, 2001; RASENACK; MÜLLER, 2002).

Este efeito indesejado pode ser revertido ao serem utilizados meios de dissolução que possuam melhor poder de molhabilidade como, por exemplo, no caso de alguns compostos adiciona-se ao meio de dissolução um agente que atue na superfície da partícula, como o Tween 80 (HOENER; BENET, 1996). Além disso, a repulsão eletrostática e a estabilização estática são descritas como técnicas que podem ser utilizadas para estabilizar estas partículas micronizadas (LEE et al., 2000; RASENACK; MÜLLER, 2002).

As técnicas convencionais de produção de micropartículas (secagem por pulverização, trituração mecânica, recristalização, coacervação, liofilização entre outras) apresentam desvantagens tais como: uso excessivo de solvente, degradação térmica e química, altas concentrações de solvente residual e, principalmente, dificuldade em controlar o tamanho das partículas e distribuição de tamanho de partícula durante o processamento (HE et al., 2004).

As técnicas convencionais de micronização podem alterar a estrutura cristalina da partícula precipitada, o que conduz a produtos com características indesejáveis (FRANCESCHI et al., 2008) a fim de minimizar os efeitos causados pelas técnicas convencionais utilizando métodos alternativos como o uso de fluidos supercríticos (PRIAMO et al., 2013).

A tecnologia de cristalização por fluido supercrítico (SFC - Supercritical Fluid Crystallization) tem ganhado atenção crescente na indústria farmacêutica devido à sua versatilidade, devido existem inúmeras técnicas para micronizar compostos utilizando CO₂ supercrítico que pode ter o papel de soluto, solvente ou antissolvente.

As soluções saturadas de partículas no CO₂ constitui um dos métodos para processamento em alta pressão utilizado para micronizar fármacos pouco solúveis ou insolúveis em água (PERRUT; CLAVIER, 2003; REVERCHON; ADAMI, 2006). Exemplos de técnicas de micronização a partir de soluções supercríticas são RESS, em que CO₂ supercrítico é utilizado como solvente (YOSHIDA, 2014).

Segundo Yoshida (2014) em processo de micronização utilizando técnicas RESS e PGSS verificaram-se modificações no polimorfismo das partículas que otimizaram a dispersibilidade e a molhabilidade em água e a redução do ponto de fusão.

Lobo et al. (2005) utilizando técnica SEDS para micronização de budesonida a fim de alcançar liberação passiva do pó seco em inaladores, verificaram melhora no fluxo e no desempenho da quantidade relativa de pó, carregado em cápsula, que deixa o dispositivo de inalação. Os autores constataram que, além destas vantagens mencionadas anteriormente, o experimento proporcionou características vantajosas do estado sólido, tais como a pureza cristalográfica, seleção do tipo de polimorfo e minimização de energia alta dos sítios amorfos. Por fim, o processo de micronização por meio da técnica SEDS é particularmente útil na formulação de fármacos termolábeis e moléculas difíceis de processar, para as quais outros métodos de processamento podem falhar.

Por fim, sabe-se que o uso do CO₂ supercrítico no processo de micronização vem ganhando espaço visto que a utilização do fluido supercrítico como antissolvente induz ao polimorfismo em compostos, que não são reproduzidos por outras técnicas. Isto é relevante, pois a importância dos polimorfos para a indústria farmacêutica é bem conhecida, visto que o polimorfismo constitui uma ferramenta para alavancar e ganhar participação de mercado, uma vez que as formas polimórficas têm potencial para transformar características físico-químicas dos pós (RODRIGUES et al., 2016; RODRIGUES et al., 2014) visto que o polimorfismo tem impacto no ponto de fusão, densidade aparente, reatividade química, solubilidade aparente e velocidade de dissolução. Em outras palavras, o polimorfismo pode afetar a estabilidade, a manipulação e a biodisponibilidade do fármaco (MARTÍN et al., 2009; RODRIGUES et al., 2016; RODRIGUES et al., 2014).

1.3.5 Polimorfismo

A solubilidade de compostos pode ser fator limitante para absorção de compostos e conseqüentemente afeta a biodisponibilidade do composto. Um dos principais fatores que afeta a solubilidade de fármacos é a forma cristalina ou ocorrência de polimorfismo, que pode alterar as propriedades físicas dos mesmos, provocando alterações no processo de absorção (GIRON, 1995).

O polimorfismo é definido como a tendência de um pó em se cristalizar em diferentes estados cristalinos. A presença de formas cristalinas diferentes para um mesmo fármaco pode alterar algumas das propriedades físico-químicas do composto, entre elas a solubilidade, o que afeta indiretamente a velocidade de dissolução do composto (COSTA, 2005).

Formas polimórficas apresentam as mesmas propriedades físicas nos estados líquido e gasoso, porém no estado sólido podem apresentar diferenças em algumas propriedades como solubilidade, ponto de fusão, calor de fusão, índice de refração, densidade, condutividade, difração de raio-X, espectro molecular, dureza, cristalinidade, forma do cristal, cor, estabilidade, higroscopicidade, velocidade de dissolução e reações do estado sólido (GIRON, 1995; BOTTOM, 1999).

Vários estudos demonstram que a modificação da forma cristalina de compostos aumenta a energia livre do cristal e a entropia, reduzindo a entalpia de fusão e aumentando a taxa de dissolução do mesmo, o que pode interferir fortemente nas propriedades físico-químicas e na cinética de absorção (SHEKUNOV; YORK, 2000).

Por fim, sabe-se que compostos ou substâncias na forma cristalina apresentam menor solubilidade, enquanto na forma amorfa as mesmas apresentam maior solubilidade e menor estabilidade térmica (TOSCANI, 1998). Formulações onde se tem os compostos parcialmente cristalino e amorfo, ou formas metaestáveis, são muito mais solúveis que as que contem o composto cristalino. Portanto, compostos na forma amorfa ou parcialmente cristalino e amorfo promove um efeito terapêutico mais rápido, devido a aumentar a velocidade de dissolução que acarreta em maior absorção do composto (COSTA, 2005).

1.3.6 CO₂ supercrítico

Um fluido supercrítico é aquele que simultaneamente sofre aquecimento e compressão acima de sua temperatura (T_c) e pressão crítica (P_c) (BRUNNER, 1994; BOZABAG; ERKEY, 2012), região na qual não existe mais distinção entre as fases líquida e gasosa. Suas propriedades termofísicas são intermediárias entre um gás e um líquido podendo ser ajustadas por pequenas mudanças na temperatura e/ou pressão (BRUNNER, 1994; RANDOLPH, 1990). As propriedades físico-químicas de fluido supercrítico, como dito anteriormente, são intermediárias àquelas dos gases ou dos líquidos e, muitas vezes, se aproximam as melhores características de cada um, como o alto poder de solvatação de um líquido e a baixa viscosidade de um gás (BRUNNER, 1994; CARRILHO; TAVARES; LANÇAS, 2001).

O CO₂ supercrítico é o fluido mais utilizado para processos de precipitação (COCERO et al., 2009). O emprego do CO₂ supercrítico torna o processo uma técnica ambientalmente limpa e versátil, sendo promissora para substituir técnicas tradicionais de precipitação e micronização.

As condições supercríticas do CO₂ são facilmente atingidas ($T_c = 31,1$ °C, $P_c = 73,8$ bar) e este pode ser removido do produto mediante um sistema de despressurização simples (NALAWADE; PICCHIONI, F.; JANSSEN, 2006; COCERO et al., 2009). O CO₂SC também fornece um meio inerte apropriado para processar facilmente substâncias oxidáveis. Além disso, a alta solubilidade da maioria dos solventes orgânicos em fluidos supercríticos permite a obtenção de produtos que não apresentam risco à saúde humana (MIGUEL; MARTÍN; COCERO, 2006).

1.3.6.1 Aplicação do CO₂ supercrítico na área farmacêutica

No campo farmacêutico a aplicação do CO₂ supercrítico tem sido apontada como o FSC mais vantajoso, seja para a micronização ou para o controle de polimorfismo, entre outros usos (MORIBE; TOZUKA; YAMAMOTO, 2008). Outra vantagem do uso de CO₂ supercrítico é a facilidade de sua remoção de materiais poliméricos, pois quando o processo é finalizado e, mesmo que uma pequena quantidade de gás fique preso à matriz polimérica, não proporciona riscos à saúde devido suas propriedades atóxicas (AYMONIER et al., 2006; YILDIZ et al., 2007; YASUJI; TAKEUCHI; KAWASHIMA, 2008).

A utilização do fluido supercrítico (FSC) na área farmacêutica cresceu bastante nos últimos anos impulsionada pelas suas aplicações na geração de produtos para uso alimentício, cosmético, terapêutico e analítico. Portanto, sem dúvida nenhuma, a área de maior crescimento em aplicações dos FSC foi a indústria farmacêutica (CARRILHO TAVARES; LANÇAS, 2006).

O FSC pode ser aplicado em compostos a fim de melhorar a solubilidade de fármacos lipofílicos favorecendo a comercialização de vários produtos farmacêuticos (PERRUT, 2000; CARRILHO TAVARES; LANÇAS, 2006; YASUJI; TAKEUCHI; KAWASHIMA, 2008). Duas das grandes vantagens do emprego do fluido supercrítico residem no fato de que requerem pouco ou nenhum solvente orgânico e pouco ou nenhum aquecimento na produção das partículas.

1.3.7 Formação de micro e nanopartículas empregando fluido supercrítico

Inúmeras técnicas de micronização e encapsulamento têm sido relatadas na literatura levando em consideração as características específicas do fluido supercrítico como, por exemplo, a fácil manipulação da densidade destes fluidos. Estas técnicas podem ser divididas em 3 categorias principais, sendo que a maioria emprega CO₂ como fluido pressurizado, seja como: solvente (RESS), soluto (PGSS) e anti-solvente (SFEE, GAS, SAS, PCA, ASES e SEDS) (FRANCESCHI, 2009; BOSCHETTO, 2013).

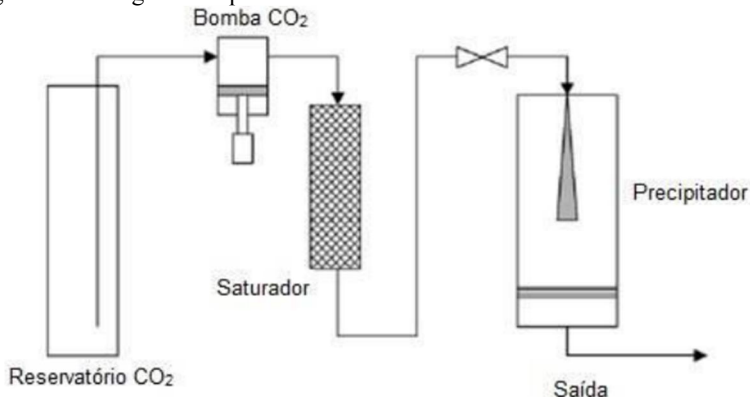
1.3.7.1. CO₂ supercrítico como solvente

O método que utiliza o fluido supercrítico como solvente é chamado de Rápida Expansão de Soluções Supercríticas (RESS). Este método resumidamente consiste basicamente em dissolver o soluto de interesse em um solvente (fluido supercrítico) e, então, precipitar esse soluto por meio da rápida expansão da mistura (TOM; DEBENEDETTI, 1991).

O processo RESS é constituído em 2 passos. No primeiro passo ocorre uma extração onde o fluido supercrítico é saturado como substrato de interesse. Nesta etapa é explorado o alto poder solvente do fluido supercrítico. Esta extração é seguida por uma etapa de despressurização brusca por meio de um bocal ejetor que produz uma grande diminuição no poder solvente e na temperatura do fluido,

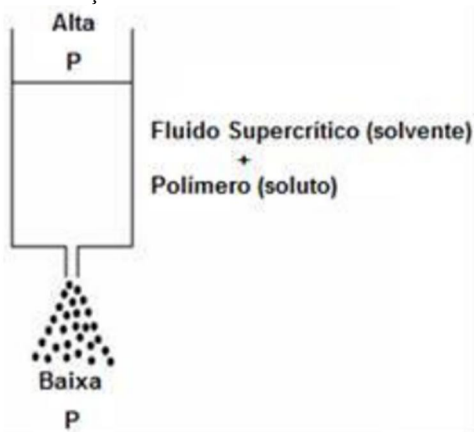
causando assim a precipitação do soluto (TURK et al., 2002; COCERO et al., 2009; BOSCHETTO, 2013). A redução do poder solvente do fluido supercrítico devido à despressurização - se esta for grande - leva à supersaturação do soluto, que é produzida por uma perturbação mecânica que se propaga à velocidade do som, resultando em partículas (DEBENEDETTI et al., 1993 BOSCHETTO, 2013). A figura 1.3 mostra o diagrama esquemático e a figura 1.4 fundamento da técnica que apresenta a expansão por meio do bocal.

Figura 1.1 - Diagrama esquemático da técnica RESS.



FONTE: Martin e Cocero, (2008); Yeo e Kiran, (2005); Boschetto, (2013).

Figura 1.2 - Fundamentação da técnica RESS.



FONTE: Martin e Cocero, (2008); Yeo e Kiran, (2005); Boschetto, (2013).

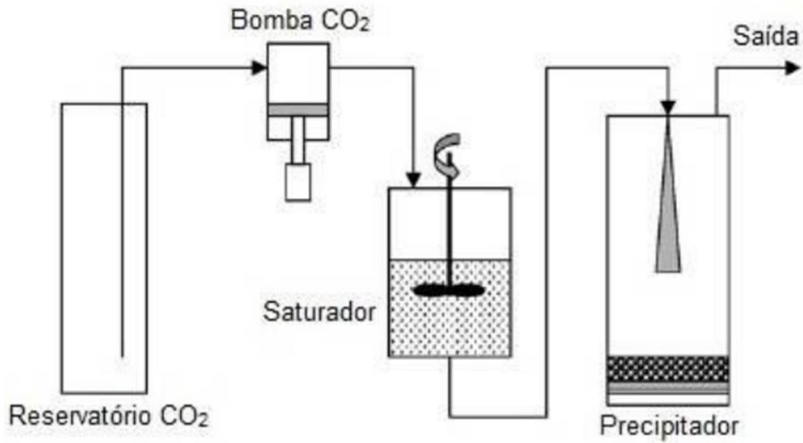
A principal desvantagem deste método é a baixa solubilidade de muitas substâncias nos fluidos supercríticos, fato que pode ser atenuado com a adição de cossolvente, porém, perde-se a vantagem da eliminação total de solvente orgânico (JUNG; PERRUT, 2001; REVERCHON, 1999; BOSCHETTO, 2013). Entretanto, Asghari e Esmaeilzadeh (2012) realizaram experimentos com e sem cossolvente e verificaram que os experimentos com a técnica RESS com adição de acetona como cossolvente resultaram em partículas ainda menores do que aquelas em que foi empregado apenas o fluido supercrítico como solvente.

1.3.7.2. Fluido supercrítico como soluto

A denominada técnica PGSS (*Particles From Gas Saturated Solutions*) utiliza o fluido sub ou supercrítico como soluto. Esta técnica é a mais adequada para recristalização de compostos sólidos que não são solúveis em fluidos supercríticos. Mas deve ser destacado que é industrialmente é aplicada para materiais não poliméricos, porém a PGSS é adequada para materiais poliméricos devido ao fato de que a maioria dos polímeros não é solúvel em fluidos supercríticos (YEON; KIRAN, 2005).

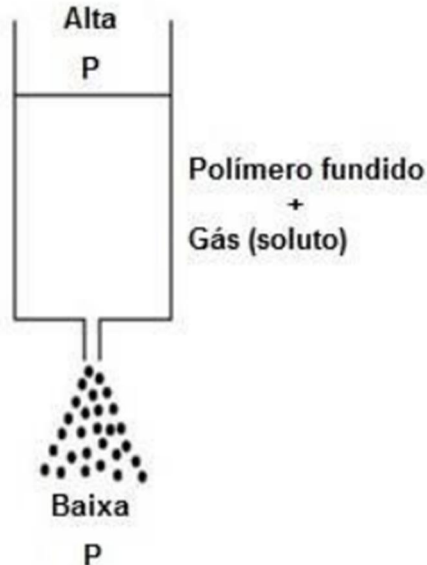
A técnica PGSS assim com a RESS consiste em dois passos básicos. No primeiro ocorre a saturação do soluto com o fluido supercrítico. No segundo, a solução saturada é expandida por meio de um bocal, o que leva à formação de partículas pelo intenso resfriamento, causado pela liberação do fluido supercrítico. Nesta técnica há possibilidade de obter partículas sólidas ou líquidas (dependendo do sistema) (MARTÍN; COCERO, 2008). A figura 1.5 apresenta um diagrama esquemático do processo e a figura 1.6 a fundamentação do processo.

Figura 1. 3 - Diagrama esquemático da técnica PGSS.



FONTE: Martin e Cocero, (2008); Yeo e Kiran, (2005); Boschetto, (2013).

Figura 1. 4 - Fundamentação da técnica PGSS.



FONTE: Martin e Cocero, (2008); Yeo e Kiran, (2005); Boschetto, (2013).

Por fim, a técnica PGSS é promissora para impregnação de ingredientes ativos em matrizes poliméricas. Os princípios envolvem

separação de fases induzida por pressão, temperatura e solvente (FRANCESCHI, 2009).

A vantagem do PGSS desta técnica é que ocorre a utilização de baixa demanda de fluido supercrítico e pressão reduzida de operação que varia entre 100 e 200 bar. Porém, o fato de que poucas substâncias podem ser fundidas a altas temperaturas se há ocorrência de alterações químicas ou físicas limita a utilização do PGSS (FRANCESCHI, 2009).

1.3.7.3. Fluido supercrítico como antissolvente

Na classe do fluido supercrítico como antissolvente existem inúmeras técnicas, tais como: GAS, SAS, PCA, SEDS e ASES. As técnicas que empregam o método de fluido supercrítico como antissolvente provocam a precipitação do(s) substrato(s) dissolvido(s) inicialmente em uma solução orgânica. Os diferentes processos que utilizam o fluido pressurizado como antissolvente são empregados para compostos que são praticamente insolúveis e para fluidos supercríticos. A principal diferença entre as técnicas desta classe é a maneira como ocorre o contato entre a solução orgânica e o antissolvente comprimido (FRANCESCHI, 2009; BOSCHETTO, 2013).

Segundo Franceschi (2009) o princípio das técnicas antissolventes reside no fato que o soluto seja completamente miscível no solvente orgânico e imiscível ou pouco miscível no antissolvente e, ainda, que o solvente orgânico possua uma afinidade maior pelo antissolvente do que pelo soluto, para que quando a solução contendo o soluto no solvente entre em contato com antissolvente, a solubilidade do soluto no solvente orgânico é drasticamente reduzida, devido ao antissolvente causar um decréscimo no poder de solvatação do solvente orgânico, levando à precipitação do soluto na forma particulada.

A técnica GAS (Gás antissolvente) foi o método pioneiro em empregar o fluido supercrítico como antissolvente. GAS foi descrito por Gallagher et al. (1989), que demonstraram que a taxa de adição de um gás antissolvente pode ser programada para controlar a morfologia, tamanho e distribuição de tamanho dos cristais sob uma ampla faixa (FRANCESCHI, 2009).

Em relação as vantagens da utilização da técnica GAS a principal vantagem e sua versatilidade, pois, selecionando apropriadamente o solvente é possível micronizar muitos produtos diferentes. Para ter sucesso no processo é necessário que o soluto seja solúvel em solvente orgânico e insolúvel no fluido supercrítico (MARTIN; COCERO, 2008).

O modo contínuo da técnica GAS é conhecido como ASES (Sistema de Extração de Solvente em Aerosol) ou também como SAS (Antissolvente Supercrítico). (BOSCHETTO, 2013). Nestes modos de processo, a solução e o antissolvente são adicionados simultaneamente em modo co-corrente por orifícios diferentes ou contracorrente para dentro da câmara de precipitação. O contato entre antissolvente e a solução é diferente, comparado com o método GAS (FRANCESCHI, 2009). Uma importante vantagem do modo contínuo e a produção em grande escala (YEO; KIRAN, 2005).

Outras técnicas que utilizam CO_2 como antissolvente são PCA e SEDS, que são similares as técnicas SAS e ASES, possuem praticamente a mesma configuração. O método PCA ao contrário do GAS, a câmara de precipitação é carregada com o antissolvente comprimido e a solução é aspergida para o interior da câmara contendo o antissolvente (BOSCHETTO, 2013).

Na técnica SEDS, a solução líquida contendo o soluto, o solvente orgânico e o fluido supercrítico são pulverizados em conjunto pelo injetor coaxial. O fluido supercrítico é utilizado tanto como antissolvente como meio de dispersão para a solução (YEO, KIRAN, 2005).

1.3.7.3.1. SEDS - Solution Enhanced Dispersion with Supercritical Fluid

Na técnica SEDS (“*Solution Enhanced Dispersion with Supercritical Fluid*” traduzido para o português como “Dispersão de Solução Aumentada por Fluidos Supercríticos”) o fluido supercrítico (FSC) desempenha o papel de agente antissolvente para soluções de polímero e agente de dispersão. Como já foi mencionado, o processo SEDS é semelhante ao processo SAS, porém o que difere de ambos os métodos é o desenho do bico injetor de ambos os processos. O bico injetor do SEDS apresenta uma concepção coaxial com uma extensão de mistura o que melhora a transferência de massa e liberação simultânea da mistura (HANNA; YORK, 2002).

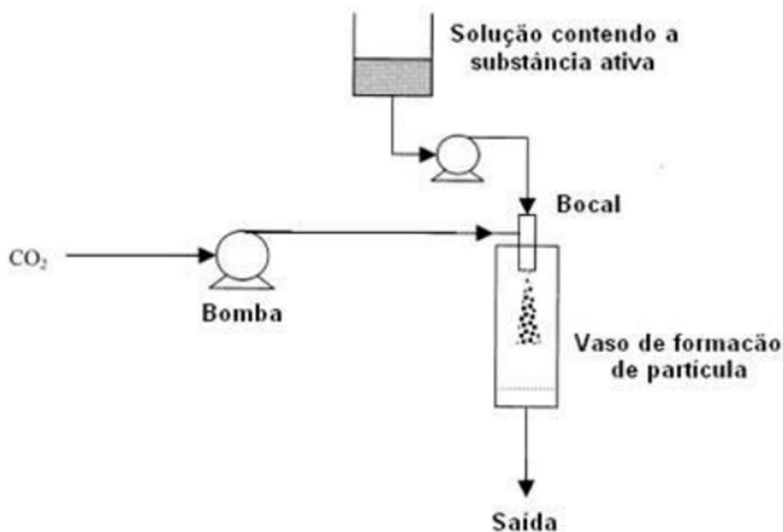
A técnica SEDS [Figura 1.5-6] envolve a aplicação da solução orgânica em CO_2 supercrítico para precipitar o soluto. Neste processo, o CO_2 é liquefeito por meio do sistema de arrefecimento e em seguida bombeado para dentro do vaso de precipitação por meio do duto externo do bico coaxial. A pressão do vaso é regulada e quando a taxa de fluxo de CO_2 supercrítico atinge os valores desejados, a solução do composto é liberada para câmara de precipitação por meio do duto interno do bico

coaxial (PALAKODATY; YORK, 1999; EDWARD et al., 2001; JUPPO; BOISSIER; KHOO, 2003; KANG et al., 2008; TABERNERO et al., 2012).

As principais características do processo SEDS são: a solução e o fluido supercrítico são cointroduzidas num jato com alta velocidade; o fluxo turbulento do FSC acelera o processo de formação tanto de mistura quanto de partículas; a composição do solvente e do material e do fluxo FSC é fixado, fato que auxilia condições de formação de partículas em processo uniforme e contínuo (YOSHIDA, 2014).

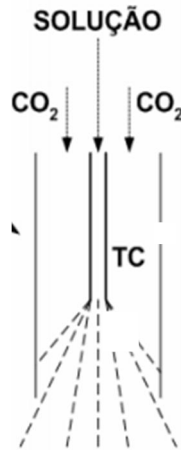
Por fim, vale ressaltar que no método SEDS é importante considerar os diferentes aspectos teóricos e experimentais, tais como equilíbrio de fases, cinética de nucleação, dinâmica do fluido e transferência de massa (MARTÍN; COCERO, 2004; REVERCHON et al., 2010). O comportamento de fase do sistema sólido-solvente-antissolvente deve ser conhecido para determinar as condições da mistura, as quais podem ser monofásica (fase supercrítica) ou binária (líquido-vapor) (REVERCHON; DE MARCO, 2004; FRANCESCHI et al., 2008).

Figura 1. 5 - Diagrama esquemático da técnica SEDS.



FONTE: Jung e Perrut (2001); Yeo e Kiran (2005).

Figura 1. 6 - Diagrama esquemático da técnica SEDS.



FONTE: FRANCESCHI (2009).

A Tabela 1.1 apresenta as subdivisões da tecnologia de FSC e foi organizado a fim de apontar as categorias, tipos dos processos, o uso ou não de solvente, principais fatores críticos e a granulometria das partículas que podem ser produzidas.

Tabela 1. 1 - Diferentes métodos de encapsulamento e micronização que utilizam SC-CO₂.

Categoria do FSC	Nome do Processo	Solvent e Orgânico	Processo	Fatores Críticos	Tipo de Partículas Produzidas	Referência
SC-CO₂ como solvente	RESS	Não	Contínuo	A, b, c, d	Micro ou nanopartícula e partículas compostas	Türk et al. (2002) Krukonis (1984)
	RESOLV	Não	Contínuo	A, b, c, d, e, f	Nanopartículas	Meterc et al. (2008)
	RESAS	Não	Contínuo	A, b, c	Nanopartículas	Young et al. (2003) Young et al. (2000)
	RESS-SC ou CSS	Não	Descontínuo	A, b, c, h, i	Nanopartículas	Thakur et al. (2006) Sun et al. (1998)
	SSI	Não	Descontínuo	a, b, c, h, i	Partículas de polímero impregnada com fármaco	Kikic; Vecchio ne (2003)
SC-CO₂ como Antissolvente	SAS	Sim	Semicontínuo	a, i, j	Micro ou nanopartícula e partículas compostas	Reverchon et al. (2007) Reverchon et al. (2010)
	GAS	Sim	Contínuo	a, i, j	Micro ou nanopartícula e partículas compostas	Warwick et al. (2000) Warwick et al. (2002)
	ASES	Sim	Semicontínuo	a, b, c, i, j	Micro ou nanopartícula e partículas	Müller; Fischer (1989)

					compostas	
	SAS-DEM	Sim	Semicontínuo	a, i, j, m	Micro ou nanopartícula compostas	Sanganwar et al. (2010) Sathigari et al. (2011)
	SAS-EM	Sim	Semicontínuo	b, f, j	Nanopartículas ou nanoflakes	Jin et al. (2012)
	SEDS	Sim	Semicontínuo	a, b, c, i, j	Micro ou nanopartícula e partículas compostas	Hanna; York(2002) Boschetto et al. (2014)
	ASAIS	Sim	Semicontínuo	a, c i, j	Micropartícula e partículas compostas	Rodrigues et al. (2011)
	PCA	Sim	Contínuo	b, j	Micro ou nanopartícula e partículas compostas	Snavely et al. (2002)
	SFEE	Sim	Contínuo	a, f, i, j	Micropartícula e partículas compostas	Yasuji et al. (2008)
Outros – não dependem do poder solvente do SC-CO₂	PGSS	Não	Contínuo ou Descontínuo	c, n	Micro ou nanopartículas e partículas compostas	Weidner et al. (1994)
	CPF	Sim	Contínuo	b, f, j	Pós secos, de fluxo livre e com teor elevado de líquidos	Weidner et al. (1997)
	CPCSP	Não	Contínuo ou Descontínuo	b, c, i, j, o	Pós revestidos	Weidner et al. (2001)
	CAN-BD	Água e/ou álcool	Contínuo	b, c, e	Nanopartículas e partículas	Sievers et al. (2003)

					compostas	
	SAA	Sim	Contínuo	c, e, i, j, n, o	Micropartículas e partículas compostas	Reverchon et al. (2007)
	SEA	Não	Contínuo	c, i, j	Micropartículas e partículas compostas	Padrela et al. (2010)
	PGSS <i>drying</i>	Sim	Contínuo	f, l, o	Micropartículas	Weidner et al. (2000) Meterc et al. (2007) Meterc et al. (2008)
	DELOS	Sim	Descontínuo	b, c, d, h, i	Micro ou nanopartículas	Ventosa et al. (2001)

*Fatores do FSC para produção de partículas: (a) solubilidade do material no FSC, (b) condições da pré-expansão, (c) dispositivo de pulverização, (d) agregação do material particulado, (e) tipo de solvente, (f) escolha do agente plasticização, (g) propriedade de difusão, (h) propriedades eutéticas, (i) extração solvente, (j) transferência de massa, (l) viscosidade, (m) propriedades do material de suporte e do líquido, (n) concentração da solução líquida, (o) escolha da temperatura. Fonte: Adaptada de (Yoshida, 2014).

1.3.8 Resíduos de solvente em fármacos

No processo de fabricação de formulações de compostos farmacêuticos e a síntese química de excipientes e fármacos é necessário a utilização de uma elevada quantidade de solventes orgânicos, que nem sempre são completamente removidos durante os processos de fabricação. Estes solventes, além de não apresentarem valor terapêutico, representam risco de toxicidade para o consumidor. O ideal que o resíduo de solvente seja o menor possível no produto final (*United States Pharmacopeia*, 2009; *International Conference on Harmonization*, 1997).

Solventes residuais em produtos farmacêuticos são definidos pelo *International Conference on Harmonization* (ICH) como produtos químicos orgânicos voláteis que são usados ou produzidos no processamento de medicamentos. A seleção apropriada do solvente para

a síntese de fármaco pode melhorar o rendimento ou determinar características tais como cristalinidade, pureza e solubilidade. Portanto, o solvente pode, por vezes, ser um parâmetro crítico do processo (*International Conference on Harmonization*, 2011). Na indústria farmacêutica são tipicamente utilizados cerca de 60 solventes diferentes. Neste conjunto abrangem uma grande variedade de pontos de ebulição e polaridades. De acordo com as orientações do *International Conference on Harmonization*, estes solventes são divididos em classes (JACQ; DAVID; SANDRA, 2008).

O nível máximo de solventes presentes em fármacos permitido internacionalmente segue as diretrizes do Guia para solventes residuais do *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH). ICH classifica os solventes residuais em três categorias que estão relacionadas aos riscos potenciais de toxicidade.

A classe 1, solventes que devem ser evitados, inclui os solventes que são considerados mais tóxicos (benzeno, tetracloreto de carbono, dicloroetano, dicloroeteno e tricloroeteno) e seu uso deve ser evitado na produção de fármacos, a menos que seja fortemente justificado por uma avaliação de risco-benefício. Nas classes 2 e 3 os solventes são considerados de menor risco, sendo a classe 2 dita como solventes que devem ser limitados e solventes da classe 3 são solventes com baixo potencial tóxico (*United States Pharmacopeia*, 2009; *International Conference on Harmonization*, 1997). Os solventes das classes 1, 2 e 3 com seus respectivos dados de limite máximo se encontram na tabela 1.2, 1.3 e 1.4.

Tabela 1.2 - Solventes residuais classe 1.

Classe 1 - Solventes que devem ser evitados	
Solvente	Limite de concentração
1,1,1-tricloroetano	1500 ppm
1,1-dicloroetano	8 ppm
1,2-dicloroetano	5 ppm
Benzeno	2 ppm
Tetracloroeto de carbono	4 ppm

Fonte: *International Conference on Harmonization* (2011).

Tabela 1.3 - Solventes residuais classe 2.

Classe 2 - Solventes que devem ser limitados	
Solvente	Limite de concentração
1,1,2-tricloroetano	80 ppm
1,2-dicloroetano	1870 ppm
1,2-dimetoxietano	100 ppm
1,4-dioxana	380 ppm
2-etoxietanol	160 ppm
2-metoxietanol	50 ppm
Acetonitrila	410 ppm
Ciclohexano	3880 ppm
Clorobenzeno	360 ppm
Clorofórmio	60 ppm
Diclorometano	600 ppm
Etilenoglicol	620 ppm
Formamida	220 ppm
Hexano	290 ppm
Metanol	3000 ppm
Metilbutilcetona	50 ppm
Metilciclohexano	1180 ppm
N,N-dimetilacetamida	1090 ppm
N,N-dimetilformamida	880 ppm
Nitrometano	50 ppm
N-metilpirrolidona 1	530 ppm
Piridina	200 ppm
Sulfolane	160 ppm
Tetrahidrofurano	720 ppm
Tetralin	100 ppm
Tolueno	890 ppm
Xileno	2170 ppm

Fonte: *International Conference on Harmonization* (2011).

Tabela 1.4 - Solventes residuais classe 3.

Classe 3 - Solventes com baixo potencial tóxico	
Solvente	Limite de concentração
1-butanol	Sem especificação
1-pentanol	Sem especificação
1-propanol	Sem especificação
2-butanol	Sem especificação
2-metil-1-propanol	Sem especificação
2-propanol	Sem especificação
3-metil-1-butanol	Sem especificação
Acetato de butila	Sem especificação
Acetato de etila	Sem especificação
Acetato de isobutila	Sem especificação
Acetato de isopropila	Sem especificação
Acetato de metila	Sem especificação
Acetato de propila	Sem especificação
Acetona	Sem especificação
Ácido acético	Sem especificação
Ácido fórmico	Sem especificação
Anisol	Sem especificação
Cumeno	Sem especificação
Dimetil sulfóxido	Sem especificação
Etanol	Sem especificação
Éter etílico	Sem especificação
Formato de etila	Sem especificação
Heptano	Sem especificação
Metiletilcetona	Sem especificação
Metilisobutil cetona	Sem especificação
Pentano	Sem especificação
Tert-butilmetil éter	Sem especificação

Fonte: *International Conference on Harmonization* (2011).

No Brasil, o teste de solventes residuais somente se tornou obrigatório por meio da resolução RDC nº 57 de 18 de novembro de 2009, a qual visa regulamentar o registro de insumos farmacêuticos ativos no Brasil e aprimorar o controle de qualidade desses produtos. Uma das principais técnicas bastante utilizadas a fim de analisar a presença ou ausência de solvente residual é a cromatografia gasosa de alta resolução/espectrometria de massa (CG-EM), empregando um amostrador automático (Headspace). Esta técnica é suficientemente sensível para detectar a presença ou não de solventes residuais (JACQ; DAVID; SANDRA, 2008).

1.3.9 Zebrafish

Um dos organismos modelo mais utilizados para estudo de fármacos são os roedores (camundongos e ratos), porém recentemente o *zebrafish* foi introduzido com êxito no cenário científico (KALUEFF et al. 2014). O *zebrafish* ou peixe-zebra (*Danio rerio*) é um peixe bastante conhecido pelo seu uso ornamental. Mas nos últimos vinte anos, essa espécie tem se consolidado em diversas áreas das ciências biológicas e da saúde. As vantagens do uso do *zebrafish* em relação aos demais organismos modelo são: pequeno porte, fácil manipulação e manutenção, baixo custo e alta taxa de reprodução (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012). Outra vantagem importante é que os genes do *zebrafish* são evolutivamente conservados e apresentam um alto grau de similaridade com os genes humanos e de roedores (BARBAZUK et al., 2000).

As pesquisas que utilizam o *zebrafish* como organismo modelo vêm sendo expandidas para diversas áreas do conhecimento incluindo bioquímica (TAYLOR et al., 2004), neurociências (EDWARDS; MICHEL, 2002), toxicologia (HILL et al., 2005), farmacologia (GOLDSMITH et al., 2004) e comportamento (PIATO et al., 2011).

No que diz respeito à biologia do comportamento são estudados diversos parâmetros como comportamento social (BASS; GERLAI, 2008), ansiedade (MOCELIN et. al., 2015; MARCON et al., 2016), ciclo sono/vigília (CIRELLI; TONONI, 2000); aprendizagem e memória (COLWILL, 2005), entre outros.

1.4 Considerações a respeito do estado da arte

A biodisponibilidade de fármacos na forma sólida está fortemente ligada ao tamanho da partícula, à distribuição da partícula, estrutura cristalina e à sua morfologia. Portanto, as indústrias química e farmacêutica vêm cada vez mais buscando tecnologia eficiente para micronização de compostos. Neste cenário, existem inúmeros métodos de micronização: secagem por pulverização, liofilização, moagem entre outros. Porém, nos últimos tempos, devido à constante busca em utilizar tecnologias que provoquem menos impactos ambientais tem aumentado o interesse da utilização da micronização por meio de técnicas alternativas, sendo umas delas a utilização de fluido supercrítico. A busca por técnicas alternativas ocorre também devido ao fato que as técnicas tradicionais apresentam algumas desvantagens como a produção de partículas com ampla distribuição de tamanho de partícula e a degradação do composto e, em alguns casos, uso excessivo de solventes.

As vantagens da redução do tamanho de partícula apresentam inúmeros benefícios sendo que um dos mais importantes é o aumento da biodisponibilidade do composto, visto que com a redução do tamanho de partícula aumenta-se a área de superfície de contato, fato que promove o aumento na biodisponibilidade pois, segundo Durán et al. (2010), uma alta biodisponibilidade (até 100%) de um fármaco pode ser obtida com partículas com diâmetro médio entre 200 a 400 nm.

No presente trabalho, os compostos utilizados podem oferecer grande oportunidade visto que o processo de micronização irá provocar a redução do tamanho de partícula o que poderá aumentar a biodisponibilidade do fármaco, possibilitando inúmeras aplicações que antes não seriam possíveis.

Os modelos biológicos são importantes para aprofundar os conhecimentos das causadas de doenças e além de possibilitar testes com novos medicamentos e novas formulações (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012). No caso do presente trabalho, os modelos biológicos escolhidos serão ferramentas úteis para estudar os compostos trans-resveratrol e NAC, micronizados pela técnica SEDS e avaliar e comparar os efeitos em relação aos compostos não processados por SEDS, ou seja, sua versão comercial disponível. Além de possibilitar avaliação da concentração mínima dos compostos micronizados capaz de apresentar efeito biológico.

Fato importante a ser ressaltado é que há escassez de trabalhos na área de micronização que avaliam além da estrutura cristalina,

velocidade de dissolução e solubilidade. Para isso, é emergente que seja priorizada, além das análises anteriores, a necessidade de mais testes *in vitro* e, principalmente, *in vivo* das propriedades biológicas que podem ser modificadas e melhoradas. Assim, o presente trabalho tem por objetivo inovar ao avaliar os compostos micronizados por fluido supercrítico. Dessa forma, a inovação *in vivo* constituirá na avaliação do composto NAC em testes que avaliam o efeito ansiolítico a fim de verificar possíveis melhorias como a redução da dosagem terapêutica, visto que a literatura já demonstra que o composto NAC apresenta efeito tipo ansiolítico. Porém, objetivamos neste trabalho reduzir a dosagem do composto obtendo nova dosagem mínima que apresente efeito *in vivo*, ou seja, aumentar a potência do composto.

As principais justificativas para utilização do *zebrafish* como modelo biológico é que os peixes são de pequeno porte, de manutenção fácil, econômicos para criação, com alta taxa de produtividade, além de seu genoma apresentar importante homologia com mamíferos. Desse modo, o *zebrafish* constitui excelente modelo experimental para estudos comportamentais, genéticos, toxicológicos e para desvendar o mecanismo de diversas doenças humanas bem como testar novos agentes terapêuticos e novas formulações (LIESCHKE; CURRIE, 2007; KARI; RODECK; DICKER, 2007; SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012). Neste contexto, a utilização de camundongos para modelo de Alzheimer consiste no fato de ser modelo consolidado para estudo de doenças neurodegenerativas (FERREIRA; HOCHAMAN; BARBOSA, 2005).

1.5 Referências bibliográficas

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC nº 57 de 18 de novembro de 2009**. 2009.

AHMED, T.; JAVED, S.; JAVED, S.; TARIQ, A.; ŠAMEC, D.; TEJADA, S.; NABAVI, S.F.; BRAIDY, N.; NABAVI, S.M. Resveratrol and Alzheimer's Disease: Mechanistic Insights. **Mol. Neurobiol.** 2016.

AMRI, A.; CHAUMEIL, J. C.; SFAR, S.; CHARRUEAU, C. Administration of Resveratrol: What Formulation Solutions to Bioavailability Limitations?. **Journal of Controlled Release**, v.158, n.2, p.182-193, 2012.

ANGELO, P. M.; JORGE, N.. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 1-9, 2007.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN Jr., L.V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6.ed. São Paulo: Premier. p.65-112, 201-227, 283-286, 2000.

ASENSI, M.; MEDINA, I; ORTEGA, A.; CARRETERO, J.; BAÑO, M. C.; OBRADOR, E.; ESTRELA, J. M.; Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. **Free Radical Biol. Med**, v.33, p.387, 2002.

ASGHARI, I.; ESMAEILZADEH, F. Formation of ultrafine deferasirox particles via rapid expansion of supercritical solution (RESS process) using Taguchi approach. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 433, p. 149– 156, 2012.

ASSUNÇÃO, L. S.; FERREIRA, C. D.; CONCEIÇÃO, E. J. L.; NUNES, I. L. ESTUDO PROSPECTIVO SOBRE ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS. **Revista GEINTEC**, v.4, n.4, p.1382-1391, 2014.

AYMONIER, C.; SERANI, A.L.; REVERÓN, H.; GARRABOS, Y.; CANSELL, F. Review of supercritical fluids in inorganic materials science. **J. Supercrit. Fluids.**, v. 38, p. 242-251, 2006.

BARBER, O.; KEUTER, J.; KRAVIG, K. A logical stepwise approach to laser diffraction particle size distribution analysis methods development and validation. **Pharm. Dev. Technol.**, Monticello, v.3, n.2, p.153-161, 1998.

BARCELLOS, L.J.G.; RITTER, F.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; SILVA, L.; BEDIN, A.C.; FINCO, J.; CERICATO, L. Wholebody cortisol increases after direct and visual contact with a predator in zebrafish *Danio rerio*. **Aquaculture**. v.272, p.774–778, 2007.

BASS, S.L.S.; GERLAI, R. Zebrafish (*Danio rerio*) responds differentially to stimulus fish: the effects of sympatric and allopatric predators and harmless fish. **Behav Brain Res**. v.186, p.107-117, 2008.

BAVARSAH SHAHRIPOUR, R.; HARRIGAN, M.R.; ALEXANDROV, A.V. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. **Brain Behav.**, v.4, p.108–122, 2014.

BENTZLEY, J.P.; TOMKO, R.L.; GRAY KM. Low Pretreatment Impulsivity and High Medication Adherence Increase the Odds of Abstinence in a Trial of N-Acetylcysteine in Adolescents with Cannabis Use Disorder. **J Subst Abuse Treat**. v.63, p.72-7, 2016.

BERGINK, V.; VAN MEGEN, H.J.G.M.; WESTENBERG, H.G.M. Glutamate and anxiety. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v.14, n.3, p.175–183, 2004.

BERK, M.; DEAN, O.; COTTON, S.M.; GAMA, C.S.; KAPCZINSKI, F.; FERNANDES, B.S.; KOHLMANN, K.; JEAVONS, S.; HEWITT, K.; ALLWANG, C.; COBB, H.; BUSH, A.I.; SCHAPKAITZ, I.; DODD, S.; MALHI, G.S. The efficacy of N-acetylcysteine as an adjunctive treatment in bipolar depression: an open label trial. **J. Affect. Disord.**, v.135, p.389–394, 2011.

BERK, M.; MALHI, G.S.; GRAY, L.J.; DEAN, O.M. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. **Trends Pharmacol Sci.**, v.34, n.3, p.167-77, 2013.

BOLHUIS, G.K. ; ZUURMAN, K. ; TE WIERIK, G.H.P. Improvement of dissolution of poorly soluble drugs by solid deposition on a super disintegrant. 11. The choice of super disintegrants and effect of granulation. **Eur. J. Pharm. Sei.**, Amsterdam, v.5, p. 63-69, 1997.

BOSCHETTO, D.L., **Encapsulamento de extrato de semente de uva, astaxantina e bixina utilizando a técnica SEDS**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina – SC, 2013.

BOTTOM, R. The role of modulated temperature differential scanning calorimetry in the characterization drugmolecule exhibiting polymorphic and glass forming tendencies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 192, p. 47-53, 1999.

BOVE, K.; LINCOLN, D. W.; TSAN, M. F. Effect of resveratrol on growth of 4T1 breast cancer cells in vitro and in vivo. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.291, p.1001, 2002.

BURNS, J.; YOKOTA, T.; ASHIHARA, H.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. J. Plant foods and herbal sources of resveratrol. **Agric. Food Chem.**, v.50, p.3337, 2002.

BRUNNER, G. Gas Extraction: **An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Applications to Separation processes..** 1ª. [S.l.]: ed. Darmstadt, v. 4, 1994.

CARRILHO, E.; TAVARES, M. C. H.; LANÇAS, F. M. Fluidos supercríticos em química analítica. III. Cromatografia com Fluido supercrítico: aplicações. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 790-795, 2006.

CARRILHO, E.; TAVARES, M. C. H.; LANÇAS, F. M.. Fluidos supercríticos em química analítica. I. Cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos. **Quim. Nova**, v. 24, n. 4, p. 509-515, 2001.

CIRELLI, C.; TONONI, G. Differential expression of plasticity-related genes in waking and sleep and their regulation by the noradrenergic system. **J Neurosci.** v.20, p.9187-9194, 2000.

COCERO, M. J.; MARTIN, A.; MATTEA, F.; VARONA, S. Review: Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 546-555, 2009.

COLWILL, R.M.; RAYMOND, M.P.; FERREIRA, L.; ESCUDERO, H. Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). **Behav Processes**. v.70, p.19-31, 2005.

CORTESE, B.M.; PHAN, K.L. The role of glutamate in anxiety and related disorders. **CNS Spectr.**, v.10, p.820–830, 2005.

COSTA, L.L. Avaliação do polimorfismo de fármacos utilizados para produção de medicamentos genéricos no brasil. Dissertação de mestrado. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, RS – Brasil**, 2005.

COSTA-CAMPOS, L., HERRMANN, A.P., PILZ, L.K., MICHELS, M., NOETZOLD, G., ELISABETSKY, E. Interactive effects of N-acetylcysteine and antidepressants. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v.44, p.125–130, 2013.

DEAN, O.; GIORLANDO, F.; BERK, M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. **J. Psychiatry Neurosci.**, v. 36 (2), p. 78–86, 2011.

DEBENEDETTI, P.G.; TOM, J.W.; YEO, S.D.; LIM, G.B. Application of Supersaturation fluids for the production of sustained delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 24, p. 27–44, 1993.

DEEPMALA, NULL; SLATTERY, J.; KUMAR, N.; DELHEY, L.; BERK, M.; DEAN, O.; SPIELHOLZ, C.; FRYE, R. Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: A systematic review. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.55, p.294–321, 2015.

EDWARD, A.D.; SHEKUNOV, B.Y.; KORDIKOWSKI, A.; FORBES, R.T.; YORK, P. Crystallization of pure anhydrous polymorphs of carbamazepin by solution enhanced dispersion with supercritical fluids (SEDS). **J. Pharm. Sci.**, v.90, p. 1115-1124, 2001.

EDWARDS, J.G.; MICHEL, W.C. Odor-Stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb. **J Comp Neurol.** v.454, p.294-309, 2002.

ESTENDEN, R. D.; Levy, M.; Klopp, S .J.; **Cancer Lett.**, v.147, p.109. 1999.

FERREIRA, L.M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M.V.J. Experimental models in research. **Acta Cir. Bras.**, v.20, p.28–34, 2005.

FILIP, V., PLOCKOVÁ M., ŠMIDRKAL, J., ŠPIČKOVÁ, Z., MELZUCH, K.; SCHMIDT, Š. Resveratrol and its Antioxidant and Antimicrobial Effectiveness. **Food Chemistry.**, v.83 (4), p. 585-593, 2003.

FRANCESCHI, E. Precipitação e encapsulamento de β -Caroteno em PHBV empregando tecnologia supercrítica. **Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)**. Universidade Federal de Santa Catarina – SC, 2009.

FRANCESCHI, E., CESARO, A. M., FEITEN, M., FERREIRA, S. R. S., DARIVA, C., KUNITA, M. H., RUBIRA, A. F., MUNIZ, E. C., CORAZZA, M. L., OLIVEIRA, J. V. Precipitation of β -carotene and PHBV and co- precipitation from SEDS technique using supercritical CO₂. **J. of Supercritical Fluids.**, v.47, p.259- 269, 2008.

FRANCESCHI, E.; KUNITA, M.H.; TRES, M.V.; RUBIRA, A.F.; MUNIZ, E.C.; CORAZZA, M.L. Phase behaviour nad process parameters effects on the characteristics of precipitated theophyllina using carbon dioxide as antisolvent. **J. Supercrit. Fluids**, v.44: p. 8-20, 2008.

FRANCIOSO, A.; MASTROMARINO, P.; RESTIGNOLI, R.; BOFFI, A.; d'ERME, M.; MOSCA, L. Improved Stability of trans-Resveratrol in Aqueous Solutions by Carboxymethylated (1,3/1,6)- β -D-Glucan. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 62, p. 1520-1525, 2014.

FUHRMAN, B.; LAVY, A.; AVIRAM, M.; Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. **Am. J. Clin. Nutr.** 61, 549, 1995.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Resveratrol modulation of signal transduction in apoptosis and cell survival: a mini-review. **Cancer Detect Prev.**, v.30, p.217, 2006.

GAUTAM, S. C.; XU, Y. X.; DUMAGUIN, M.; JANAKIRAMAN, N.; CHAPMAN, R. A. Resveratrol selectively inhibits leukemia cells: a prospective agent for ex vivo bone marrow purging. **Bone Marrow Transplant.**, v.25, p.639, 2000.

GE, J.F.; PENG, L.; CHENG, J.Q.; PAN, C.X.; TANG, J.; CHEN, F.H.; LI, J. Antidepressant-like effect of resveratrol: involvement of antioxidant effect and peripheral regulation on HPA axis. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 114–115, p. 64–69, 2013.

GERE-PÁSZTI, E.; JAKUS, J. The effect of N-acetylcysteine on amphetamine-mediated dopamine release in rat brain striatal slices by ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography. **Biomed. Chromatogr. BMC**, v.23, p.658–664, 2009.

GIRON, D. Thermal analysis and calorimetric methods in the characterization of polymorphs and solvates. **Thermochimica Acta**, v. 248, p. 1-59, 1995.

GRIEBEL, G.; HOLMES, A. 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.12, p.667–687, 2013.

GOLDSMITH, P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. **Curr Opin Pharmacol.** v.4, p.504-512, 2004.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A.; *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, 4^a ed., **Interamericana**: New York, p. 822, 1974.

HANNA, M.H.; YORK, P. Inventors; Method and apparatus for the formation of particles. Patent US Patent 20020073511A1. Jun 20 2002.

HASHIMOTO, K.; TSUKADA, H.; NISHIYAMA, S.; FUKUMOTO, D.; KAKIUCHI, T.; SHIMIZU, E.; IYO, M. Protective effects of N-acetyl-L-cysteine on the reduction of dopamine transporters in the striatum of monkeys treated with methamphetamine.

Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol., v.29, p.2018–2023, 2004.

HASTINGS, T.G. The role of dopamine oxidation in mitochondrial dysfunction: implications for Parkinson's disease. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v.41, p.469–472, 2009.

HE, W. Z.; SUO, Q. L.; JIANG, Z. H.; SHAN, A.; HONG, H. L. Precipitation of ephedrine by SEDS process using a specially designed prefilming atomizer. **Journal of Supercritical Fluids**, v.31, n.1, p.101-110, 2004.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. A review. **Food Chemistry**, v.98, p.136-148, 2006.

HERRMANN, A.P.; BENVENUTTI, R.; PILZ, L.K.; ELISABETSKY, E. N-acetylcysteine prevents increased amphetamine sensitivity in social isolation-reared mice. **Schizophr. Res.**, v.155, p.109–111, 2014.

HILL, A.J.; TERAOKA, H.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R.E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicol Sci.** v.86, p.6-19, 2005.

HOENER, B.; BENET, L. Z. Factors influencing drug absorption and drug availability. In: BANKER, G. S.; RHODES, C. T., eds. *Modern pharmaceuticals*. New York: Mareei Dekker, 1996. p.131-137. (**Drugs and the Pharmaceutical Sciences**, v.72).

HORTER, D.; DRESSMAN, J. B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. **Adv. Drug Delivery Rev.**, Amsterdam, v.46, p.75-87, 2001.

HURLEY, L. L.; AKINFIRESOYE, L.; KALEJAIYE, O.; TIZABI, Y. Antidepressant Effects of resveratrol in an animal model of depression. **Behavioural Brain Research**, v.268, p.1-7, 2014.

IGNATOWICZ, E.; BAER-DUBOWSKA, W. Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases. **Pol. J. Pharmacol.**, v.53 (6), p.557-69, 2001.

International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the registration of Pharmaceuticals for Human Use, Q3C: Impurities: Guideline for residual solvents.1997.

International Conference on Harmonization – ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. **Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C(R5).** February 2011.

JACQ, K.; DAVID, F.; SANDRA, P. A Generic Method for the Analysis of Residual Solvents in Pharmaceuticals Using Static Headspace-GC-FID/MS. **Agilent Technologies publication**, 5989-9726EN, 2008.

JIN, H.; HEMINGWAY, M.; GUPTA, R.B.; FEI XIA, Y.Z. Preparation of thalidomide nano -flakes by supercritical antisolvent with enhanced mass transfer. **Particuology**. v.10, p.17-23, 2012.

JUNG, H. J.; SEU, Y. B.; LEE, D. G. Candididal action of resveratrol isolated from grapes on human pathogenic yeast *C. albicans*. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v.17, p.1324. 2007.

JUNGHANNS, J. U.; MÜLLER, R. H. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. **Int. J. Nanomedicine**, v.3, p.295, 2008.

JUPPO, A.M.; BOISSIER, C.; KHOO, C. Evaluation of solid dispersion particles prepared with SEDS. **Int. J. Pharm.**, v.250 p.385-401, 2003.

KALUEFF, A.V.; STEWART, A.M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends Pharmacol Sci**. v.35(2), p.63-75, 2014.

KANG, Y.; YIN, G.; OUYANG, P.; HUANG, Z.; YAO, Y.; LIAO, X. Preparation, characterization, and in vitro release investigation of lutein/zein nanoparticle s via solution enhanced dispersion by supercritical fluids. **J. Colloid Interface Sci**. Jun; v.322(1): p.87-94, 2008.

KARI, G.; RODECK, U.; DICKER, A.P. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v.82, n.1, 2007.

KAU, K.S.; MADAYAG A.; MANTSCH J.R.; GRIER M.D.; ABDULHAMEED O.; BAKER D.A. Blunted cysteine–glutamate antiporter function in the nucleus accumbens promotes cocaine-induced drug seeking. **Neuroscience**, v.155(2), p.530–537, 2008.

KELLY, G. S. Clinical applications of N-acetylcysteine. **Altern Med Rev.**, v.3, p.114–27, 1998.

KESSLER, R.C. The global burden of anxiety and mood disorders: putting the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMED) findings into perspective. **J. Clin. Psychiatry**, v.68 Suppl 2, p.10–19, 2007.

KIKIC, I.; VECCHIONE, F. Supercritical impregnation of polymers. **Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.** v.7(4-5), p.399-405, 2003.

KOLEV, M.V.; RUSEVA, M.M.; HARRIS, C.L.; MORGAN, B.P.; DONEV, R.M. Implication of Complement System and its Regulators in Alzheimer's Disease. **Curr. Neuropharmacol.**, v.7, p.1–8, 2009.

KRUKONIS, V.J. Supercritical Fluid Nucleation of Difficult-to-Comminute Solids. **In Annual Meeting AIChE**. San Francisco: Annual Meeting AIChE. p.11. 1984.

KRYSTAL, J.H.; MATHEW, S.J.; D'SOUZA, D.C.; GARAKANI, A.; GUNDUZ-BRUCE, H.; CHARNEY, D.S. Potential psychiatric applications of metabotropic glutamate receptor agonists and antagonists. **CNS Drugs**, v.24(8): p.669–693, 2010.

LEE, R.W.; SHAW, J.M.; McSHANE, J.; WOOD, R.W. Particle size reduction. In: LIU, R, ed. *Water insoluble drug formulation*. **Boca Raton: Interpharm, CRC Press**, p.455-492, 2000.

LESLIE, S.W.; BROWN L.M.; TRENT R.D.; LEE Y.H.; MORRIS J.L.; JONES T.W.; RANDALL P.K.; LAU S.S.; MONKS T.J. Stimulation of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium entry

into dissociated neurons by reduced and oxidized glutathione. **Mol. Pharmacol.**, v.41, p.308–314, 1992.

LEVY, G. Effect of particle size on dissolution and gastrointestinal absorption rates of pharmaceutical. **Am. J. Pharm., Philadelphia**, v.135, p.78-92, 1963.

LI, F.; GONG, Q.; DONG, H.; SHI, J. Resveratrol, a neuroprotective supplement for Alzheimer's disease. **Curr. Pharm. Des.**, v.18, p.27–33, 2012.

LIESCHKE, J.G.; CURRIE, P.D. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. **Nature Reviews-Genetics**, v.8, n.5, 2007.

LIU, ZHANG, Q.; GU, J.; WANG, X.; XIE, K.; XIAN, X.; WANG, J.; JIANG, H.; WANG, Z. Resveratrol prevents impaired cognition induced by chronic unpredictable mild stress in rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v.49, p.21–29, 2014.

LOBO, J.M.; SCHIAVONE, H.; PALAKODATY, S.; YORK, P.; CLARK, A.; TZANNIS, S.T. SCF-engineered powders for delivery of budesonide from passive DPI devices. **J. Pharm. Sci.**, v.94(10): p.2276-2288, 2005.

LUSHCHAK, V.I. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. **J. Amino Acids**, 2012.

MARCON, M.; HERRMANN, A.P.; MOCELIN, R.; RAMBO, C.L.; KOAKOSKI, G.; ABREU, M.S.; CONTERATO, G.M.M.; KIST, L.W.; BOGO, M.R.; ZANATTA, L.; BARCELLOS, L.J.G.; PIATO, A.L. Prevention of unpredictable chronic stress-related phenomena in zebrafish exposed to bromazepam, fluoxetine and nortriptyline. **Psychopharmacology (Berl.)**, v.233, p.3815–3824, 2016.

MARTÍN, A.; COCERO, M.J. Micronization processes with supercritical fluids: Fundamentals and mechanisms. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.60 (3), p.339–350, 2008.

MARTÍN, A.; COCERO, M.J. Numerical modelling of jet hydrodynamics, mass transfer and crystallization kinetics in the

supercritical antisolvent (SAS) process. **J. Supercrit. Fluids.**, v.32, p.203-219, 2004.

MARTÍN, Á.; SCHOLLE, K.; MATTEA, F.; METERC, D.; COCERO, M.J. Production of Polymorphs of Ibuprofen Sodium by Supercritical Antisolvent (SAS) Precipitation. **Cryst. Growth Des.**, v.9, p.2504–2511, 2009.

MARTÍN, A. R.; VILLEGAS, I.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; LASTRA, C. A. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. **Br. J. Pharmacol.**, v.147, p.873, 2006.

MARTÍN, A., RODRÍGUEZ-ROJO, S., NAVARRETE, A., DE PAZ, E., QUEIROZ, J., COCERO, M. J. Post-extraction Processes: Improvement of Functional Characteristics of Extracts. In *Natural Product Extraction: Principles and Applications*. **RSC Publishing**, 2013.

METERC, D.; PETERMANN, M.; WEIDNER, E. Drying of aqueous green tea extracts using a supercritical fluid spray process. **J. Supercrit. Fluids.** v.45, p.253-259, 2008.

METERC, D.; PETERMANN, M.; WEIDNER, E. Extraction of green tea and drying with a high pressure spray process. **Hem. Ind.**, v.61, p.222-228, 2007.

MIAO, X.; SUN, C.; JIANG, T.; ZHENG, L.; WANG, T.; WANG, S. Investigation of nanosized crystalline form to improve the oral bioavailability of poorly water soluble cilostazol. **J. Pharm. Sci.**, v.14, p.196, 2011.

MIGUEL, F.; MARTÍN, A.; COCERO, M.J. Supercritical anti solvent precipitation of lycopene: Effect of the operating parameters. **Journal Supercritical Fluids**, v.36 (3), p.225–235, 2006.

MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STRØMME, M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. **Progress in Materials Science**, v.57, n.875, 2012.

MINARINI, A.; FERRARI, S.; GALLETI, M.; GIAMBALVO, N.; PERRONE, D.; RIOLI, G.; GALEAZZI, G.M. N-acetylcysteine in the treatment of psychiatric disorders: current status and future prospects. **Expert Opin Drug Metab Toxicol.** v.2, p.1-14, 2016.

MOCELIN, R.; HERRMANN, A.P.; MARCON, M.; RAMBO, C.L.; ROHDEN, A.; BEVILAQUA, F.; ABREU, M.S.; ZANATTA, L.; ELISABETSKY, E.; BARCELLOS, L.J.; LARA, D.R.; PIATO, A.L. N-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. **Pharmacol Biochem Behav.** 2015.

MORIBE, K.; TOZUKA, Y.; YAMAMOTO, K. Supercritical carbon dioxide processing of active pharmaceutical ingredients for polymorphic control and for complex formation. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.60, p.328-338, 2008.

MOSHARRAF, M.; NYSTROM, C. The effect of particle size and shape on the surface specific dissolution rate of micronized practically insoluble drugs. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.122, p.35-47, 1995.

MÜLLER, B.W.; FISCHER, W. Inventors; Verfahren zur Herstellung einer mindestens einen Wirkstoff und einen Träger umfassenden Zubereitung. patent German Patent Appl. No. DE 3,744,329, 1989.

NALAWADE, S.P.; PICCHIONI, F.; JANSSEN, L.P.B.M. Supercritical carbon dioxide as a green solvent for processing polymer melts: Processing aspects and applications. **Progress in Polymer Science**, v.31, p. 19-43, 2006.

NOCITO ECHEVARRIA, M.A.; ANDRADE REIS, T.; RUFFO CAPATTI, G.; SICILIANO SOARES, V.; DA SILVEIRA, D.X.; MARQUES FIDALGO, T. N-acetylcysteine for treating cocaine addiction - A systematic review. **Psychiatry Res.** v.11(251), p.197-203, 2017.

NOLIN, T.D.; MCMENAMIN, M. E.; HIMMELFARB, J. Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, and glutathione in human plasma by high-performance liquid chromatography: application to studies of oxidative stress. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.852, n.1-2, p.554-561, 2007.

OGLE, W. O.; SPEISMAN, R.B.; ORMEROD, B.K. Potential of treating age-related depression and cognitive decline with nutraceutical approaches: a mini-review. **Gerontology**, v. 59, p.23–31, 2013.

OLAS, B.; WACHOWICZ, B.; Resveratrol, a phenolic antioxidant with effects on blood platelet functions. **Platelets**, v.16, p.251, 2005.

OKAMURA, A.M.; GOMES, P.X.; DE OLIVEIRA G.V.; DE ARAÚJO, F.Y.; TOMAZ, V.S.; CHAVES FILHO, A.J.; DE SOUSA, F.C.; VASCONCELOS, S.M.; DE LUCENA, D.F.; MACÊDO, D. N-acetylcysteine attenuates nicotine-induced kindling in female periadolescent rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v.3(67), p.58-65, 2016.

OLSSON, B.; JOHANSSON, M.; GABRIELSSON, J; BOLME, P. Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine. **Eur J Clin Pharmacol**; v.34, p.77–82, 1988.

PADRELA, L; RODRIGUES, M.A.; VELAGA, S.P.; FERNANDES, A.C.; MATOS, H.A.; AZEVEDO, E.G. Screening for pharmaceutical cocrystals using the supercritical fluid enhanced atomization process. **J. Supercrit. Fluids**. v.53, p.156-164, 2010.

PALAKODATY, S.; YORK, P. Phase behavioral effects on particle formation processes using supercritical fluids. **Pharm. Res.**, v.16, p.976-985, 1999.

PATHAK, L.; AGRAWAL, Y.; DHIR, A. Natural polyphenols in the management of major depression. **Expert Opin Investig Drugs**, v.22 , p.863–880, 2013.

PERRUT, M. Supercritical fluid applications: industrial development and economic issues. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v.39, p.4531- 4535, 2000.

PERRUT, M; CLAVIER, J. Y. Supercritical fluid formulation: process choice and scale-up. **Ind. Eng. Chem. Res.**; v.42, p.6375-6383. 2003.

PIATO, Â.L.; CAPIOTTI, K.M.; TAMBORSKI, A.R.; OSES, J.P.; BARCELLOS, L.J.; BOGO, M.R.; LARA, D.R.; VIANNA, M.R.; BONAN, C.D. Unpredictable chronic stress model in zebrafish

(Danio rerio): behavioral and physiological responses. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.**, v.30;35(2), p.561-7, 2011.

PRIAMO; W. L.; DALMOLIN, I.; BOSCHETTO, D. L.; MEZZOMO, N.; FERREIRA; S. R. S.; OLIVEIRA, J. V. Micronization processes by supercritical fluid technologies: a short review on process design (2008-2012). **Acta Scientiarum. Technology.** v.35, n.4, p.695-709, Oct.-Dec., 2013.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, São Paulo , v. 27, n.6, p. 1028-1029, 2004.

RANDOLPH, T.W. Supercritical fluid extractions in biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v.8, p. 78, 1990.

RASENACK, N.; MULLER, B.W. Dissolution rate enhancement by in situ micronization of poorly water-soluble drugs. **Pharm. Res.** , New York, v.19, n.12, p.1894-1900, 2002.

RASTIJA, V.; MEDIC-SARIC, M.; QSAR study of antioxidant activity of wine polyphenols. **Eur. J. Med. Chem.**, v.44, p.400, 2009.

RÉUS, G.Z.; DOS SANTOS, M.A.; ABELAIRA, H.M.; TITUS, S.E.; CARLESSI, A.S.; MATIAS, B.I.; BRUCHCHEN, L.; FLORENTINO, D.; VIEIRA, A.; PETRONILHO, F.; CERETTA, L.B.; ZUGNO, A.I.; QUEVEDO, J. Antioxidant treatment ameliorates experimental diabetes-induced depressive-like behaviour and reduces oxidative stress in brain and pancreas. **Diabetes Metab Res Rev.** v.32(3), p.278-288, 2016.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical antisolvent micronization of Cefonicid: thermodynamic interpretation of results. **J. Supercrit. Fluids.**, v.31, p. 207-215, 2004.

REVERCHON, E.; DE MARCO, I.; TORINO, E. Nanoparticles production by supercritical antisolvent precipitation: A general interpretation. **J. Supercrit. Fluids.** p. 126 –138, 2007.

REVERCHON, E.; TORINO, E.; DOWY, S.; BRAUER, A.; LEIPERTZ, A. Interactions of phase equilibria, jet fluid dynamics and

mass transfer durins supercritical antisolvent micronization. **Chem. Eng. J.** v.156, p. 446-458, 2010.

REVERCHON, E.; TORINO, E.; DOWY, S.; BRAUER, A.; LEIPERTZ, A. Interactions of phase equilibria, jet fluid dynamics and mass transfer durins supercritical antisolvent micronization. **Chem. Eng. J.**, v.156, p.446-458, 2010.

REVERCHON, E; ADAMI, R. Nanomaterials and supercritical fluids. **J. Supercrit. Fluids.**, v.37, p.1-22, 2006.

RODRIGUES, M.A.; PADRELA, L.; GERALDES, V.; SANTOS, J.; MATOS, H.A.; AZEVEDO, E.G. Theophylline polymorphs by atomization of supercritical antisolvent induced suspensions. **J. Supercrit. Fluids.** v.58, p. 303-312, 2011.

RODRIGUES, M.A.; TIAGO, J.M.; DUARTE, A.; GERALDES, V.; MATOS, H.A.; GOMES AZEVEDO, E. Polymorphism in Pharmaceutical Drugs by Supercritical CO₂ Processing: Clarifying the Role of the Antisolvent Effect and Atomization Enhancement. **Cryst. Growth Des.**, v.16, p.6222–6229, 2016.

RODRIGUES, M.A.; TIAGO, J.M.; PADRELA, L.; MATOS, H.A.; NUNES, T.G., PINHEIRO, L.; ALMEIDA, A.J.; DE AZEVEDO, E.G. New thermoresistant polymorph from CO₂ recrystallization of minocycline hydrochloride. **Pharm. Res.**, v.31, p.3136–3149, 2014.

ROJAS-GRAÜ, M. A.; TAPIA, M. S.; MARTÍN BELLOSO, O. Using polysaccharide-based edible coatings to maintain quality of fresh-cut Fuji apples. **LWT – Food Science and Technology**, London, v.41, n.1, p.139-147, 2008.

SAMUNI, Y.; GOLDSTEIN, S.; DEAN, O.M.; BERK, M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1830, p.4117–4129, 2013.

SANGANWAR, G.P.; SATHIGARI, S.; BABU, R.J.; GUPTA, R.B. Simultaneous production and co mixing of microparticles of nevirapine with excipients by supercritical antisolvent method for dissolution enhancement. **Eur. J. Pharm. Sci.** v.39, p.164-174, 2010.

SANTOS, P.; HERRMANN, A.P.; BENVENUTTI, R.; NOETZOLD, G.; GIONGO, F.; GAMA, C.S.; PIATO, A.L.; ELISABETSKY, E. Anxiolytic properties of N-acetylcysteine in mice. **Behav. Brain Res.**, v.317, p.461-469, 2017.

SATHIGARI, S.K.; OBER, C.A.; SANGANWAR, G.P.; GUPTA, R.B.; BABU, R.J. Single-step preparation and deagglomeration of itraconazole microflakes by supercritical antisolvent method for dissolution enhancement. **J. Pharm. Sci.** v.100(7), p.2952-2965, 2011.

SAUTTER, C.K.; DENARDIN, S.; ALVES, A.O.; MALLMANN, C.A.; PENNA, N.G.; HECKTHEUER, L.H. Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p.437-442, 2005.

SHANKAR, S.; SINGH, G.; SRIVASTAVA, R. K. Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. **Front Biosci.**, v.12, p.4839, 2007.

SHEKUNOV, B. Y.; YORK, P. Crystallization process in pharmaceutical technology and drug delivery design. **Journal of Crystal Growth**, v.211, p.122-136, 2000.

SIEVERS, R.E.; HUANG, E.T.S.; VILLA, J.A.; ENGLING, G.; BRAUER, P.R. Micronization of watersoluble or alcohol-soluble pharmaceuticals and model compounds with a lowtemperature Bubble Dryer®. **J. Supercrit. Fluids.** v.26, p.9-16, 2003.

SILVA, P. Farmacologia, 4a ed., **Ed. Guanabara**, 715 (1994) 716.

SILVA, P. T.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R.; HOLKEM, A. T.; SCHWAN, C. L.; WIGMANN, É. F.; BASTOS, J. O.; SILVA, C. B.. Microencapsulação: conceitos, mecanismos, métodos e algumas aplicações em tecnologia de alimentos. **Ciência Rural**, v.44(7), p.1304-1311, 2014.

SILVEIRA, T. R.; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Cienc. Cult.**, v.64, n.2, 2012.

SNAVELY, W.K.; SUBRAMANIAM, B.; RAJEWSKI, R.A.; DEFELIPPIS, M.R. Micronization of insulin from halogenated alcohol solution using supercritical carbon dioxide as an antisolvent. **J. Pharm. Sci.** v.91, p.2026-2039, 2002.

SOARES, N. F. F.; SILVA, W. A.; SILVEIRA, M. F. A.; PIRES, A. C. S.; MEDEIROS, E. A. A. Conservação de maçã minimamente processada através de revestimento comestível incorporado com ácido ascórbico. **In: V Encontro Nacional sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças**, Anais. Lavras. V Encontro Nacional sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças, v.1. p.119, 2008.

STEULLET, P.; NEIJT, H.C.; CUÉNOD, M.; DO, K.Q. Synaptic plasticity impairment and hypofunction of NMDA receptors induced by glutathione deficit: relevance to schizophrenia. **Neuroscience**, v.137, p.807-819, 2006.

SUAREZ, W. T. Desenvolvimento de Procedimentos Analíticos para a Determinação de N-acetilcisteína em Produtos Farmacêuticos. **Dissertação (Mestrado em Química)**. Universidade Federal de São Carlos, 2005.

SUN, Y.P.; ROLLINS, H.W. Preparation of polymer-protected semiconductor nanoparticles through the rapid expansion of supercritical fluid solution. **Chem. Phys. Lett.** v.288, p.585-588, 1998.

TABERNERO, A.; DEL VALLE, E.M.M.; GALÁN, M.A. Precipitation of tretinoin and acetaminophen with solution enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS). Role of phase equilibria to optimize particle diameter. **Powder Technology**. Feb; v.217, p.177-188, 2012.

TAYLOR, M.R.; HURLEY, J.B.; VAN EPPS, H.A.; BROCKERHOFF, S.E. A zebrafish model for pyruvate dehydrogenase deficiency: rescue of neurological dysfunction and embryonic lethality using a ketogenic diet. **Proc Natl Acad Sci.** v.101, p.4584-4589, 2004.

THAKUR, R.; GUPTA, R.B. Rapid expansion of supercritical solution with solid cosolvent (RESS-SC) process: Formation of 2-aminobenzoic acid nanoparticle. **J. Supercrit. Fluids.** v.37, p.307-315, 2006.

TOM, J.W.; DEBENEDETTI, P.G. Particle formation with supercritical fluids - a review. **Journal Of Aerosol Science**, v.22, p. 555-584, 1991.

TOSCANI, S. An up-to-date approach to drug polymorphism. **Thermochimica Acta**, v. 321, p.73-79, 1998.

TUMUR, Z.; SHIMIZU, H.; ENOMOTO, A.; MIYAZAKI, H.; NIWA, T. Indoxyl sulfate upregulates expression of ICAM-1 and MCP-1 by oxidative stress-induced NF-kappaB activation. **American Journal Nephrology**, v.31, n. 5, p. 435-41, 2010.

TURK, M.; HILS, P.; HELFGEN, B.; SCHABER, K.; MARTIN, H.J.; WAHL, M.A. Micronization of pharmaceutical substances by the Rapid Expansion of Supercritical Solutions (RESS): a promising method to improve bioavailability of poorly soluble pharmaceutical agents. **Journal of Supercritical Fluids**, v.22, p.75-84, 2002.

ULRICH, S.; WOLTER, F.; STEIN, J. M. Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis. **Mol. Nutr. Food Res.**, v.49, p.452, 2005.

United States Pharmacopeia (USP), method 467 - Residual Solvents. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2009.

VARGA, V.; JENEI, Z.; JANÁKY, R.; SARANSAARI, P.; OJA, S.S. Glutathione is an endogenous ligand of rat brain N-methyl-D-aspartate (NMDA) and 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptors. **Neurochem. Res.**, v.22, p.1165-1171, 1997.

VENTOSA, N.; SALA, S.; VECIANA, J. Depressurization of an expanded liquid organic solution (DELOS): a new procedure for obtaining submicron- or micron-sized crystalline particles. **Cryst. Growth Des.** v.1, p.299-303, 2001.

VITEBSKY, A.; REYES, R.; SANDERSON, M.J.; MICHEL, W.C.; WHITLOCK, K.E. Isolation and characterization of the lazure olfactory behavioral mutant in the zebrafish, *Danio rerio*. **Dev Dyn.** v.234, p.229-242, 2005.

VITRAC, X.; DESMOULIÈRE, A.; BROUILLAUD, B.; KRISA, S.; DEFFIEUX, G.; BARTHE, N.; ROSENBAUMB, J.; MÉRILLON, J. M. Distribution of [¹⁴C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. **Life Sci.** v.72, p.2219, 2003.

WALLE, T. Bioavailability of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences.** V.1215, p.9-15, 2011.

WALLE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M. H.; OATIS JR., J. E.; WALLE, U. K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metab. Dispos.**, v.32, p.1377, 2004.

WARWICK, B.; DEGHANI, F.; FOSTER, N.R.; BIFFIN, J.R., REGTOP, H.L. Micronisation of copper indomethacin using gas anti-solvent processes. **J. Ind. Eng. Chem. Res.** v.41(8), p.1993-2004, 2002.

WARWICK, B.; DEGHANI, F.; FOSTER, N.R.; BIFFIN, J.R.; REGTOP, H.L. Synthesis, purification, and micronisation of pharmaceuticals using the gas anti-solvent technique. **J. Ind. Eng. Chem. Res.** v.39(12), p.4571-4579, 2000.

WEIDNER, E.; KILZER, A.; PETERMANN, M.; PROB, A.; LUCAS, K.; STEPANSKI, R. Inventors; Verfahren zur Erzeugung von Polyurethanpartikeln. patent Deutsches Patent DE 10040551.7. 2000.

WEIDNER, E.; KNEZ, Z.; NOVAK, Z. Inventors; A Process and Equipment for Production and Fractionation of Fine Particles from Gas Saturated Solutions. patent WO 95/21688. 1994.

WEIDNER, E.; PETERMANN, M.; BLATTER, K.; REKOWSKI, V. Manufacture of powder coatings by spraying of gas-enriched melts. **Chem. Eng. Technol.** v.24, p.529-533, 2001.

WEIDNER, E.; STEINER, R.; DIRSCHERL, H.; WEINREICH, B. Inventors; Verfahren zur Herstellung eines pulverförmigen Produktes aus einem flüssigen Stoff oder Stoffgemisch. patent European Patent EP 9705484. 1997.

WENZEL, E.; SOMOZA, V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. **Mol. Nutr. Food Res.**, v.49, p.472, 2005.

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

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

YEO, S. D.; KIRAN, E. Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review. **Journal of Supercritical Fluids**, v.34, p.287-308, 2005.

YILDIZ, N.; TUNA, S.; DOKER, O.; ÇALIMI, A. Micronization of salicylic acid and taxol (paclitaxel) by rapid expansion of supercritical fluids. **J. Supercrit. Fluids.**, v.41, p.440-451, 2007.

YOSHIDA, V. M. H. Processo antissolvente supercrítico para obtenção de dispersões sólidas. **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)**. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- SP, 2014.

YOUNG, T.J.; JOHNSTON, K.P.; PACE, G.W.; MISHRA, A.K. Phospholipid-stabilized nanoparticles of cyclosporine A by rapid expansion from supercritical to aqueous solution. **AAPS Pharm. Sci. Tech.** v.5(1): p.70-85, 2003.

YOUNG, T.J.; MAWSON, S.; JOHNSTON, K.P. Rapid expansion from supercritical to aqueous solution to produce submicron suspensions of water-insoluble drugs. **Biotechnol. Prog.** v.16, p.402-407, 2000.

YU, C.; SHIN, Y. G.; CHOW, A.; LI, Y.; KOSMEDER, J. W.; LEE, W. S.; HIRSCHELMAN, W. H.; PEZZUTO, J. M.; MEHTA, R. G.; VAN BREEMEN, R. B. Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. **Pharm Res.**, v.19, p.1907, 2002.

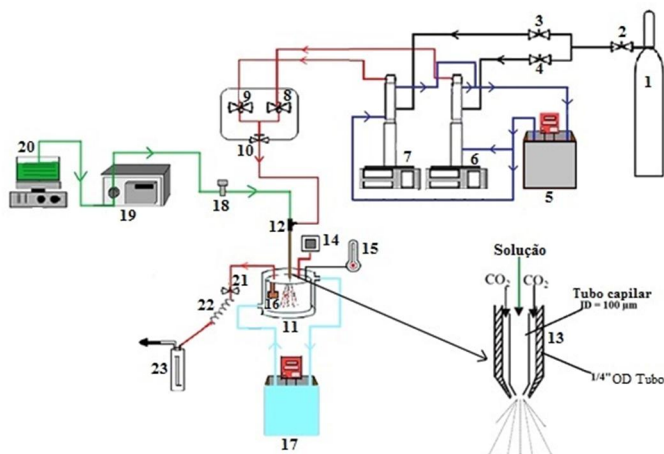
CAPÍTULO 2

2. Materiais e Métodos

2.1 Técnica de dispersão da solução melhorada por fluido supercrítico (SEDS)

O aparato experimental utilizado para o micronização da N-acetilcisteína e *trans*-resveratrol utilizando fluido supercrítico foi descrito por Franceschi et al. (2008) e Boschetto et al. (2013). A Figura 2.1 abaixo mostra o diagrama esquemático da técnica utilizada neste trabalho.

Figura 2. 1 - Diagrama esquemático do aparato experimental SEDS.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme a Figura 2.1, o aparato experimental para ensaios de micronização das amostras é constituído dos seguintes elementos:

- (1) Reservatório de dióxido de carbono (CO_2) (White Martins);
- (2) Válvula de uma via que permite o fluxo em um único sentido (Check-valve marca HIP, modelo 15-41AF1-T, pressão de operação até 1034 bar)

(3) e (4) Válvulas de esfera (marca Swagelok, modelo SS-83KS4, pressão de operação até 410 bar a temperatura ambiente);

(5) Banho ultratermostático de recirculação (marca Nova Ética, modelo 521/2D);

(6) e (7) Bombas de alta pressão (marca ISCO, modelo 500D, pressão de trabalho de até 258 bar e vazão máxima de $170 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$);

(8) e (9) Válvulas de esfera (marca Swagelok, modelo SS-83KS4, pressão de operação até 410 bar a temperatura ambiente);

(10) Válvula métrica tipo agulha (Marca HIP, Modelo 15-11AF1, pressão de operação até 1034 bar);

(11) Câmara de precipitação cilíndrica de aço inox 316 encamisada com capacidade de 600 mL (diâmetro interno de 8 cm e altura 12 cm);

(12) Entrada central coaxial – conexão tipo T (marca Swagelok);

(13) Tubo capilar de sílica fundida;

(14) Entrada periférica que apresenta um transdutor de pressão que monitora a pressão dentro da câmara de precipitação. Ele está conectado à linha entre a válvula (10) e a câmara de precipitação (transdutor absoluto – 0 a 250 bar, marca SMAR, modelo LD 301);

(15) Entrada periférica onde fica um sensor de temperatura (termopar) ligado à um indicador de temperatura (Universal, marca NOVUS, modelo N 1500);

(16) Suporte constituído por dois filtros de politetrafluoretileno;

(17) Banho ultratermostático de recirculação (marca Nova Ética, modelo 512/2D);

(18) Válvula de regulagem de pressão constituída de aço inox 316 com uma porta de entrada e outra de saída (back pressute regulator, marca GO-Regulador, Série BP-66, modelo 1A11QE151);

(19) Bomba de HPLC Digital Série III (marca Acuflow);

(20) Recipiente para solução orgânica na qual o princípio ativo a ser precipitado é dissolvido no solvente orgânico;

(21) Válvula métrica tipo agulha (marca HOKE, modelo 1315G2Y);

(22) Fita de aquecimento (marca FISATON, modelo 5, 200 W de potência) que envolve a válvula (21);

(23) *Trap* de segurança, recheado com algodão.

2.2 Materiais

Trans-resveratrol, pureza 99,5%, foi adquirido no laboratório Galena LTDA (Campinas/SP). A N-Acetilcisteína, pureza 99,2%, foi adquirido no laboratório Iberoquímica Magistral (Jundiaí/SP). O certificado de análise contendo informações sobre pureza e outras propriedades das amostras (trans-resveratrol, NAC) encontra-se no Anexo A.

Diclorometano (DCM) com pureza de 99,5 % adquirido da Vetec (Sigma-Aldrich); acetona 99,5% foi adquirido da Vetec (Sigma-Aldrich) e dióxido de carbono (99,9% na fase líquida) foi fornecido pela White Martins S. A.

2.3 Micronização utilizando a técnica SEDS

Para a micronização das amostras foram utilizados parâmetros segundo trabalhos de Franceschi et al. (2008; 2009), Priamo et al. (2010) e Boschetto et al. (2013) com concentração de 4 mg·mL⁻¹, 12 mg·mL⁻¹ e 20 mg·mL⁻¹, temperatura de 35, 40 e 45 °C, taxa de fluxo de solução de 1 mg·mL⁻¹, taxa de fluxo antissolvente em 20 mg·mL⁻¹ e pressão de operação de 80, 100 e 120 bar. As amostras (NAC e trans-resveratrol) foram solubilizadas em mistura de solvente contendo 40% de acetona e 60% de diclorometano em volume. A fim de verificar a influência das variáveis concentração, temperatura e pressão foi realizado um delineamento composto central (DCC) 2³ com 3 pontos centrais (tabela 2.1).

Tabela 2. 1 - Variáveis estudadas no processo de micronização das amostras.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Concentração (mg·mL ⁻¹)	4	12	20
Pressão (bar)	80	100	120
Temperatura (°C)	35	40	45

Para NAC foi realizando um segundo DCC a fim de otimizar mais o processo, neste segundo DCC foi fixado temperatura em 35°C e variando concentração da solução (20, 30 e 40 mg·mL⁻¹) e pressão do sistema (80, 115 e 150 bar).

O procedimento experimental utilizado para micronizar NAC e trans-resveratrol foi adaptado dos trabalhos de Boschetto et al. (2013) e Franceschi et al. (2009) e Priamo et al. (2010). Primeiramente, uma

solução com as amostras solubilizados em acetona (40%) foi preparada e o volume completado com diclorometano (60%). O diagrama de fases do sistema CO_2 + diclorometano + acetona encontra-se no apêndice A, o qual apresenta a região em que se encontram os experimentos.

Após isso, procedeu-se o carregamento das bombas (6 e 7) com dióxido de carbono que estava armazenado. Duas bombas de alta pressão foram usadas para que o CO_2 permanecesse em fluxo contínuo. As válvulas de 2 a 4 foram mantidas abertas para que ocorresse o deslocamento do fluido do cilindro para a câmara de cada bomba. A temperatura da camisa foi ajustada a 5 °C com auxílio do banho de recirculação (5) para liquefazer o CO_2 .

Na montagem da câmara de precipitação foram inseridos filtros de retenção para evitar o arraste do material precipitado. Este filtro de politetrafluoretileno tem maior porosidade, servindo de suporte para o filtro de membrana. Em seguida, a tampa foi fechada e a vazão e pressão da solução na bomba de HPLC foram ajustadas para então fazer as conexões. Nesta etapa e na limpeza utilizou-se diclorometano puro. A pressão foi ajustada por meio da *back pressure* (18), evitando a passagem de fluxo aumentado com pressão até 200 bar, para assim evitar que o antissolvente entrasse pela linha de solução.

Finalmente, as conexões da linha de entrada de CO_2 e o da solução do sensor de temperatura da linha de saída foram conectados, sendo em seguida conectadas ao banho termostático, e então a válvula (10) aberta para que houvesse o enchimento da câmara com CO_2 .

Estando a câmara preenchida com CO_2 , a válvula foi fechada e a recirculação (17) acionada. As válvulas de (2) a (4) foram fechadas, de modo a pressurizar as bombas (6) e (7) até a válvula 10 em 200 bar, para assim, manter um gradiente de pressão para evitar refluxos da câmara para as linhas, causando precipitação do composto.

Atingindo a pressão desejada, a válvula (21) foi aberta, com a (10) ainda aberta, para ajustar o fluxo de antissolvente na câmara de precipitação. Dependendo da condição experimental a válvula (21) poderia congelar. Para evitar esse problema, uma fita aquecedora foi envolta na mesma. A temperatura foi mantida a 200 °C.

Com a pressão e temperatura constantes, o CO_2 foi deixado fluir para assim, alcançar o estado estacionário, iniciando posteriormente a injeção da solução para dentro da câmara de precipitação. O volume de solução adicionado nos experimentos foi de 25 mL.

Após injetar o volume da solução, a bomba de HPLC foi desligada. Para a secagem das partículas precipitadas e a retirada do solvente, o fluxo de CO_2 foi mantido por 40 minutos para os

experimentos apresentados nos capítulos 4 e 6, e 50 minutos aproximadamente, para os experimentos dos capítulos 5, 7 e apêndice E, a uma vazão de $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, baseado em trabalhos anteriores (KIM et al., 2007; KANG et al., 2008; HONG et al., 2009).

Em seguida, foi iniciada a despressurização da câmara de precipitação até a pressão atmosférica, abrindo-se a válvula (21). Procedimento que leva em torno de 40 minutos.

Por fim, a temperatura do experimento foi reduzida pelo banho (17) e as conexões foram desconectadas, abrindo-se a câmara cuidadosamente para então retirar o material precipitado. O material precipitado foi armazenado em frascos âmbar e posteriormente armazenados a $5 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.3.1 Determinação do tamanho de partícula

As micrografias das partículas de NAC e trans-resveratrol foram realizadas em Microscópio Eletrônico marca JEOL, modelo JSM-6390LV (MEV). O tamanho das partículas de N-acetilcisteína e do trans-resveratrol foi obtido por meio de medidas do comprimento das partículas (600-1000 partículas) em cada condição experimental. As medições foram realizadas empregando software Sizer Meter versão 1.1 (desenvolvido por Luiz Henrique Castelan Carlson). A partir das médias de tamanhos de partículas foi calculado o desvio padrão e com este dado foi calculado o coeficiente de variação (CV), ferramenta utilizada para expressar a variabilidade dos dados em relação a média.

2.3.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) consiste em determinar um composto por meio da comparação de espectros. Obtendo-se o espectro da amostra compara-se com o respectivo espectro padrão. Uma correlação pico a pico é uma excelente evidência para identificar uma amostra, por meio da comparação da amostra com um espectro padrão (BÓ et al., 2011). Portanto, realizou-se a comparação dos espectros da amostra pura em relação à amostra do experimento 8 micronizada (120 bar , $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $45 \text{ }^\circ\text{C}$), a fim de verificar possíveis degradações na amostra após a micronização, com o auxílio da técnica de Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). As medições foram realizadas em um espectrofotômetro IRPrestige-21, Shimadzu.

2.3.3 Velocidade de dissolução

Para determinação da velocidade de dissolução da NAC e do trans-resveratrol foi adaptada metodologia de Cheng et al. (2016). Conforme metodologia, as amostras de NAC (50 mg) e trans-resveratrol (10 mg) foram adicionadas em frascos contendo 100 mL de água destilada e mantidas sob agitação constante (100 rpm) a 37 °C. Para NAC foram retirados pontos nos períodos selecionados de 0, 60, 120, 180, 240, 300, 360 e 420 s e já para trans-resveratrol foram coletados pontos nos tempos de 0, 10, 20, 30, 50, 80, 120 e 180 min. Tanto para NAC como para trans-reveratrol, 1,5 mL foram recolhidas a partir da solução e imediatamente repostas com solvente puro para manter o volume original. Em seguida, as amostras foram filtradas usando filtro de membrana de 0,22 µm e a concentração de *trans*-resveratrol foi determinado por espectrofotometria UV-visível (curva de calibração inserida no apêndice B), e a concentração de NAC foi determinada por meio do procedimento espectrofotométrico UV-visível (curva de calibração inserida no apêndice B), descrito por Raggi et al. (1982).

2.3.4 Solubilidade

A solubilidade do trans-resveratrol foi medida nos seguintes solventes: água destilada, solução de HCl 0,1 M e tampão fosfato pH 6,8. Adicionou-se 100 µg de amostra em cada solvente mencionado anteriormente em frascos de vidro contendo 100 mL de solvente. A solução foram submetidas ao sonificador ultrasônico cerca de 10 min e após foi incubada sobre agitação contante (100 rpm) a 37 °C por 72 h (CHENG et al., 2016). Após as 72 h, as amostras foram filtradas usando filtro de membranas de 0,22 µm e a concentração de trans-resveratrol foi determinado por espectrofotometria UV-visível.

2.3.5. Ensaio de eliminação radical DPPH

O teste de capacidade de eliminação de radicais livres da amostra trans-resveratrol foi testada pelo ensaio de eliminação radical DPPH de acordo com Khan et al. (2016). Depois de preparar a solução de amostra mais DPPH (0,1 mmol·L⁻¹) a mistura de reação foi agitada e armazenada por 30 min a 37 °C. A absorbância da mistura foi medida espectrofotometricamente no comprimento de onda 517 nm. A porcentagem da capacidade de eliminação do radical DPPH foi

calculada pela seguinte equação (Eq.1):

$$\% \text{ Atividade antioxidante} = 100 - \frac{[A_0 - A_1]}{A_c} \cdot 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde A_0 é a absorbância da amostra, A_1 é a absorbância da norma e A_c é a absorbância do controle. Em seguida, porcentagem de inibição foi plotada contra a concentração, e do gráfico IC_{50} foi calculado de acordo com a metodologia de Mensor et al. (2001).

2.3.6 Difração de raios-X em pó (DR-X)

Os dados DR-X foram coletados de um Difratorômetro de Phaser D2 (Bruker) θ - θ equipado com uma fonte de $Cu K\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) operado em 30 kV e 10 mA, com detector de LYNXEYE 1-dimensional contador de cintilação. Dados de difração foi coletados entre 5 e 50 graus de 2θ e 0,5 s contando o tempo de cada etapa.

2.3.7 Identificação e quantificação de solvente residual dos compostos micronizados

Para identificação de solvente residual dos compostos micronizados foi realizada cromatografia gasosa em um CG modelo 5975C Inert MSD marca Agilent Technologies, acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) em frasco de Headspace, nos ensaios 2, 4, 6, 8, 10, dos capítulos 4 e 6, e nas amostras não-micronizadas a fim de verificar possíveis resíduos de solvente utilizados no processo de micronização.

Um amostrador automático (headspace sampler) e injetor CG-Sampler 80 foram utilizados para as análises onde as condições de operação foram adaptadas de acordo com a metodologia descrita por Gudat, Firor e Bober (2007) para identificação de resíduos de solvente em fármacos utilizando a coluna DB624, 30 m x 0,45 mm x 2,55 μm . As condições de operação se encontram na tabela 2.2.

Tabela 2. 2 - Condições de operação.

Parâmetros		Headspace Sampler	
Porta de Injeção	Interfaces voláteis	Loop size	1 mL
Temperatura Split ratio	160 °C Sem Split	Pressão Vial Forno	14 psig 85 °C
Gás Carregador	Hélio	Headspace Loop temperatura	100 °C
Fluxo Transportador	1 mL·min ⁻¹	Temperatura na linha de Transferência	120 °C
CG Programação do forno		Tempo de Equilíbrio	30 min, Baixa agitação
Temperatura inicial	35 °C	CG ciclo de tempo	50 min
Tempo inicial	20 min	Pressurização	0,15 min
Razão	25 °C·min ⁻¹	Vent (Loop Fill)	0,5 min
Temperatura final	250 °C	Injeção	0,5 min
Tempo final	15 min		
Coluna	30 m x 0,45 mm x 2,55 µm DB-624		

Após realizar a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) [Apêndice C] foi realizada a quantificação do solvente residual por cromatografia gasosa acoplada ao detector por ionização de chama (CG-FID) utilizando as mesmas condições de operações do CG-EM [Tabela 2.2]. Para quantificação no CG-FDI foi construída uma curva de calibração [Apêndice D] para os cálculos de valores em ppm do solvente utilizando padrões de acetona e diclorometano.

2.3.8 Testes comportamentais com N-acetilcisteína

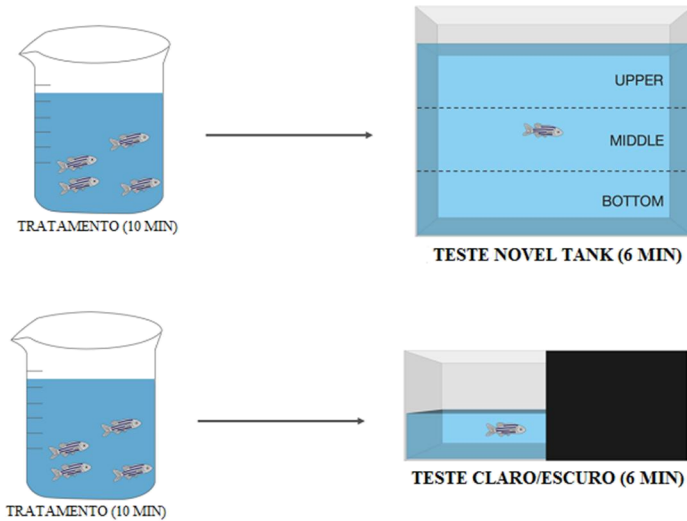
2.3.8.1 Animais

Um total de 165 peixes-zebra adulto do tipo selvagem (*Danio rerio*, 4-6 meses, proporção 50:50 macho/fêmea) foi obtido a partir do reprodutor heterogêneo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os peixes foram mantidos em aquários de 40 litros (2,5 peixes por litro), completos com água filtrada não clorada, com um ciclo claro/escuro de 14/10 horas (luzes acesas às 07:00 h da manhã), durante pelo menos duas semanas antes dos testes. A água do tanque foi parcialmente alterada uma vez por semana e mantida sob condições adequadas (temperatura 26 ± 1 °C, pH $7,0 \pm 0,3$, oxigênio dissolvido a $7,0 \pm 0,4$ mg·L⁻¹, amônia total a $<0,01$ mg·L⁻¹, dureza total a $5,8$ mg·L⁻¹ e alcalinidade a 22 mg·L⁻¹ de CaCO₃). Os peixes foram alimentados duas vezes por dia com um alimento comercial de peixe em flocos (Alcon BASIC®, Alcon, Brasil). Todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA nº 30914) (Anexo B).

2.3.8.2 Design Experimental

O aparato experimental é mostrado na Fig. 2.2, tal como descrito por Mocelin et al. (2015). Cada grupo com quatro peixes foram colocados durante 10 minutos em recipientes de 400 mL com uma das seguintes soluções (grupos de tratamento): controle (água), fluoxetina (FLU, $10,0$ mg·L⁻¹), bromazepam (BMZ, $1,5$ mg·L⁻¹), NAC ($0,01$ e $1,0$ mg·L⁻¹) e NAC micronizado ($0,01$, $0,1$ e $1,0$ mg·L⁻¹). Os fármacos fluoxetina e bromazepam foram utilizados como controles positivos, uma vez que são amplamente prescritos para distúrbios de ansiedade. Novas soluções foram preparadas para cada grupo de quatro peixes. Imediatamente após o tratamento, diferentes conjuntos de animais foram transferidos para os aparelhos experimentais e vídeos foram gravados para análise posterior pelo software ANY-Maze (Stoelting Co., EUA).

Figura 2. 2 - Representação gráfica do protocolo experimental.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

2.3.8.3 *Novel tank*

O teste *novel tank* consiste em um tanque de 2,7 L ($24 \times 8 \times 20$ cm) cheio com água até 15 cm (MOCELIN et al., 2015). O aparelho experimental foi dividido em 3 zonas horizontais iguais: inferior (*bottom*), média (*middle*) e superior (*upper*) (Fig. 2.2). Os seguintes parâmetros foram avaliados individualmente durante 6 min: distância total percorrida e tempo gasto na zona superior do tanque. A localização vertical em um novo ambiente é considerada um parâmetro de ansiedade no peixe-zebra, análogo ao comportamento que os roedores exibem em um campo aberto (LEVIN; BENCAN; CERUTTI, 2007).

2.3.8.4 Teste claro/escuro

O teste claro/escuro foi realizado de acordo com metodologia de Mocelin et al. (2015). O aparato experimental consiste num tanque de vidro ($18 \times 9 \times 7$ cm) dividido por uma divisória de guilhotina deslizante (9×7 cm) em dois compartimentos brancos e escuros igualmente dimensionados (Fig. 2.2). O nível de água do tanque foi de 3

cm e a divisória foi levantada 1 cm acima do fundo do tanque para permitir que o *zebrafish* pudesse nadar livremente entre os dois lados do tanque. Os animais foram colocados individualmente na zona clara imediatamente após o tratamento e o tempo gasto no compartimento claro e o número de cruzamentos entre compartimentos foram registados durante 5 min.

2.3.8.5 Testes estatísticos nos ensaios comportamentais

Os dados são expressos como média + erro padrão da média. A distribuição normal dos dados foi confirmada pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene, e os resultados foram analisados por ANOVA unidirecional seguido pelo teste post hoc de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas em $p < 0,05$.

2.4 Referências bibliográficas

BÓ, M. D.; CARDOSO, A. P. G.; TRANCREDO, C.; MERGEN, I. Z.; DONEDA, R. N.; NOVAES, A. F.; FARIA, D. C. Reciclagem de Embalagens Poliméricas Contendo Filme de Alumínio Metálico Via Processamento Químico. **Polímeros**, v.21, n.4, p.335-339, 2011.

BOSCHETTO, D. L., DALMOLIN, I., DE CESARO, A. M., RIGO, A., FERREIRA, S.R.S., MEIRELES, M. A. A., BATISTA, E. A. C., OLIVEIRA, J. V. Phase behavior and process parameters effecton grape seed extract encapsulation by SEDS technique. **Ind. Crops Prod.**, v.50, p.352–360, 2013.

CHENG, Y.; XU, W.; CHEN, Z.; WANG, Z.; HUANG, D. Micronization of etoposide using solution-enhanced dispersion by supercritical CO₂. **J. Supercrit. Fluids**, v.115, p.10-16, 2016.

FRANCESCHI, E., CESARO, A. M., FEITEN, M., FERREIRA, S. R. S., DARIVA, C., KUNITA, M. H., RUBIRA, A. F., MUNIZ, E. C., CORAZZA, M. L., OLIVEIRA, J. V. Precipitation of β -carotene and PHBV and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO₂. **J. of Supercritical Fluids.**, v.47, p.259- 269, 2008.

FRANCESCHI, E., CESARO, A. M., FERREIRA, S. R. S., OLIVEIRA, J. V. Precipitation of β -carotene microparticles from SEDS

technique using supercritical CO₂. **Journal of Food Engineering**, v.95, n.4, p.656-663, Dec. 2009.

GEBAUER, D.L., PAGNUSSAT, N., PIATO, A.L., SCHAEFER, I.C., BONAN, C.D., LARA, D.R. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.99, p.480–486, 2011.

GUDAT, A. E.; FIROR, R. L.; BOBER, U. Better precision, sensitivity, and higher sample throughput for the analysis of residual solvents in pharmaceuticals. **Agilent Application Note**, Publication Number 5989-6023EN, 2007.

KHAN, M.A., RAHMAN, M.M., SARDAR, M.N., ARMAN, M.S.I., ISLAM, M.B., KHANDAKAR, M.J.A., RASHID, M., SADIK, G., ALAM, A.K. Comparative investigation of the free radical scavenging potential and anticancer property of *Diospyros blancoi* (Ebenaceae). **Asian Pac. J. Trop. Biomed.** v.6, p.410–417, 2016.

LEVIN, E.D., BENCAN, Z., CERUTTI, D.T. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. **Physiol. Behav.** v.90, p.54–58, 2007.

MENSOR, L.L., MENEZES, F.S., LEITÃO, G.G., REIS, A.S., DOS SANTOS, T.C., COUBE, C.S., LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother. Res. PTR** 15, 127–130, 2001.

MOCELIN, R., HERRMANN, A.P., MARCON, M., RAMBO, C.L., ROHDEN, A., BEVILAQUA, F., DE ABREU, M.S., ZANATTA, L., ELISABETSKY, E., BARCELLOS, L.J.G., LARA, D.R., PIATO, A.L. N-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.139 Pt B, p.121–126, 2015.

PIATO, Â.L., CAPIOTTI, K.M., TAMBORSKI, A.R., OSES, J.P., BARCELLOS, L.J.G., BOGO, M.R., LARA, D.R., VIANNA, M.R., BONAN, C.D. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v.35, p.561–567, 2011.

PRIAMO, W. L., CESARO, A. M., FERREIRA, S. R. S., OLIVEIRA, J. V. Precipitation and encapsulation of β -carotene in PHBV using carbon dioxide as anti-solvent. **J. Supercrit. Fluids**, v.54, p.103, 2010.

CAPÍTULO 3

Os resultados deste trabalho serão apresentados, para melhor compreensão, na forma de artigos. Os referidos artigos estão apresentados nos itens I (Capítulo 4), II (Capítulo 5), III (Capítulo 6) e IV (Capítulo 7). Os resultados obtidos nos itens I, II e III foram desenvolvidos no Laboratório de Termodinâmica e Tecnologia Supercrítica (LATESC) contando com apoio da Central de Análises do EQA, Central de Análises da Química e Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), todos localizados na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os resultados IV foram desenvolvidos no LATESC/UFSC e a avaliação *in vivo* do composto foi realizada no Laboratório de Psicofarmacologia e Comportamento (LAPCOM), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Os resultados contidos no item I encontram-se no artigo “Trans-resveratrol micronization by SEDS techique” artigo publicado na revista *Industrial Crops and Products*, volume 89, paginas 350-355. Os resultados II foram apresentados na *short communication* “*Micronization of trans-resveratrol by supercritical fluid: dissolution, solubility and in vitro antioxidant activity*” submetido ao *Journal of Food Engineering*. Os resultados III estão apresentados no artigo “N-acetylcysteine micronization by SEDS technique using supercritical CO₂”, artigo aceito para publicação na revista *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. Finalmente, os resultados IV se encontram no artigo “*Micronization of N-acetylcysteine by supercritical fluid: evaluation of in vitro and in vivo biological activity*” submetido para a revista *Pharmaceutical Research*.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS I

Trans-resveratrol micronization by SEDS technique

Publicado: Industrial Crops and Products (2016)

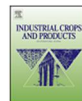
DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.04.047

Industrial Crops and Products 89 (2016) 350–355



Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops and Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop

Trans-resveratrol micronization by SEDS technique

Gean Pablo S. Aguiar^a, Daiane L. Boschetto^a, Lorenzo M.P.C. Chaves^a, Bianca D. Arcari^a, Angelo L. Piato^b, J. Vladimir Oliveira^a, Marcelo Lanza^{a,*}^a Department of Chemical Engineering and Food Engineering, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil^b Department of Pharmacology, ICBS, UFPA, Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 December 2015

Received in revised form 15 March 2016

Accepted 19 April 2016

Keywords:

SEDS

Trans-resveratrol

Average particle size

Micronization

ABSTRACT

Trans-resveratrol is a polyphenol found in a variety of foods, especially in blackberries, grape seeds, grape skin and in red wine. This compound presents countless human health benefits, including antioxidant, antiplatelet, antifungal, anti-inflammatory and cardioprotective activities, among others. The aim of this work was to investigate the application of SEDS (Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids) technique in the micronization of trans-resveratrol using a 2³ Central Composite Design (CCD) with 3 central points so as to assess the influence of compound concentration (4, 12 and 20 mg mL⁻¹), temperature (308, 313 and 318 K) and pressure (8, 10 and 12 MPa) on the particle size (D₅₀) produced. It was noted that the mean particle size obtained at 20 mg mL⁻¹ resveratrol concentration, 8 MPa and 308 K was 0.22 μm, a significant reduction compared with the original value of 36.65 μm. In the majority/in most of the experiments spherical particles were obtained. At 95% confidence level temperature showed a positive effect while operating pressure and the interaction pressure × temperature showed a significant, negative effect, on the particle size. Analysis of micronized material proved that it is in compliance with pharmaceutical human consumption standards.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abstract

Trans-resveratrol is a polyphenol found in a variety of foods, especially in blackberries, grape seeds, grape skin and in red wine. This compound presents countless human health benefits, including antioxidant, antiplaquetary, antifungal, anti-inflammatory and cardioprotective activities, among others. The aim of this work was to investigate the application of SEDS (*Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids*) technique in the micronization of trans-resveratrol using a 2^3 Central Composite Design (CCD) with 3 central points so as to assess the influence of compound concentration (4, 12 and 20 mg·mL⁻¹), temperature (308, 313 and 318 K) and pressure (8, 10 and 12 MPa) on the particle size (D_p) produced. It was noted that the mean particle size obtained at 20 mg·mL⁻¹ resveratrol concentration, 8 MPa and 308 K was 0.22 μ m, a significant reduction compared with the original value of 36.65 μ m. In the majority/in most of the experiments spherical particles were obtained. At 95% confidence level temperature showed a positive effect while operating pressure and the interaction pressure x temperature showed a significant, negative effect, on the particle size. Analysis of micronized material proved that it is in compliance with pharmaceutical human consumption standards.

Keywords: SEDS; trans-resveratrol; average particle size; micronization.

4.1. INTRODUCTION

The micronization process is characterized by the reduction of average particle size in order to provide changes in physical structure. This process is applied in different materials with different goals in the chemical, pharmaceutical and food industries (Chau et al., 2007). The conventional techniques of micro/nanoparticle production present many disadvantages compared with techniques that use supercritical fluids, such as excessive use of solvents, thermal degradation, high residual solvent concentration and, particularly, difficulty with controlling particle size and distribution of particle size during the process (He et al., 2004).

There are many advantages in reducing particle size of pharmaceutical compounds and therefore the study of micronization processes to modify the particle size, porosity and density is of great interest to allow incorporation of an active ingredient so that the administration can be directed towards a specific target (Rogers et al., 2001). According to Durán et al. (2010), a high bioavailability (up to 100%) of pharmaceutical compounds can be obtained with particles of average size in the range of 200 to 400 nm.

Resveratrol (3,5,4'-tri-hidroxy-trans-stilbene), a polyphenolic compound from the stilbene class, is a phytoalexin present in a variety of food items, including blackberries, peanuts, cranberries, dark chocolate and grapes. A wide variety of reports dealing with its biological and pharmacological properties has been published (see for example, Granzotto and Zatta, 2014; Ulrich et al., 2005; Witte et al., 2014). In studies performed by Walle et al. (2004) and Wenzel and Somoza, (2005) it has been noted that after oral administration of 25 mg resveratrol there was 70% absorption of the compound. However, its bioavailability was almost null as only traces of the molecule in its unaltered form were found in the plasma (Walle, 2011).

Considering the potential of resveratrol as a bioactive agent, the goal of this work was to investigate the application of solution enhanced dispersion of supercritical fluids (SEDS) micronization process to achieve particle size reduction within the micro/nano scale, in order to enhance its solubility and increase the specific surface contact area, consequently improving the compound's bioavailability.

4.2 MATERIALS AND METHODS

4.2.1 Materials

Trans-resveratrol, with a purity of 99.5%, was purchased from Galena LTDA Laboratory (Campinas/SP). Dichloromethane (DCM 99.5%) and acetone (99.5%) were purchased from Vetec (Sigma-Aldrich) and carbon dioxide (99.9% in liquid phase) was provided by White Martins S.A.

4.2.2 Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids Technique (SEDS)

The SEDS experimental apparatus and procedure used for the micronization of the pure compound, trans-resveratrol, employing supercritical CO₂ is described in detail by Franceschi et al. (2008), Priamo et al. (2010), Boschetto et al. (2013) and Machado Jr et al. (2014).

4.2.3 Conditions for precipitation

For the micronization of trans-resveratrol the following process sample parameters were adopted based on previous works of the group: solute concentration of 4, 12 and 20 mg·mL⁻¹, at 308, 313 and 318 K, solution flow rate of 1 mL·min⁻¹, antisolvent flow rate of 20 mL·min⁻¹ and operating pressure of 8, 10 and 12 MPa (Boschetto et al., 2013; Franceschi et al., 2008; Machado Jr et al., 2014). In this work, solute solubilization was improved by a mixture of 40% (v/v) acetone + 60% (v/v) dichloromethane. As mentioned, a 2³ Central Composite Design (CCD) with 3 central points (Table 4.1) was employed to evaluate the influence of process variables on the morphology, size and size distribution of particles produced.

Table 4.1 - Variables studied in the micronization process of the samples.

Variable	Level		
	-1	0	+1
Concentration (mg·mL ⁻¹)	4	12	20
Pressure (MPa)	8	10	12
Temperature (K)	308	313	318

4.2.4 Morphology and determination of particle size

Micrography of trans-resveratrol particles was carried out in a scanning electron microscope (SEM - JEOL JSM-6390LV, United States) to determine the shape and particle morphology, being analyzed under the following conditions: magnifications 1700-20000 of 10kV power. The particle size was determined using the software Meter Size (version 1.1) (Machado Jr et al., 2014). From the calculated average particle size, the standard deviation and the variation coefficient (VC) were used as statistical tools to express the variability of the data.

4.2.5 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

The Fourier Transform Infrared Spectroscopy technique was used in the non-micronized and micronized samples in order to study possible degradations of the compound after micronization. Measurements were made in a spectrophotometer Shimadzu IRPrestige-21. Approximately 1 mg of microparticles was ground with KBr and pressed into a pellet for FTIR characterization within range of wavenumber of 400-4000 cm⁻¹.

4.2.6 Identification and quantification of residual solvent

For the identification of residual solvent in the particles produced, gas chromatography was used (GC model 5975C Inert MSD brand Agilent Technologies), coupled with mass spectrometer (GC-MS) in headspace vial. The operation conditions were adapted from the method described by Gudat; Firor; Bober (2007) with a DB624 - 30 m x 0.45 mm x 2.55 µm column. The quantification of residual solvent was then investigated by gas chromatography - flame ionization detector (GC-FID) using the same operation conditions as in the GC-MS.

4.3 RESULTS AND DISCUSSIONS

4.3.1 Trans-resveratrol micronization

Results from the 2³ CCD design are shown in Table 4.2, which informs the values of mean particle size (Dp), standard deviation (σ), as well as the variation coefficient of experimental data.

Table 4.2 - Results of 2³ CCD experimental design of trans-resveratrol micronization.

Run	Concentration (mg·mL ⁻¹)	Pressure (MPa)	Temperature (K)	Dp (μ m)	VC
1	4	8	308	0.31 \pm 0.13	0.43
2	20	8	308	0.22 \pm 0.09	0.40
3	4	12	308	0.43 \pm 0.11	0.25
4	20	12	308	0.77 \pm 0.27	0.35
5	4	8	318	6.98 \pm 3.26	0.47
6	20	8	318	4.99 \pm 1.75	0.35
7	4	12	318	0.38 \pm 0.13	0.33
8	20	12	318	0.37 \pm 0.19	0.50
9	12	10	315	0.31 \pm 0.09	0.30
10	12	10	315	0.41 \pm 0.13	0.31
11	12	10	315	0.31 \pm 0.09	0.30

The mean particle size for the non-micronized compound is 36.65 μ m and when compared with the result found in run 2, 0.22 μ m, a relevant particle size reduction of about 167 times is noticed. According to Durán et al. (2010) a high bioavailability (up to 100%) of pharmaceutical compounds may be obtained with average particle size ranging from 200 to 400 nm. In that size range, application of pharmaceutical compounds by intravenous way is possible, since such size is smaller than the capillaries (5 to 6 μ m). In the majority of the experiments of trans-resveratrol, particles within size in the range of 200 to 400 nm were obtained, except in experiments 4, 5 and 6.

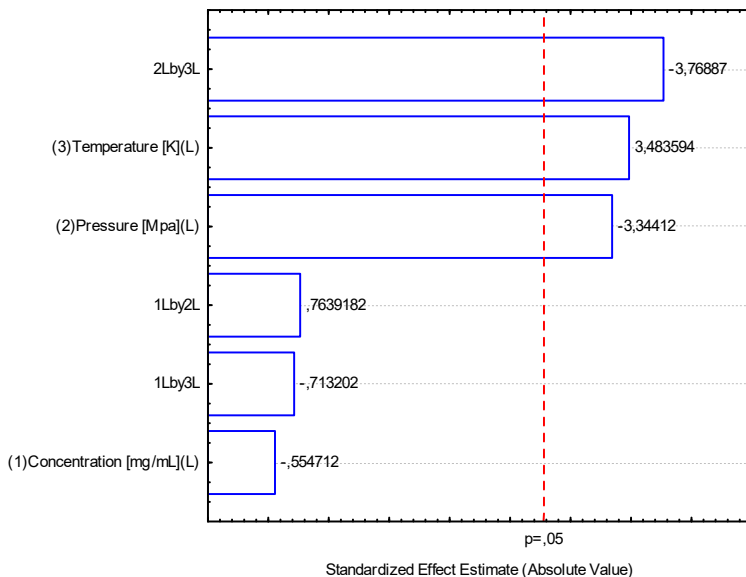


Figure 4.1 - Pareto Chart showing the effect of micronization process parameters.

As can be seen from the Pareto chart shown in Fig. 4.1, system pressure presented a significant negative effect on the resveratrol micronization process (95% confidence level), which means that an increase in pressure at constant temperature leads to the formation of smaller particles as can be verified comparing runs 5 and 6 (318 K and 8 MPa) with 7 and 8 (318 K and 12 MPa) where there is a particle size reduction from 6.98 μm to 0.37 μm .

The fact that pressure and the cross interaction of pressure x temperature presents a negative effect on particle size might be attributed to the fact that the droplet size formed in the solution dispersion into the micronization chamber depends on the interfacial tension between the organic solution and the supercritical antisolvent as well as their density. Yet, an increase in pressure at constant temperature leads to an increase in CO_2 density and hence a better dispersion of the solution in the antisolvent with a consequent decrease in droplet size. Mass transfer is then improved due to the increase of the diffusion coefficient of supercritical CO_2 , thus better removing the solvent from the solution, causing the precipitation of the compound (Chen et al., 2007; Franceschi et al., 2008).

Reverchon et al. (2008), in studies for the production of spherical microparticles using SAS technique; Franceschi et al. (2008) using SEDS and Hong et al. (2007) also using SEDS technique, observed that in some cases the decrease in pressure may induce an increase of particle size while a raise in pressure leads to the opposite effect on particle size.

Temperature was the second most relevant process variable, however with a positive effect, corroborating that higher temperatures leads to the formation of larger size particles due to the improved dissolution, favored at higher temperatures, and lower level of agglomeration and consequently lesser crystal growth (Cocero and Ferrero, 2002; Youn et al., 2011; Priamo et al., 2013). The obtained data are consistent with those from Hong et al. (2007) that used SEDS technique for astaxantin precipitation, since it was verified that an increase in pressure reduces particle size while temperature had an opposite effect.

The model that describes the behavior of particle size (D_p) of the obtained resveratrol microparticles is represented by Equation 1 shown below. Table 4.3 shows the variance analysis (ANOVA) of the average particle size values.

$$D_p = 0.345 + 1.461C^2 - 1.317P + 1.373T - 1.485(P.T) \quad (1)$$

where, C represents solute concentration in the solution and P and T denote the system pressure and temperature, respectively.

Table 4.3 - Variance analysis for the average particle size for resveratrol.

Variation Source	QS	DF	QM	F _{calculated}	F _{tabulated}
Regression	52.995	7	7.571	74.238	8.890
Error	0.306	3	0.102	r²=0.994	
Total	53.301	10			

QS - quadratic sum; DF - degrees of freedom; QM - quadratic mean; F - Fisher test.

According to Box and Wetz, (1973) and Neto et al., (2010), for a regression to be not only statistically significant, but also useful for predictive means, the value of $F_{\text{calculated}}$ must be at least 4 to 5 times greater than $F_{\text{tabulated}}$. Taking this into account, results obtained in this work led to a significant predictive model since a good fit ($r^2=0.994$) was reached with $F_{\text{calculated}}$ 8.35 times greater than $F_{\text{tabulated}}$ obtained in Fisher distribution table, using $\alpha=0.05$ and $DF_{\text{regression}}=7$ and $DF_{\text{residual}}=3$ (Neto et al., 2010).

The system model represented by equation 1 was constructed from the regression coefficients of the significant process variables, in this case pressure, temperature, and the interaction between pressure x temperature. The equation was constructed from the coded variables (-1, 0, +1). According to ANOVA results and Fisher test, the generated model equation is significant and predictive and hence the use of codified variables allows the prediction of D_p values for resveratrol microparticles. Since the model is significant it is possible to generate response surfaces to better visualize the regions of lower values of average particle size.

The temperature x pressure response surface and control curve for D_p (Fig. 4.2 e 4.3) show that the best regions for producing the smallest particles are located at 308 K and pressure from 8 to 12 MPa. Conversely, the region where the largest values of D_p can be found is 8 MPa and temperature from 313 to 318 K.

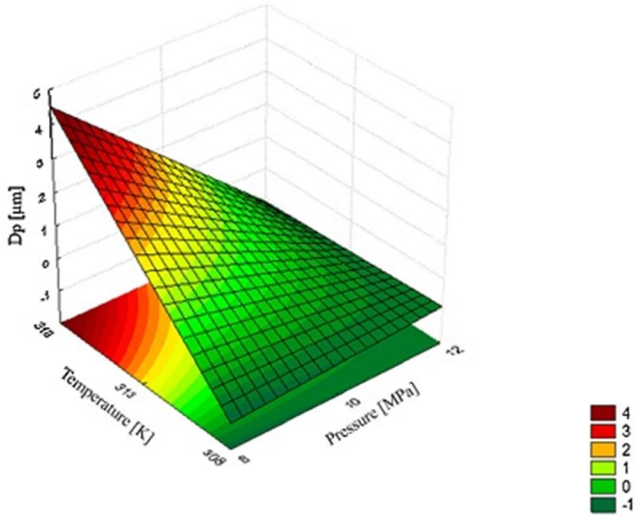


Figure 4.2 - Response surfaces of temperature x pressure.

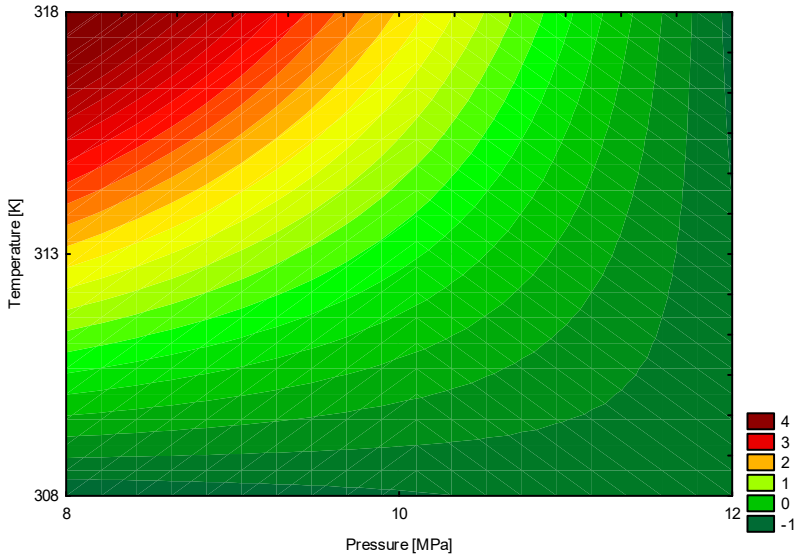


Figure 4.3 - Control curve of temperature x pressure.

Fig. 4.4 shows the micrographies obtained for all the experimental runs and as can be seen, spherical particles were produced in almost all experiments, except for runs 5 and 6 that led to particles like in the shape of needles and plates. Such behavior was also found by Franceschi et al. (2008), in studying the micronization of β -carotene, where particles in the shape of needles and leaf-like were obtained. According to Cocero and Ferrero, (2002), in general, lower temperature implicates less agglomeration and less growth of crystals. The agglomeration of the crystals might be due to a more favorable redissolution of these at higher temperatures, consequently causing production of irregular particles (Priamo et al., 2013).

The smallest average D_p particles was obtained at 8 MPa and 308 K, which is the mildest process operating condition, which may reduce product degradation and from an industrial point of view means lower CAPEX (capital expenditure) and OPEX (operational expenditure) investment.

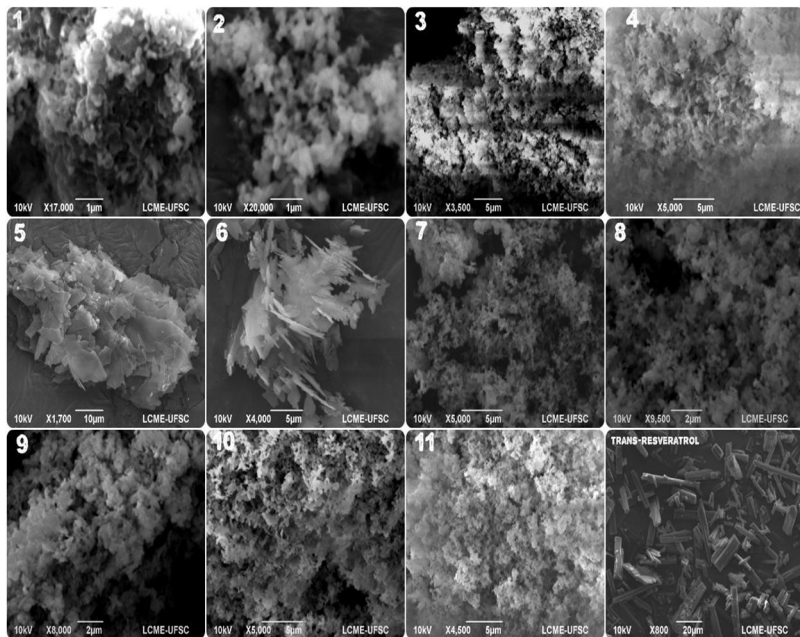


Figure 4.4 - Scanning Electron Microscope (SEM) of the produced particles.

4.3.2. FTIR

From FTIR results shown in Fig. 4.5, it can be seen that trans-resveratrol was not degraded after micronization process or suffered chemical alteration to its cis-resveratrol form. This can be verified by the spectra where both charts overlap. According to Silverstein (2006), the correlation peak to peak constitutes a good proof of identity, since it is unlikely that two different compounds present the same spectrum.

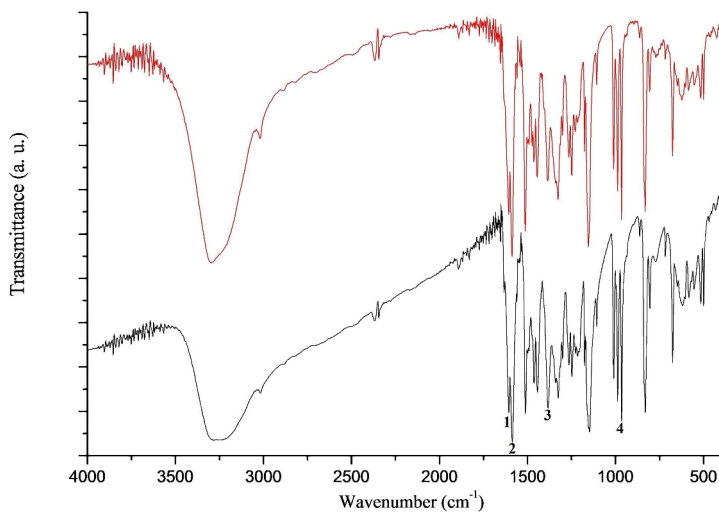


Figure 4.5 - Infrared spectrum of micronized (red line) and non-micronized (dark line) trans-resveratrol by SEDS technique. (1) C-C aromatic double bond. (2) C-C olefin bond. (3) C-C bonds. (4) Band that characterizes the trans form of compound.

FTIR results of trans-resveratrol samples, micronized and non-micronized, showed 3 bands of strong absorption (Fig. 4.5), typical for this compound: 1605 cm^{-1} (1), 1583 cm^{-1} (2) e 1380 cm^{-1} (3). The former corresponds to the C-C aromatic double bond, the second corresponds to the C-C olefin bond and the latter shows C-C bonds. Kumpugdee-Vollrath et al. (2012), when investigating the characterization of trans-resveratrol and cyclodextrins found the same FTIR bands found for resveratrol. According to Bertacche et al., (2006), another important band found is 964 cm^{-1} (4) that characterizes the trans-resveratrol form.

4.3.3 Residual solvent analysis

GC-MS analysis of resveratrol micronized samples permitted the identification of residual dichloromethane and acetone - both solvents used in the micronization process. The content of dichloromethane was found to be 84.07 ppm and 52.90 ppm of acetone. These values of residual solvents are within the limits established by The National Agency for Sanitary Vigilance - ANVISA Brazil (600

ppm), Pharmacopoeia of the people's Republic of China (600 ppm), European Pharmacopoeia (600 ppm) and United States Pharmacopoeia (400 ppm) (Elvassore et al., 2001) and also below the value established by the International Conference on Harmonization (ICH), document Q3C(R5) from 2011, the regulatory authority in terms of drugs and pharmaceutical industries in Europe, Japan and United States, which determinates the maximum DCM concentration for human consumption, 600 ppm.

With regard to acetone, it is classified by ICH as class 3 solvent - low toxicity and low danger to human health with a maximum acceptable concentration of 5000 ppm a much higher value than that found in this work, 52.90 ppm. Thus, it seems that SEDS technique using supercritical CO₂ can be applied for the production of resveratrol microparticles within standards established by regulatory agencies for human consumption.

4.4 CONCLUSIONS

The reduction of particle size may generate several benefits, such as solubility enhancing and a huge increase of specific surface contact surface area and consequently favor the improvement of compound bioavailability. Results found in this work are considered relevant, since it was possible to reduce resveratrol particle size about 167 times with a final value of 220 nm, obtained at the lowest temperature and pressure (308 K and 8 MPa, respectively). Such operational conditions are appealing on the basis of mild processing conditions and the possibility of using SEDS technique to process thermosensitive compounds. Micronized resveratrol showed residual concentrations of DCM and acetone much below those established by regulatory agencies for pharmaceutical compounds, hence allowing human consumption of the micronized product.

Acknowledgements

The authors thank CNPq and CAPES for financial support and scholarships and also LCME-UFSC for the SEM analysis.

4.6 REFERENCES

- Bertacche, V., Lorenzi, N., Nava, D., Pini, E., Sinico, C., 2006. Host-Guest Interaction Study of Resveratrol With Natural and Modified Cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 55, 279–287. doi:10.1007/s10847-006-9047-8
- Boschetto, D.L., Dalmolin, I., de Cesaro, A.M., Rigo, A.A., Ferreira, S.R.S., Meireles, M.A.A., Batista, E.A.C., Vladimir Oliveira, J., 2013. Phase behavior and process parameters effect on grape seed extract encapsulation by SEDS technique. *Ind. Crops Prod.* 50, 352–360. doi:10.1016/j.indcrop.2013.07.044
- Box, G.E.P., Wetz, J., 1973. Criteria for Judging Adequacy of Estimation by an Approximating Response Function. (No. UWIS-DS-73-9). WISCONSIN UNIV MADISON DEPT OF STATISTICS, WISCONSIN UNIV MADISON DEPT OF STATISTICS.
- Chau, C.-F., Wang, Y.-T., Wen, Y.-L., 2007. Different micronization methods significantly improve the functionality of carrot insoluble fibre. *Food Chem.* 100, 1402–1408. doi:10.1016/j.foodchem.2005.11.034
- Chen, A.-Z., Pu, X.-M., Kang, Y.-Q., Liao, L., Yao, Y.-D., Yin, G.-F., 2007. Study of poly(L-lactide) microparticles based on supercritical CO₂. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18, 2339–2345. doi:10.1007/s10856-007-3173-8
- Cocero, M.J., Ferrero, S., 2002. Crystallization of β -carotene by a GAS process in batch Effect of operating conditions. *J. Supercrit. Fluids* 22, 237–245. doi:10.1016/S0896-8446(01)00125-5
- Durán, N., Durán, M., Tasic, L., Marcato, P.D., 2010. Nanocrystal technology in pharmaceuticals. *Quím. Nova* 33, 151–158. doi:10.1590/S0100-40422010000100028
- Elvassore, N., Bertucco, A., Caliceti, P., 2001. Production of insulin-loaded poly(ethylene glycol)/poly(L-lactide) (PEG/PLA) nanoparticles by gas antisolvent techniques. *J. Pharm. Sci.* 90, 1628–1636.

- Franceschi, E., De Cesaro, A.M., Feiten, M., Ferreira, S.R.S., Dariva, C., Kunita, M.H., Rubira, A.F., Muniz, E.C., Corazza, M.L., Oliveira, J.V., 2008. Precipitation of β -carotene and PHBV and coprecipitation from SEDS technique using supercritical CO₂. *J. Supercrit. Fluids* 47, 259–269. doi:10.1016/j.supflu.2008.08.002
- Granzotto, A., Zatta, P., 2014. Resveratrol and Alzheimer's disease: message in a bottle on red wine and cognition. *Front. Aging Neurosci.* 6, 95. doi:10.3389/fnagi.2014.00095
- Gudat, A.E.; Firor, R.L.; Bober, U., 2007. Better precision, sensitivity, and higher sample throughput for the analysis of residual solvents in pharmaceuticals. Agilent Application Note, Publication Number 5989-6023EN.
- He, W.Z., Suo, Q.L., Jiang, Z.H., A, S., Hong, H.L., 2004. Precipitation of ephedrine by SEDS process using a specially designed prefilming atomizer. *J. Supercrit. Fluids* 31, 101–110. doi:10.1016/j.supflu.2004.01.009
- Hong, H.L., Suo, Q.L., He, W.Z., Li, C.P., 2007. Formation of Carotene/Proanthocyanidin Composite Microparticles via the Solution-Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids (SEDS) Process through Prefilming Atomization. *Ind. Eng. Chem. Res.* 46, 6630–6634. doi:10.1021/ie070590a
- Machado Jr, F.R.S., Reis, D.F., Boschetto, D.L., Burkert, J.F.M., Ferreira, S.R.S., Oliveira, J.V., Burkert, C.A.V., 2014. Encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in PHBV by means of SEDS technique using supercritical CO₂. *Ind. Crops Prod.* 54, 17–21. doi:10.1016/j.indcrop.2014.01.007
- Neto, B.B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E., 2010. Como fazer experimentos: Aplicações na Ciência e na Indústria. Bookman Editora.
- Priamo, W.L., Dalmolin, I., Boschetto, D.L., Mezzomo, N., Ferreira, S.R.S., Oliveira, J.V. de, 2013. Micronization processes by supercritical fluid technologies: a short review on process design

- (2008-2012) - doi: 10.4025/actascitechnol.v35i4.18819. Acta Sci. Technol. 35, 695–709. doi:10.4025/actascitechnol.v35i4.18819
- Priamo, W.L., de Cezaro, A.M., Ferreira, S.R.S., Oliveira, J.V., 2010. Precipitation and encapsulation of β -carotene in PHBV using carbon dioxide as anti-solvent. *J. Supercrit. Fluids* 54, 103–109. doi:10.1016/j.supflu.2010.02.013
- Reverchon, E., Adami, R., Caputo, G., De Marco, I., 2008. Spherical microparticles production by supercritical antisolvent precipitation: Interpretation of results. *J. Supercrit. Fluids* 47, 70–84. doi:10.1016/j.supflu.2008.06.002
- Rogers, T.L., Johnston, K.P., Williams, R.O., 2001. Solution-based particle formation of pharmaceutical powders by supercritical or compressed fluid CO₂ and cryogenic spray-freezing technologies. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 27, 1003–1015. doi:10.1081/DDC-100108363
- Silverstein, R.M., 2006. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. LTC.
- Ulrich, S., Wolter, F., Stein, J.M., 2005. Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 452–461. doi:10.1002/mnfr.200400081
- Walle, T., 2011. Bioavailability of resveratrol. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1215, 9–15. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05842.x
- Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M.H., Oatis, J.E., Walle, U.K., 2004. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 32, 1377–1382. doi:10.1124/dmd.104.000885
- Wenzel, E., Somoza, V., 2005. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 472–481. doi:10.1002/mnfr.200500010
- Witte, A.V., Kerti, L., Margulies, D.S., Flöel, A., 2014. Effects of resveratrol on memory performance, hippocampal functional

connectivity, and glucose metabolism in healthy older adults. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 7862–7870. doi:10.1523/JNEUROSCI.0385-14.2014

Youn, Y.-S., Oh, J.H., Ahn, K.H., Kim, M., Kim, J., Lee, Y.-W., 2011. Dissolution rate improvement of valsartan by low temperature recrystallization in compressed CO₂: Prevention of excessive agglomeration. *J. Supercrit. Fluids* 59, 117–123. doi:10.1016/j.supflu.2011.07.008

CAPÍTULO 5

RESULTADOS II

Micronization of trans-resveratrol by supercritical fluid: dissolution, solubility and in vitro antioxidant activity

Submetido para publicação em 16 de janeiro de 2017 (Journal of Food Engineering)

Gean Pablo S. Aguiar^a, Bianca D. Arcari^a, Lorenzo M. P. C. Chaves^a, Camila Dal Magro^a, Daiane L. Boschetto^a, Angelo L. Piato^b, Marcelo Lanza^a, J. Vladimir Oliveira^{a*}

^aDepartment of Chemical Engineering and Food Engineering, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil.

^bDepartment of Pharmacology, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author: ++55 48 37212528; Fax: +55 48 37219687.
E-mail address: jose.vladimir@ufsc.br (J. Vladimir).

Abstract

The micronization process is characterized by the reduction of particle size towards obtaining changes in physical structure and increase the dissolution rate, which leads to increased solubility of the compound and consequently greater bioavailability. Trans-resveratrol is a nutraceutical compound with many biological properties; however, its use in the food industry is limited due to its low solubility in aqueous medium and hence low bioavailability. Due to the large potential of resveratrol, this work aims to investigate the properties of dissolution rate, solubility and in vitro antioxidant activity of micronized resveratrol by SEDS technique. The micronized compound increased by around 2.8 times its solubility in water. There was an increase in the dissolution rate of about 1.8 times and the antioxidant activity of micronized compound increased over the non-micronized one. Results obtained in this work are promising as it enables the use of resveratrol in the food industry since the micronization process led to improved properties of the compound.

Keywords: SEDS; Supercritical CO₂; DPPH; resveratrol; solubility

5.1 INTRODUCTION

Currently, 70% of the drugs presents low aqueous solubility and about 40% of orally administered drug release is categorized as immediate practically insoluble in water ($<100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Kawabata et al., 2011). The rate of dissolution is limited by the low solubility which results in low bioavailability of drugs administered orally, in view of this, which features aqueous solubility compounds less than $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ has low bioavailability (Hörter and Dressman, 2001).

Particle micronization is a good alternative to increase the dissolution rate of low soluble compounds by greatly enhancing the contact surface area, as the particle size is reduced. According to the Prandtl boundary layer equation, a decrease in the thickness of the diffusion layer by reducing the particle size, especially below $<5 \mu\text{m}$, results in a rapid dissolution (Hörter and Dressman, 2001; Kawabata et al., 2011; Mosharraf and Nyström, 1995).

The nutraceutical compound *trans*-resveratrol is a polyphenol that is attracting great interest because of its many biological properties such as antioxidant, anti-inflammatory, antifungal, immunomodulator, cardioprotective as well as antidepressant (Baur and Sinclair, 2006; Hurley et al., 2014; Poulsen et al., 2013). However, the use of this compound is still limited by the low bioavailability and solubility in aqueous medium (Francioso et al., 2014).

Considering the relevant biological properties of resveratrol, this work aims to study the differences of micronized particles by SEDS technique versus non-micronized particles in order to observe possible improvements in solubility and dissolution rate and *in vitro* antioxidant activity.

5.2 MATERIALS AND METHODS

5.2.1 Materials

Trans-resveratrol (Galena LTDA Laboratory - Campinas/SP) with a purity of 99.5% was used as the solute to perform the precipitation. Dichloromethane (DCM 99.5%) and acetone (99.5%) were purchased from Vetec (Sigma-Aldrich) and CO_2 (99.9% in liquid phase) was provided by White Martins S.A.

5.2.2 Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids Technique (SEDS)

The SEDS experimental apparatus and procedure used for the micronization of the trans-resveratrol employing supercritical CO₂ as anti-solvent is described in detail elsewhere Boschetto et al. (2013); Franceschi et al. (2008) and Priamo et al. (2010).

5.2.3 Conditions for precipitation

For the micronization of trans-resveratrol, work process parameters were adapted from Aguiar et al. (2016). The range of parameters used were: solute concentration of 4 and 20 mg·mL⁻¹, at 35 and 45 °C, solution flow rate of 1 mL·min⁻¹, anti-solvent flow rate of 20 mL·min⁻¹ (20 MPa, 5 °C) and operating pressure of 8 MPa.

In this work, solute solubilization was improved by a mixture of 40% (v/v) acetone + 60% (v/v) dichloromethane according to Aguiar et al. (2016).

5.2.4 Particles Characterization

In order to characterize the particles, the following analyzes were performed: Morphology by Scanning Electron Microscopy (SEM) and determination of particle size by software Meter Size (version 1.1); Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR); solubility evaluation (water, 0.1 M HCl and phosphate buffer) according to the methodology of Cheng et al. (2016); determination of the dissolution rate of trans-resveratrol in distilled water according to the methodology of Cheng et al. (2016); evaluation of the antioxidant activity by the DPPH method according to the methodology of Khan et al. (2016) and the EC₅₀ calculations followed the methodology of Mensor et al. (2001) and Powder X-ray diffraction (PXRD) data was collected from a θ - θ D2 Phaser (Bruker) diffractometer equipped with a Cu K α source ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) operated at 30 kV and 10 mA, using Scintillation counter 1-dimensional LYNXEYE detector. Diffraction data was collected between 5 and 50 2θ degrees and 0.5 s counting time per step.

5.3 RESULTS AND DISCUSSION

Results of *trans*-resveratrol micronization in terms of mean particle size (D_p) as well as the variation coefficient (VC) of experimental data obtained at 8 MPa are shown in Table 5.1.

Table 5.1 - Particle size values of micronized and non-micronized compound.

	Concentration ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	D_{\min} (μm)	D_{\max} (μm)	D_n (μm)	VC
Raw	-----	-----	1.71	126.09	36.67 ± 21.42	0.58
Run 1	20	35	0.09	0.46	0.22 ± 0.09	0.40
Run 2	4	45	1.34	18.64	6.98 ± 3.26	0.47

In addition to different particle sizes obtained, e.g. in run 1 average size of $0.22\ \mu\text{m}$ and run 2 of $6.98\ \mu\text{m}$, distinct particle morphology was observed as in run 1 presented spherical structures and run 2 plate-shaped particles (Fig. 5.1). The difference between morphology according to the Aguiar et al. (2016) is due to high temperatures leads to the formation of larger size particles due to the improved dissolution.

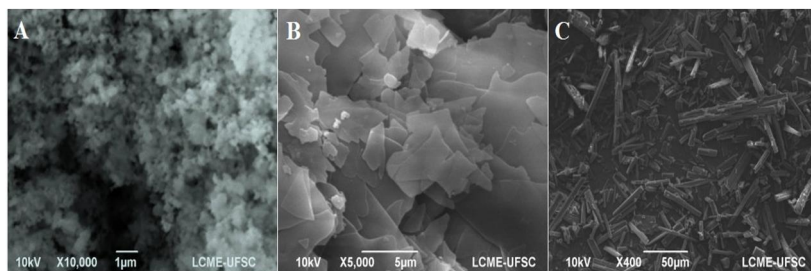


Figure 5.1 - Scanning Electron Microscope (SEM) the particles of resveratrol micronized and non-micronized: (A) Run 1, (B) Run 2 and (C) Raw *trans*-resveratrol.

The analysis performed by GC-MS and GC-FID showed that the particles were free of organic solvent, so that no residual solvent was detected in the final product, and thus meets the standards of the regulatory agencies for human consumption.

5.3.1 Solubility analysis

Solubility results of original (non-processed) and micronized resveratrol in water, phosphate buffer and 0.1 M HCl solution are shown in Fig. 5.2.

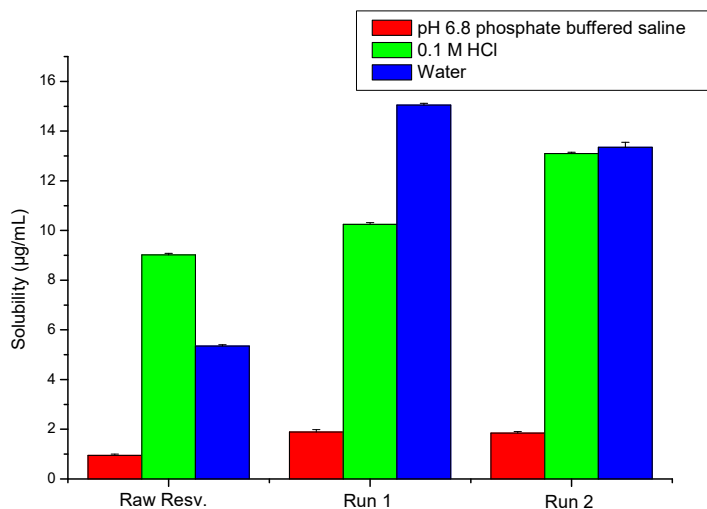


Figure 5.2 - Solubility the particles of resveratrol micronized and non-micronized in different solvents.

It can be seen from Fig. 5.2 that, in all dissolution media, the micronized particles exhibited greater solubility over non-processed resveratrol. The solubility of resveratrol in water increased approximately 2.8 times, from $5.35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of non-micronized compound to $15.05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for sample of run 2.

Similar results were found by (Kim et al., 2012), for resveratrol nanoparticles obtained by precipitation in hydroxypropyl methylcellulose as antisolvent with controlled temperature, followed by freeze drying. In the aforementioned work, the solubility of resveratrol in water was increased 2.1 times when compared to the non-micronized compound. Other authors also found similar behavior results compared with those found in this work, such as (Cheng et al., 2016) in micronization experiments of etoposide, through SEDS technique, (Chen et al., 2012) in the process of nanonization of methotrexate, also

by SEDS technique and (Chau et al., 2007), in the study of different methods of micronization to improve the functionality of insoluble fiber. In all of these cited studies the solubility of the target compound increased after processing.

The increase in solubility and consequent enhancement in the bioavailability of resveratrol are of great importance both for the purpose of pharmaceutical in food industries applications. In the food industry, for example, the low solubility of the compound is still a challenging task for its use as a nutraceutical ingredient, due to the difficulties in the incorporation of relatively high amounts in aqueous-base food products (Davidov-Pardo and McClements, 2014).

5.3.2 Analysis of dissolution rate

Results obtained in the dissolution rate of resveratrol samples in water are presented in Fig. 5.3.

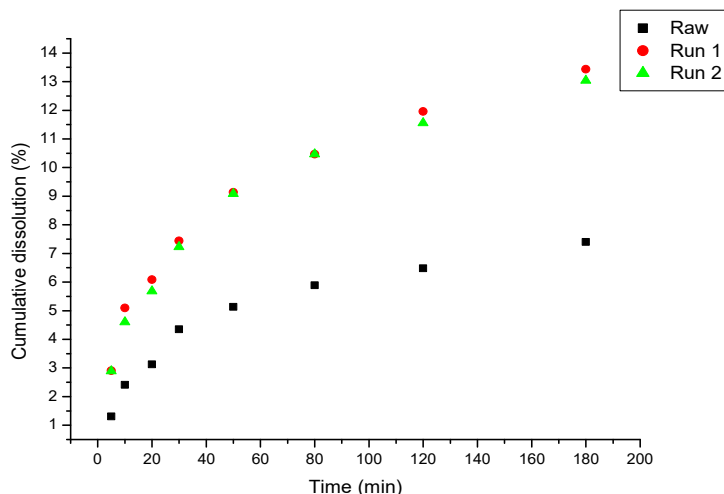


Figure 5.3 - Dissolution rate of micronized and non-micronized resveratrol.

It can be observed in Fig. 5.3 that the dissolution rate of micronized particles was significantly greater than that of non-

micronized compound. At the end of the analysis (180 min), the cumulative dissolution of micronized particles, 13.43 and 13.04% for runs 1 and 2, respectively, was ~ 1.8 times higher than that presented by the non-micronized resveratrol particles, 7.40%.

It is worthy noting that at 20 min both runs 1 and 2 showed a higher dissolution rate than raw resveratrol observed at 180 min, thus corroborating the literature in the way that higher dissolution rates are obtained for reduced particle sizes.

Of course, results of dissolution rate are of great interest for a possible industrial use of *trans*-resveratrol in aqueous solutions, as the increased solubility may provide greater bioavailability of the compound.

5.3.3 DPPH radical scavenging assay

Fig. 5.4 depicts the antioxidant activity for micronized and unprocessed resveratrol as a function of concentration, where it can be noted that vales obtained for particles produced in run 2 were always smaller than those of raw resveratrol. On the other hand, run 1 provided greater antioxidant activity compared to other sample particles, which may be explained in terms of much reduced particles size obtained. The EC_{50} results for micronized and non-micronized samples are presented in Table 5.2.

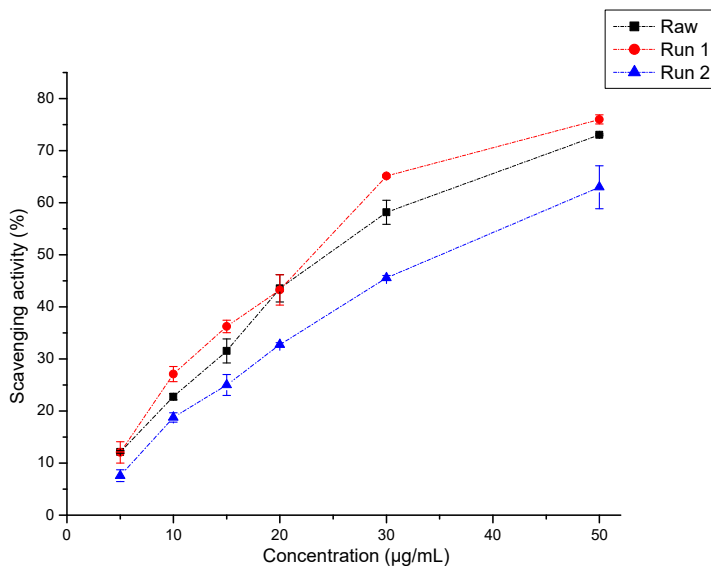


Figure 5.4 - Antioxidant activity of micronized and non-micronized samples.

Table 5.2 - EC_{50} of trans-resveratrol micronized and non-micronized.

	EC_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Raw	27.92 ± 1.08^b
Run 1	25.92 ± 0.66^b
Run 2	36.47 ± 1.94^a

*Measurements followed by the same letter does not differ statistically ($p > 0.05$), One-way ANOVA followed by Tukey post hoc test.

As can be seen from Table 5.2, EC_{50} of particles of run 1 showed no statistical significant difference (95% confidence level) in relation to raw resveratrol. Run 2 particles, on the other hand, showed a higher EC_{50} and, consequently, a lower antioxidant activity than the raw resveratrol and run 1. The decrease in antioxidant activity found in run 2 (Fig. 5.5), may be due to the higher temperature used in the experiment (45 °C), since the temperature is one of the factors that most affect the antioxidant activity of compounds. Variations in temperature affect the mechanisms of action of various antioxidants in different ways and, in

general, an increase in temperature causes acceleration of initiation reactions, reducing the antioxidant activity (Réblová, 2012).

5.3.4 Powder X-ray diffraction (PXRD)

Samples of micronized and non-micronized resveratrol were characterized by PXRD to investigate the reflection diffraction of samples, with results presented in Fig. 5.5.

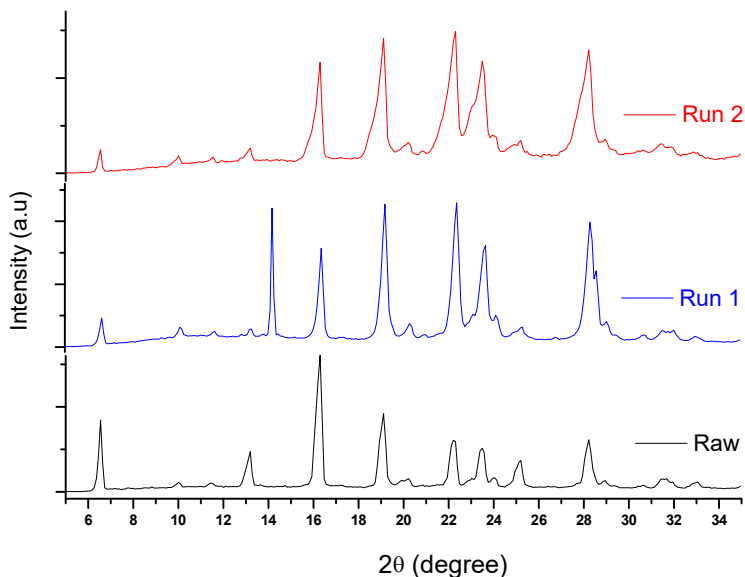


Figure 5.5 - Powder X-Ray Diffraction (PXRD) of micronized and non-micronized resveratrol particles.

The PXRD patterns of the non-micronized compound presented features reflections of crystallinity of resveratrol, as observed by other authors in 2θ equal to 6.55, 16.29, 18.22, 19.11, 22.21 and 23.48 (Kamath et al., 2013; Mendes et al., 2012).

It can be observed from Fig. 5.5 that there were changes in the pattern of peaks presented by the non-micronized and micronized compound. For example, the PXRD pattern of the particles of run 1 showed a slight shift in the angle of all the peaks compared to standard

sample. Besides these changes, there was a new peak appearance at an angle of 14.19. The same can be observed for the PXRD pattern of run 2 which was similar to run 1. These differences in angles (displacements, appearance and/or disappearance of peaks) show that new polymorphic forms of the compound were generated by the SEDS process, since they are formed in different PXRD pattern (Cheng et al., 2016).

Polymorphism is the ability of a substance exhibits so as to exist in the solid state in two or more different crystal structures (Araujo et al., 2012). Different polymorphic forms of a same compound can present significant differences in solubility, processability and physical and chemical stability (Aguiar et al., 1999). Therefore, the existence of new polymorphic forms of the compound, generated by the SEDS technique, can be related to the increased solubility and dissolution rate of micronized compound.

5.3.5 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Fig. 5.6 shows the results of FTIR, where it can be noted that the peaks of three samples present total overlap and hence it is possible to affirm that the chemical structure of the compound was not changed. According Silverstein (2006) a correlation peak to peak is an excellent evidence of the identity of the organic compound, since it is unlikely that two compounds have the same infrared spectrum.

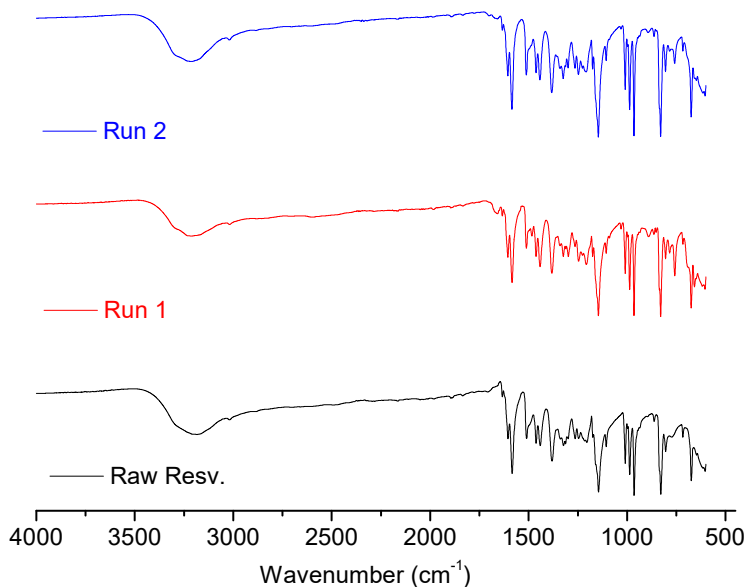


Figure 5.6 - Infrared spectroscopy (FTIR) of micronized and non-micronized compound.

5.4 CONCLUSION

The micronized resveratrol increased the rate of dissolution, solubility and antioxidant activity allowing novel uses for food and pharmaceutical industry, since one of the main barriers for the use of this compound is its low solubility. The micronized particles were free from organic solvents, therefore present no risk to human health. By PXRD pattern it can be concluded that micronized compound has a different crystalline structure over the non-micronized compound that confers new properties to the compound. The antioxidant activity was higher compared with the non-micronized compound and more soluble than raw resveratrol. This is very important result since resveratrol, due to its antioxidant potential and great interest in the food industry, has an important role in reducing the lipid oxidation of the tissues and thus when incorporated into food products helps to preserve food quality and

reduce the risk of development of some diseases when integrated into the diet.

Acknowledgements

The authors thank CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development, Brazil - Project 478520/2013-1) and CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, Brazil) for financial support and scholarships and also LCME-UFSC for the SEM analysis.

5.5 References

- Aguiar, G.P.S., Boschetto, D.L., Chaves, L.M.P.C., Arcari, B.D., Piato, A.L., Oliveira, J.V., Lanza, M., 2016. Trans-resveratrol micronization by SEDS technique. *Ind. Crops Prod.* 89, 350–355. doi:10.1016/j.indcrop.2016.04.047
- Aguiar, M.R.M.P. de, Gemal, A.L., Gil, S., Silva, R.A. da, 1999. Characterization of polymorphism in pharmaceuticals by solid state nuclear magnetic resonance. *Quím. Nova* 22, 553–564. doi:10.1590/S0100-40421999000400014
- Araujo, G.L.B. de, Pitaluga JR, A., Antonio, S.G., Santos, C. de O.P., Matos, J. do R., 2012. Polimorfismo na produção de medicamentos. *Rev. Ciênc. Farm. Básica E Apl.* 33, 27–36.
- Baur, J.A., Sinclair, D.A., 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 493–506. doi:10.1038/nrd2060
- Boschetto, D.L., Dalmolin, I., de Cesaro, A.M., Rigo, A.A., Ferreira, S.R.S., Meireles, M.A.A., Batista, E.A.C., Vladimir Oliveira, J., 2013. Phase behavior and process parameters effect on grape seed extract encapsulation by SEDS technique. *Ind. Crops Prod.* 50, 352–360. doi:10.1016/j.indcrop.2013.07.044
- Chau, C.-F., Wang, Y.-T., Wen, Y.-L., 2007. Different micronization methods significantly improve the functionality of carrot insoluble

- fibre. Food Chem. 100, 1402–1408.
doi:10.1016/j.foodchem.2005.11.034
- Chen, A.-Z., Li, L., Wang, S.-B., Zhao, C., Liu, Y.-G., Wang, G.-Y., Zhao, Z., 2012. Nanonization of methotrexate by solution-enhanced dispersion by supercritical CO₂. *J. Supercrit. Fluids* 67, 7–13. doi:10.1016/j.supflu.2012.03.004
- Cheng, Y., Xu, W., Chen, Z., Wang, Z., Huang, D., 2016. Micronization of etoposide using solution-enhanced dispersion by supercritical CO₂. *J. Supercrit. Fluids* 115, 10–16. doi:10.1016/j.supflu.2016.03.006
- Davidov-Pardo, G., McClements, D.J., 2014. Resveratrol encapsulation: Designing delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues. *Trends Food Sci. Technol.* 38, 88–103. doi:10.1016/j.tifs.2014.05.003
- Franceschi, E., De Cesaro, A.M., Feiten, M., Ferreira, S.R.S., Dariva, C., Kunita, M.H., Rubira, A.F., Muniz, E.C., Corazza, M.L., Oliveira, J.V., 2008. Precipitation of β -carotene and PHBV and coprecipitation from SEDS technique using supercritical CO₂. *J. Supercrit. Fluids* 47, 259–269. doi:10.1016/j.supflu.2008.08.002
- Francioso, A., Mastromarino, P., Restignoli, R., Boffi, A., d’Erme, M., Mosca, L., 2014. Improved Stability of trans-Resveratrol in Aqueous Solutions by Carboxymethylated (1,3/1,6)- β -d-Glucan. *J. Agric. Food Chem.* 62, 1520–1525. doi:10.1021/jf404155e
- Hörter, D., Dressman, J.B., 2001. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract1. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Special issue dedicated to Dr. Eric Tomlinson, *Advanced Drug Delivery Reviews, A Selection of the Most Highly Cited Articles, 1991-1998* 46, 75–87. doi:10.1016/S0169-409X(00)00130-7
- Hurley, L.L., Akinfiresoye, L., Kalejaiye, O., Tizabi, Y., 2014. Antidepressant effects of resveratrol in an animal model of depression. *Behav. Brain Res.* 268, 1–7. doi:10.1016/j.bbr.2014.03.052

- Kamath, M.S., Ahmed, S.S., Dhanasekaran, M., Santosh, S.W., 2013. Polycaprolactone scaffold engineered for sustained release of resveratrol: therapeutic enhancement in bone tissue engineering. *Int. J. Nanomedicine* 9, 183–195. doi:10.2147/IJN.S49460
- Kawabata, Y., Wada, K., Nakatani, M., Yamada, S., Onoue, S., 2011. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. *Int. J. Pharm.* 420, 1–10. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.08.032
- Khan, M.A., Rahman, M.M., Sardar, M.N., Arman, M.S.I., Islam, M.B., Khandakar, M.J.A., Rashid, M., Sadik, G., Alam, A.K., 2016. Comparative investigation of the free radical scavenging potential and anticancer property of *Diospyros blancoi* (Ebenaceae). *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 6, 410–417. doi:10.1016/j.apjtb.2016.03.004
- Kim, S., Ng, W.K., Dong, Y., Das, S., Tan, R.B.H., 2012. Preparation and physicochemical characterization of trans-resveratrol nanoparticles by temperature-controlled antisolvent precipitation. *J. Food Eng.* 108, 37–42. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.07.034
- Mendes, J.B.E., Riekens, M.K., de Oliveira, V.M., Michel, M.D., Stulzer, H.K., Khalil, N.M., Zawadzki, S.F., Mainardes, R.M., Farago, P.V., 2012. PHBV/PCL microparticles for controlled release of resveratrol: physicochemical characterization, antioxidant potential, and effect on hemolysis of human erythrocytes. *ScientificWorldJournal* 2012, 542937. doi:10.1100/2012/542937
- Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitão, G.G., Reis, A.S., dos Santos, T.C., Coube, C.S., Leitão, S.G., 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.* PTR 15, 127–130.
- Mosharraf, M., Nyström, C., 1995. The effect of particle size and shape on the surface specific dissolution rate of microsized practically insoluble drugs. *Int. J. Pharm.* 122, 35–47. doi:10.1016/0378-5173(95)00033-F

- Poulsen, M.M., Jørgensen, J.O.L., Jessen, N., Richelsen, B., Pedersen, S.B., 2013. Resveratrol in metabolic health: an overview of the current evidence and perspectives. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1290, 74–82. doi:10.1111/nyas.12141
- Priamo, W.L., de Cezaro, A.M., Ferreira, S.R.S., Oliveira, J.V., 2010. Precipitation and encapsulation of β -carotene in PHBV using carbon dioxide as anti-solvent. *J. Supercrit. Fluids* 54, 103–109. doi:10.1016/j.supflu.2010.02.013
- Réblová, Z., 2012. Effect of temperature on the antioxidant activity of phenolic acids. *Czech J. Food Sci.* 30, 171–177.
- Silverstein, R.M., 2006. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. LTC.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS III

N-acetylcysteine micronization by SEDS technique using supercritical CO₂¹

Aceito para publicação em 24 de novembro de 2016 (Brazilian Journal of Chemical Engineering)

Gean Pablo S. Aguiar^a, Lorenzo M. P. C. Chaves^a, Daiane L. Boschetto^a, Angelo L. Piatto^b, J. Vladimir Oliveira^a, Marcelo Lanza^{a,2}

^aDepartment of Chemical Engineering and Food Engineering, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil.

^bDepartment of Pharmacology, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

¹ This is an extended version of the manuscript presented at the VIII Brazilian Congress of Applied Thermodynamics - CBTermo 2015, Aracaju, Brazil.

² Corresponding author: +55 48 37212528; Fax: +55 48 37219687.

E-mail address: m.lanza@ufsc.br (M. Lanza).

ABSTRACT

The N-acetylcysteine (NAC) is a thiol (-SH) with a strong antioxidant activity. This compound has demonstrated positive effects on chronic kidney disease, cancer, pulmonary insufficiency and other diseases. The aim of this work was to investigate the application of Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids (SEDS) technique in the micronization of NAC using a 2^3 Central Composite Design (CCD) with 3 central points as well as to assess the influence of active compound concentration, temperature and pressure on the particle size produced. The average size of the drug before SEDS processing was verified to be 709.82 μm while the best result led to a particle size of 2.86 μm , which means a reduction of about 248 times. It was also observed that a reduction in particle size led to an increase in the dissolution rate with 100% dissolution.

Keywords: CO₂; Supercritical fluid; NAC; SEDS.

6.1 INTRODUCTION

The micronization process is characterized by the reduction of the average particle size for the purpose of providing changes in physical structure (Chau et al., 2007). There are numerous advantages for reducing the size of pharmaceutical compounds, amongst them an increase in the dissolution rate and increased bioavailability. The use of supercritical fluid techniques in the micronization process, compared with conventional techniques, present many advantages, such as low solvent use, ability to work with thermosensitive compounds, low concentration of residual solvent and others (He et al., 2004).

Chemically, N-acetylcysteine (NAC) is a thiol with a potent antioxidant activity. NAC showed effects in numerous conditions (Cazzola et al., 2015; Andrade et al., 2015; Elbini Dhouib et al., 2016), and in recent years, there are a growing number of studies that show the benefits of N-acetylcysteine (NAC) in a wide range of neuropsychiatric disorders (Berk et al., 2013, Berk et al., 2014; Deepmala et al., 2015; Rosenblat et al., 2016). However, NAC has a low bioavailability through oral administration, about 10%. After an oral dose, most of the NAC is metabolized into other compounds, such as cysteine and inorganic sulphite (Kelly, 1998).

The oral absorption of drugs can be improved by increasing the dissolution rate of the drug, by raising their surface area or by enhancing the saturation solubility. The first point can be reached by micronization, however, for most drugs this procedure is not usually sufficient because even after the micronization process there is no increase in the dissolution rate. However, when the micronized compound has an increased dissolution rate, it favors the drug to reach therapeutic plasma levels, thereby increasing their bioavailability (Durán et al., 2010).

Considering the potential therapeutic use of NAC, the goal of this work was to investigate the application of solution enhanced dispersion of supercritical fluids (SEDS) micronization to reduce the particle size, increase the specific surface contact area and enhance its solubility, consequently improving the compound bioavailability.

6.2 MATERIALS AND METHODS

6.2.1 Materials

N-acetylcysteine, with a purity of 99.2%, was purchased from Iberoquímica Magistral Laboratory (Jundiaí/SP). Dichloromethane (DCM 99.5%) and acetone (99.5%) were purchased from Vetec (Sigma-Aldrich) and carbon dioxide (99.9% in liquid phase) was provided by White Martins S.A.

6.2.2 Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids Technique (SEDS)

A schematic diagram of the experimental apparatus is presented in Figure 6.1. The SEDS experimental apparatus and procedure used for the micronization of the pure compound, N-acetylcysteine, employing supercritical CO₂ as anti-solvent is described in detail by Franceschi et al. (2008).

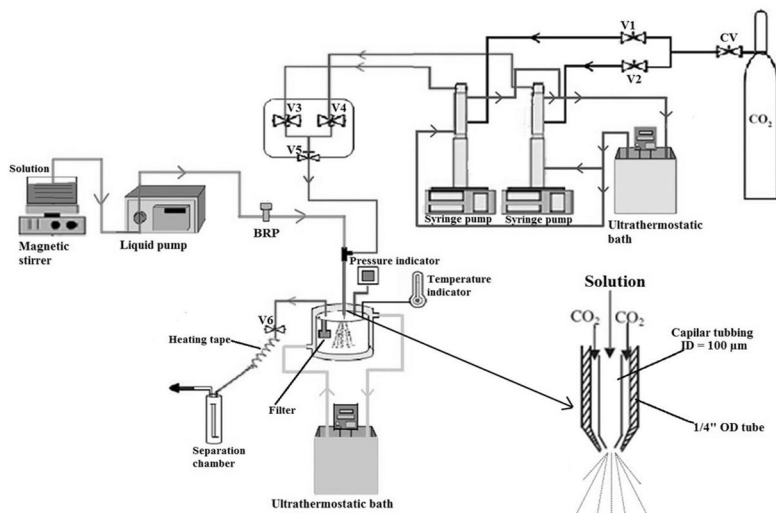


Figure 6.1 - Schematic diagram of the experimental apparatus using the SEDS technique. CV – Check – Valve; V1, V2, V3 and V4 – Ball valve; V5 and v6 – Needle valve; BRP – Back Pressure Regulator.

6.2.3 Experimental conditions for precipitation and coprecipitation

For the micronization of N-acetylcysteine the following process parameters were adopted based on previous works of the group: solute concentration of 4, 12 and 20 mg·mL⁻¹, at 35, 40 and 45 °C, solution flow rate of 1 mL·min⁻¹, antisolvent flow rate of 20 mL·min⁻¹ (20MPa, 5 °C with resulting density of 1.0007 g·mL⁻¹) and operating pressure of 8, 10 and 12 MPa (Franceschi et al., 2008; Priamo et al., 2010; Boschetto et al., 2013; Machado Jr et al., 2014). In this work, solute solubilization was improved by a mixture of 40% (v/v) acetone + 60% (v/v) dichloromethane. As mentioned, a 2³ Central Composite Design (CCD) with triplicate runs at the central points (Table 6.1) was employed to evaluate the influence of process variables on the morphology, size and size distribution of particles produced.

Table 6. 1 - Variables studied in the micronization process of the samples.

Variable	Level		
	-1	0	+1
Concentration (mg·mL ⁻¹)	4	12	20
Pressure (MPa)	8	10	12
Temperature (°C)	35	40	45

6.2.4 Morphology and determination of particle size

The morphology of the N-acetylcysteine samples was determined using scanning electron microscopy (SEM) (JEOL JSM-6390LV, United States). The mean particle size was determined using the software Meter Size (version 1.1) (Machado Jr et al., 2014). From the calculated average particle size, the standard deviation and the variation coefficient (VC) were used as statistical tools to express the variability of the data.

6.2.5 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

The Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) technique was used in the non-micronized and micronized samples in order to study possible changes of the compound after micronization. Measurements were performed in a spectrophotometer Shimadzu IRPrestige-21. Approximately 1 mg of microparticles was triturated

with KBr and pressed into a pellet for FTIR characterization within spectral range of 400-4000 cm^{-1} .

6.2.6 Dissolution rate analysis

To determine the dissolution rate of N-acetylcysteine, a methodology was adapted from Cheng et al. (2016). Samples (50 mg) were added to 100 mL distilled water and maintained under constant stirring (100 rpm) at 37 °C. At selected periods of 0, 60, 120, 180, 240, 300, 360 and 420 seconds, 1.5 mL was collected from the solution and immediately replenished with pure solvent to maintain the original volume. Then, the samples were filtered using 0.22 μm membranes and assayed for N-acetylcysteine concentration employing the UV-visible Spectrophotometric procedure described by Raggi et al. (1982).

6.2.7 Powder X-ray diffraction (PXRD)

PXRD data was collected from a θ - θ D2 Phaser (Bruker) diffractometer equipped with a Cu $K\alpha$ source ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) operated at 30 kV and 10 mA, using Scintillation counter 1-dimensional LYNXEYE detector. Diffraction data was collected between 5 and 50 2θ degrees and 0.5 s counting time per step.

6.2.8 Identification and quantification of residual solvent

Gas chromatography was used (GC model 5975C Inert MSD brand Agilent Technologies), coupled with mass spectrometer (GC-MS) in headspace vial for the identification of residual solvent in the particles produced. The operation conditions were adapted from the method described by Gudat et al. (2007) with a DB624 - 30 m x 0.45 mm x 2.55 μm column. The quantification of residual solvent was then investigated by gas chromatography - flame ionization detector (GC-FID) using the same operation conditions as in the GC-MS.

6.3 RESULTS AND DISCUSSIONS

6.3.1 N-acetylcysteine micronization

Results from the 2^3 Central Composite Design (CCD) are shown in Table 6.2, which shows the values of mean particle size (X) as well as the variation coefficient (VC) of experimental data.

Table 6.2 - Results of 2^3 CCD experimental design of NAC micronization.

Run	Concentration (mg·mL ⁻¹)	Pressure (MPa)	Temperature (°C)	X (µm)	VC
1	4	8	35	55.2	0.5
2	20	8	35	2.9	0.6
3	4	12	35	254.9	0.6
4	20	12	35	93.6	0.4
5	4	8	45	591.5	0.5
6	20	8	45	314.8	0.5
7	4	12	45	257.5	0.7
8	20	12	45	106.1	0.4
9	12	10	40	153.1	0.4
10	12	10	40	121.5	0.4
11	12	10	40	167.9	0.3

The mean particle size for the non-micronized compound is 709.8 µm and compared with the result found in run 2, 2.9 µm, a relevant particle size reduction of about 248 times is noticed. Franceschi et al. (2008) in studying the micronization process of β-carotene by SEDS technique reached the smaller particle size, 3.2 µm, at 8 MPa. The fact that micro-scale spherical particles were obtained at the mildest process operating condition (8 MPa and 35 °C) is very important, due to reduced product degradation and, from an industrial point of view, lower CAPEX (capital expenditure) and OPEX (operational expenditure) are involved in the production.

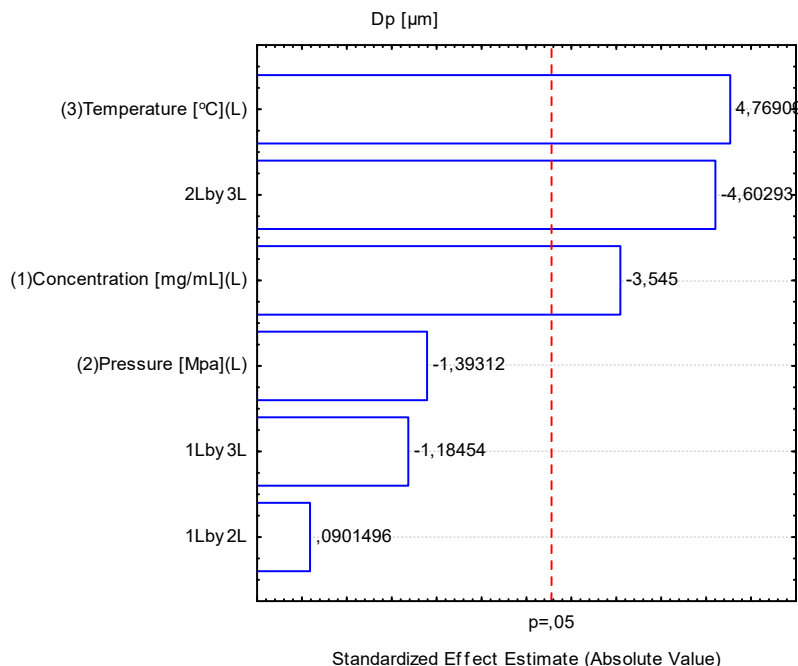


Figure 6.2 - Pareto Chart showing the effect of micronization process parameters on the solute particle size.

The Pareto graph (Figure 6.2) reveals that the most relevant micronization process variable (95% confidence level) is the operating temperature, which has a positive effect and therefore an increase of this parameter leads to an undesirable increase in particle size. It is interesting to note that in runs at the same pressures and concentrations, at temperature of 45 °C, an increase in particle size was verified (Table 6.2). Therefore, a temperature of 45 °C is not interesting in this micronization process, due induce undesirable increase in particle size.

Cheng et al. (2016) in investigating the etoposide micronization using acetone as solvent within SEDS technique, found that a raise in temperature led to an increase in particle size. This may be attributed to the fact that an increase in temperature at constant pressure causes a reduction in CO₂ density, and hence a decrease in the solubility of etoposide in acetone what leading to a lower degree of supersaturation and an increase in the particle size. Aguiar et al. (2016) in the micronization of trans-resveratrol using SEDS technique, also found the

increasing temperature from 35 °C to 45 °C resulted in larger particles, this corroborating that higher temperatures leads to the formation of larger size particles due to the improved dissolution, favored at higher temperatures, and lower level of agglomeration and consequently lesser crystal growth (Priamo et al., 2013).

According to Chen et al. (2007), the negative effect showed by the cross interaction of pressure x temperature on particle size might be attributed to the fact that the droplet size formed in the dispersed solution in the micronization chamber depends on the interfacial tension between the organic solution and the supercritical antisolvent, as well as their densities. Yet, an increase in pressure at constant temperature leads to an increase in CO₂ density, hence a better dispersion of the solution in the antisolvent with a consequent decrease in droplet size. Mass transfer is then improved due to the increase of the diffusion coefficient of supercritical CO₂, thus better removing the solvent from the solution, causing the precipitation of the compound (Chen et al., 2007; Franceschi et al., 2008).

As observed from the Pareto chart (Figure 6.2), the third significant process variable is the solution concentration, with an increase in concentration leads to a reduction in average particle size.

In runs 1 to 8, in trials at the same temperature and pressure (Table 6.2), but with a solution concentration of 20 mg·mL⁻¹, a reduction in particle size was verified, making thus evident the influence of concentration on the process as in the case of runs 1 and 2 wherein the reduction was 55 µm to 2.86 µm.

The same behavior was verified by Franceschi et al. (2008), who studied the micronization process of β-carotene by SEDS technique, and found also that the increase of solution concentration reduced the average particle size. Hong et al. (2009) using SEDS technique for precipitation of astaxanthin also verified that increased concentration reduces the particles diameter.

The effect of solution concentration can be explained in terms of supersaturation, because when dilute solutions are injected into the camera, the precipitation rate of supersaturation is smaller and the nucleation process is slower. Therefore, the small amount of cores generated under these conditions favor the growth engine of the nuclei, and therefore generating larger particles, besides increasing size distribution. When the injected solution is close to saturation, the nucleation mechanism prevails over the mechanism of particle growth due to high supersaturation rate, consequently generating smaller-sized particles (Cardoso et al., 2008).

The fact that the concentration of the solution affects the process was also observed by Wubbolts et al. (1999), who studied the ascorbic acid precipitation from an ethanol solution employing CO₂ as antisolvent, and found that the increase of solute concentration reduced the particle size. These authors attributed this behavior to the fact that at high solution concentrations, at the time that the solute precipitates, occurs intense nucleation promoting at production smaller particles with more uniform size.

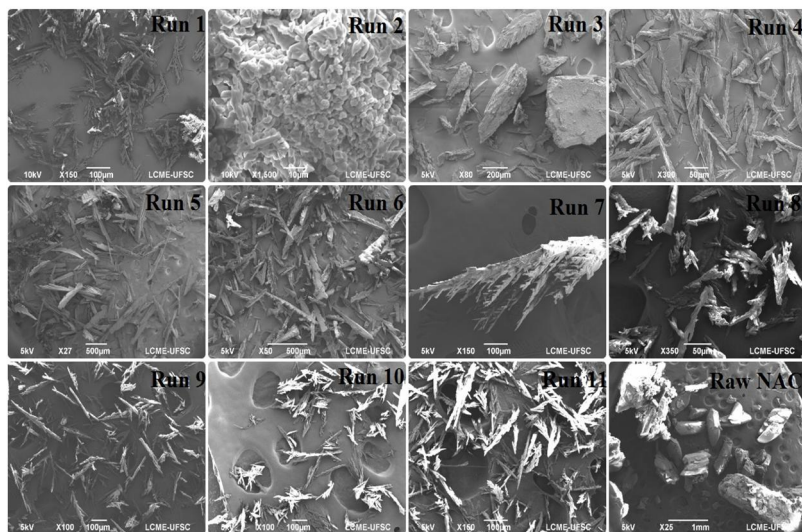


Figure 6.3 - Scanning Electron Microscope (SEM) of the produced particles.

As can be seen from the scanning electronic micrographies (Figure 6.3), all the particles obtained as of prismatic morphology. The run 2 where obtained more homogeneous particles in relation to other run. In such run the smaller particle size was obtained. Franceschi et al. (2008) also obtained β -carotene particles in the form of prismatic in the SEDS micronization process.

6.3.2 FTIR

It can be seen from FTIR results shown in Figure 6.4 that N-acetylcysteine was not degraded after micronization process nor suffered chemical alteration. This can be verified by the spectra where both charts overlap. According to Silverstein (2006) it is unlikely that two different compounds present the same spectrum, thus the correlation peak to peak constitutes a good proof of identity.

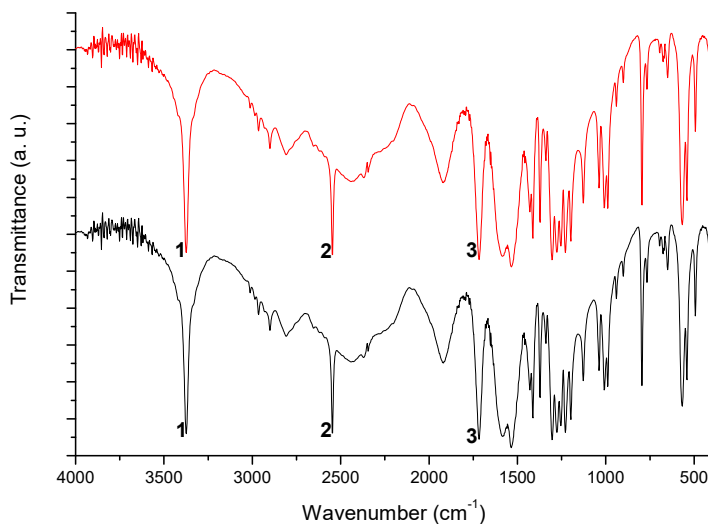


Figure 6.4 - Infrared spectrum of micronized (red line) and non-micronized (dark line) NAC by SEDS technique. (1) NH the 3390 cm^{-1} . (2) SH the 2549 cm^{-1} . (3) C = O the 1720 cm^{-1} .

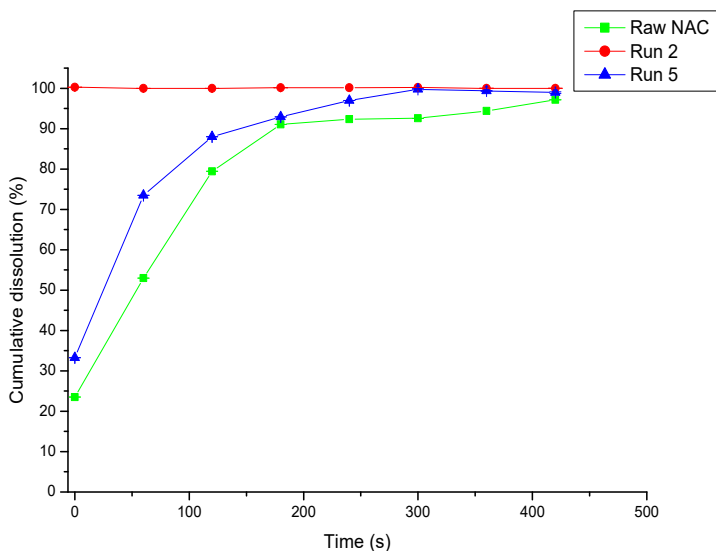


Figure 6.5 - Dissolution profiles of NAC in distilled water.

Cheng et al. (2016) in the study of etoposide micronization with supercritical CO_2 using the SEDS technique found that the best result increased by approximately 4 times the dissolution rate. Micronized drugs provided a dissolution of 90% and raw drugs 24% at 180 min. Hiendrawan et al. (2014) in the micronization process of fenofibrate with supercritical CO_2 using RESS technique, also noted an increase in drug dissolution, obtaining 80% dissolution of the processed compound and 50% of dissolution for the raw compound at the time of 90 min.

6.3.4 Powder X-ray diffraction (PXRD)

Samples of micronized and non-micronized NAC were characterized by Powder X-Ray Diffraction (PXRD) to investigate the reflection diffraction of samples, with results presented in Fig. 6.6.

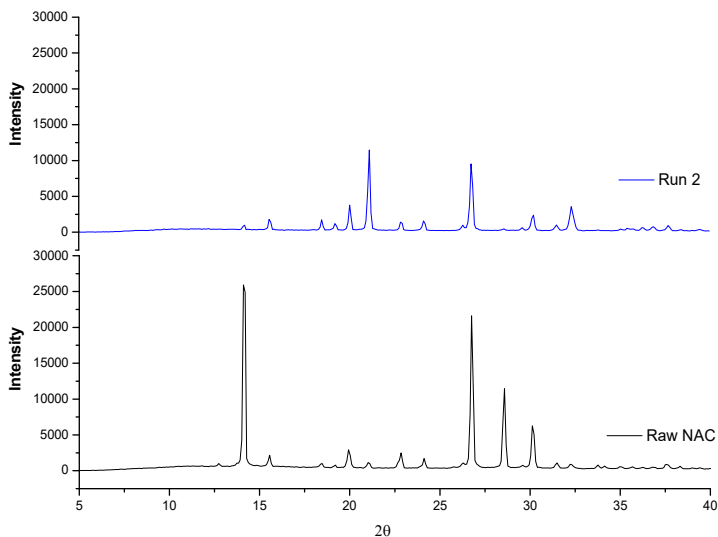


Figure 6.6 - Powder X-Ray Diffraction (PXRD) of micronized and non-micronized NAC particles.

The XRD patterns of the non-micronized compound presented features reflections of crystallinity of N-acetylcysteine, as observed by Desai et al. (2008), Kumar and Nangai (2013) in 2θ equal to 14.104; 15.5609; 18.4746; 19.9315; 21.0242; 22.8453; 24.1201; 26.7608 e 30.1298.

It can be observed from Fig. 6.6 that there were changes in the pattern of peaks presented by the non-micronized and micronized compound. The XRD pattern of the particles of run 2 showed a slight change in the angle of some peaks in comparison with standard sample. The main changes were: disappearance of the peak 12.7381; peak shift 14.104 to 14.195 and reduction of the intensity; peak shift of 19.9315 to 20.0226 and increased intensity; peak shift of 21.0242 to 21.1153 and increased intensity; peak shift of 30.1298 to 30.2209 and reduction of the intensity.

Some peaks kept the position, but there was a reduction of the intensity: 22.8453; 26.7608 and 28.5819. These differences in angles (displacements, appearance and / or disappearance of peaks) show that new polymorphic forms of the compound were generated by the SEDS

process (Cheng et al., 2016). Polymorphism is the ability of a substance exhibits so as to exist in the solid state in two or more different crystal structures (Araujo et al., 2012). Different polymorphic forms of a same compound can present significant differences in dissolution rate, processability and physical and chemical stability (Aguiar et al., 1999). Therefore, the existence of new polymorphic forms of the compound, generated by the SEDS technique, can be related to the increased dissolution rate of micronized compound.

6.3.5. Residual solvent analysis

The results of GC coupled to mass spectrometry (GC-MS) identified residual dichloromethane in samples of micronized NAC. With the aid of the gas chromatography - flame ionization detector (GC-FID), 25.45 ppm of dichloromethane were quantified in the particles of micronized NAC samples. The value of residual solvent is within the limits established by United States Pharmacopoeia (400 ppm), European Pharmacopoeia (600 ppm), Pharmacopoeia of the people's Republic of China (600 ppm) and The National Agency for Sanitary Vigilance - ANVISA Brazil (600 ppm) (Elvassore et al., 2001) and also below the value established by the International Conference on Harmonization (ICH), document Q3C(R5) from 2011, the regulatory authority in terms of drugs and pharmaceutical industries in United States, Europe and Japan, which determinates the maximum DCM concentration for human consumption, 600 ppm.

Several studies using SEDS technique, dealing with the precipitation of solids using dichloromethane as solvent and CO₂ as antisolvent, adopt drying times between 30 to 120 min, which allows a residual amount of dichloromethane in particles in the range of 38 - 58 ppm (Hong et al., 2009; Kang et al., 2008). The present study employed 50 min of drying time, resulting in residual solvent values lower than those reported in the literature for DCM and complete removal of acetone.

The production of particles with low concentration of residual solvent is important because it ensures a safe product to the consumer (Herberger et al., 2003) and within the standards set for human consumption. Therefore, SEDS technique enables production of microparticles presenting low concentration of DCM (25.45 ppm) in the final product, within the limits required by regulatory agencies.

6.4. Conclusions

The particle size reduction led to increased contact surface and consequently increased solubility in aqueous solution for the active compound, which provided a 100 % dissolution at 0 s time for run 2 (smaller particle size) and ~ 100 % dissolution for run 5 (larger particle size) at the time of 300 s, while the raw component presented 97.16 % at 420 s time dissolution. Results obtained in this study are relevant, because it was possible to reduce about 248 times of average particle size of NAC compound - 2.86 μm , besides providing a high dissolution rate. The best result was obtained at the lowest temperature and pressure (35 °C and 8 MPa, respectively), which makes the data even more relevant, especially if the benefits are considered to reduce process costs and the possibility of applying this technique to thermosensitive compounds, since FTIR accused no degradation. By XRD pattern it can be concluded that micronized compound has a different crystalline structure over the non-micronized compound that confers new properties to the compound, as increase the rate of dissolution. Finally, the micronized compound besides presenting fast dissolution rate, it presented small residual concentrations of dichloromethane. The values obtained are well below those determined by regulatory authorities for pharmaceutical compounds, therefore the consumption of the micronized compound by SEDS should not present risks to human health.

Acknowledgments

The authors thank CNPq (Project 478520/2013-1) and CAPES for financial support and scholarships and also LCME-UFSC for the SEM analysis.

6.5. REFERENCES

- Aguiar, G.P.S., Boschetto, D.L., Chaves, L.M.P.C., Arcari, B.D., Piato, A.L., Oliveira, J.V., Lanza, M. Trans-resveratrol micronization by SEDS technique. *Ind. Crops Prod.* 89, 350–355 (2016).
- Aguiar, M.R.M.P. de, Gemal, A.L., Gil, S., Silva, R.A. da, Characterization of polymorphism in pharmaceuticals by solid state nuclear magnetic resonance, *Quím. Nova.* 22, 553–564 (1999).

- Andrade, K.Q., Moura, F.A., dos Santos, J.M., de Araújo, O.R.P., de Farias Santos, J.C., Goulart, M.O.F., Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Therapeutic Possibilities of N-Acetylcysteine. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 30269–30308 (2015).
- Araujo, G.L.B. de, Pitaluga JR, A., Antonio, S.G., Santos, C. de O.P., Matos, J. do R. Polimorfismo na produção de medicamentos, *Rev. Ciênc. Farm. Básica E Apl.* 33, 27–36 (2012).
- Berk, M., Dean, O.M., Cotton, S.M., Jeavons, S., Tanious, M., Kohlmann, K., Hewitt, K., Moss, K., Allwang, C., Schapkaitz, I., Robbins, J., Cobb, H., Ng, F., Dodd, S., Bush, A.I., Malhi, G.S., The efficacy of adjunctive N-acetylcysteine in major depressive disorder: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J. Clin. Psychiatry* 75, 628–636 (2014).
- Berk, M., Malhi, G.S., Gray, L.J., Dean, O.M., The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 167–177 (2013).
- Boeckx, B., Ramaekers, R., Maes, G., A theoretical and matrix-isolation FT-IR investigation of the conformational landscape of N-acetylcysteine. *J. Mol. Spectrosc.* 261, 73–81 (2010).
- Boschetto, D.L., Dalmolin, I., de Cesaro, A.M., Rigo, A.A., Ferreira, S.R.S., Meireles, M.A.A., Batista, E.A.C., Oliveira, J.V., Phase behavior and process parameters effect on grape seed extract encapsulation by SEDS technique. *Ind. Crops Prod.* 50, 352–360 (2013).
- Cardoso, M.A.T., Cabral, J.M.S., Palavra, A.M.F., Geraldés, V., CFD analysis of supercritical antisolvent (SAS) micronization of minocycline hydrochloride. *J. Supercrit. Fluids* 47, 247–258 (2008).
- Cazzola, M., Calzetta, L., Page, C., Jardim, J., Chuchalin, A.G., Rogliani, P., Matera, M.G., Influence of N-acetylcysteine on chronic bronchitis or COPD exacerbations: a meta-analysis. *Eur. Respir. Rev. Off. J. Eur. Respir. Soc.* 24, 451–461 (2015).

- Chau, C.-F., Wang, Y.-T., Wen, Y.-L., Different micronization methods significantly improve the functionality of carrot insoluble fibre. *Food Chem.* 100, 1402–1408 (2007).
- Chen, A.-Z., Pu, X.-M., Kang, Y.-Q., Liao, L., Yao, Y.-D., Yin, G.-F., Study of poly(L-lactide) microparticles based on supercritical CO₂. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18, 2339–2345 (2007).
- Cheng, Y., Xu, W., Chen, Z., Wang, Z., Huang, D., Micronization of etoposide using solution-enhanced dispersion by supercritical CO₂. *J. Supercrit. Fluids* 115, 10-16 (2016).
- Deepmala, null, Slattery, J., Kumar, N., Delhey, L., Berk, M., Dean, O., Spielholz, C., Frye, R., Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: A systematic review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 55, 294–321 (2015).
- Desai, K.G.H., Mallery, S.R., Schwendeman, S.P. Formulation and Characterization of Injectable Poly(dl-lactide-co-glycolide) Implants Loaded with N-Acetylcysteine, a MMP Inhibitor. *Pharm. Res.* 25, 586–597 (2008).
- Durán, N., Durán, M., Tasic, L., Marcato, P.D., Nanocrystal technology in pharmaceuticals. *Quím. Nova* 33, 151–158 (2010).
- Elbini Dhouib, I., Jallouli, M., Annabi, A., Gharbi, N., Elfazaa, S., Lasram, M.M., A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. *Life Sci.* 151, 359–363 (2016).
- Elvassore, N., Bertucco, A., Caliceti, P., Production of insulin-loaded poly(ethylene glycol)/poly(l-lactide) (PEG/PLA) nanoparticles by gas antisolvent techniques. *J. Pharm. Sci.* 90, 1628–1636 (2001).
- Franceschi, E., De Cesaro, A.M., Feiten, M., Ferreira, S.R.S., Dariva, C., Kunita, M.H., Rubira, A.F., Muniz, E.C., Corazza, M.L., Oliveira, J.V., Precipitation of β -carotene and PHBV and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO₂. *J. Supercrit. Fluids* 47, 259–269 (2008).
- Gudat, A.E.; Firor, R.L.; Bober, U., Better precision, sensitivity, and higher sample throughput for the analysis of residual solvents in

- pharmaceuticals. Agilent Application Note, Publication Number 5989-6023EN, (2007).
- Herberger, J., Murphy, K., Munyakazi, L., Cordia, J., Westhaus, E., Carbon dioxide extraction of residual solvents in poly(lactide-co-glycolide) microparticles. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 90, 181–195, (2003).
- He, W.Z., Suo, Q.L., Jiang, Z.H., A, S., Hong, H.L. Precipitation of ephedrine by SEDS process using a specially designed prefilming atomizer. *J. Supercrit. Fluids* 31, 101–110, (2004).
- Hiendrawan, S., Veriansyah, B., Tjandrawinata, R.R., Micronization of fenofibrate by rapid expansion of supercritical solution. *J. Ind. Eng. Chem.* 20, 54–60 (2014).
- Hong, H.L., Suo, Q.L., Han, L.M., Li, C.P., Study on Precipitation of Astaxanthin in Supercritical Fluid. *Powder Technol.* 191, 294–298 (2009).
- Kang, Y., Yin, G., Ouyang, P., Huang, Z., Yao, Y., Liao, X., Chen, A., Pu, X., Preparation of PLLA/PLGA microparticles using solution enhanced dispersion by supercritical fluids (SEDS). *J. Colloid Interface Sci.* 322, 87–94 (2008).
- Kelly, G.S., Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.* 3, 114–127 (1998).
- Kumar, S.S., Nangia, A. A new conformational polymorph of N-acetyl-L-cysteine. The role of S–H···O and C–H···O interactions. *CrystEngComm* 15, 6498–6505 (2013).
- Machado Jr, F.R.S., Reis, D.F., Boschetto, D.L., Burkert, J.F.M., Ferreira, S.R.S., Oliveira, J.V., Burkert, C.A.V., Encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in PHBV by means of SEDS technique using supercritical CO₂. *Ind. Crops Prod.* 54, 17–21 (2014).
- Priamo, W.L., de Cezaro, A.M., Ferreira, S.R.S., Oliveira, J.V., Precipitation and encapsulation of β -carotene in PHBV using

- carbon dioxide as anti-solvent. *J. Supercrit. Fluids* 54, 103–109 (2010).
- Raggi, M.A., Cavrini, V., Di Pietra, A.M., Colorimetric determination of acetylcysteine, penicillamine, and mercaptopropionylglycine in pharmaceutical dosage forms. *J. Pharm. Sci.* 71, 1384–1386 (1982).
- Rosenblat, J.D., Kakar, R., Berk, M., Kessing, L.V., Vinberg, M., Baune, B.T., Mansur, R.B., Brietzke, E., Goldstein, B.I., McIntyre, R.S., Anti-inflammatory agents in the treatment of bipolar depression: a systematic review and meta-analysis. *Bipolar Disord.* 18, 89–101 (2016).
- Silverstein, R.M., *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. LTC (2006).
- Wubbolts, F.E., Bruinsma, O.S.L., van Rosmalen, G.M., Dry-spraying of ascorbic acid or acetaminophen solutions with supercritical carbon dioxide. *J. Cryst. Growth* 198–199, Part 1, 767–772 (1999).

CAPÍTULO 7

RESULTADOS IV

Micronization of N-acetylcysteine by supercritical fluid: evaluation of *in vitro* and *in vivo* biological activity

Gean Pablo S. Aguiar^a, Matheus Marcon^b, Ricieri Mocelin^b, Ana P. Herrmann^c, Lorenzo M. P. C. Chaves^a, J. Vladimir Oliveira^a, Marcelo Lanza^a, Angelo L. Piato^{b,*}

Submetido para publicação em 14 de fevereiro de 2017 (Pharmaceutical Research)

^aDepartment of Chemical Engineering and Food Engineering, UFSC, Florianópolis, SC, Brazil.

^bDepartment of Pharmacology, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

^cGroup of Biological and Clinical Studies in Human Pathologies, UFFS, Chapecó, SC, Brazil.

* Angelo L Piato, Ph.D.

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica, ICBS,
Universidade Federal do

Rio Grande do Sul

Av. Sarmento Leite 500/305, Porto Alegre, RS, Brazil

90050-170

Phone/Fax: +55 51 33083121

E-mail address: angelopiato@ufrgs.br

ABSTRACT

Purpose

This work aims to study the micronization process of NAC by the anti-solvent SEDS technique (Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids), and to evaluate both *in vitro* and *in vivo* improvements in the properties of this compound, mainly regarding bioavailability.

Methods

The micronization process was performed using of SEDS technique through a 2^2 CCD with 3 central points as to assess the influence of active compound concentration and pressure on the particle size produced. Were evaluated *in vitro* antioxidant activity by the DPPH method and *in vivo* test in zebrafish evaluating the anxiolytic-like effects of micronized and non-micronized NAC.

Results

It is shown that the micronization process led to a 245-fold reduction in particle size, from an average original NAC particle size of 710 μm to the smallest particle size obtained 2.9 μm . *In vitro* tests showed an increase in dissolution rate and also in antioxidant activity. In the *in vivo* tests were observed that the micronization process decreased the minimum effective concentration of NAC that induced anxiolytic-like effects in zebrafish.

Conclusions

Micronization may thus increase bioavailability and potentiate the therapeutic effect of drugs, opening new horizons in the area of supercritical fluid micronization in the pharmaceutical industry.

Keywords: NAC; SEDS; Zebrafish; Supercritical CO₂, Mental disorders.

Abbreviations

BMZ	Bromazepam
CCD	Central Composite Design
CO ₂	Carbon dioxide
D _p	Particle size
FLU	Fluoxetine
GC	Gas chromatography
GC-FID	Gas chromatography - flame ionization detector
GC-MS	Gas chromatography - mass spectrometer
NAC	N-acetylcysteine
PXRD	Powder X-ray diffraction
SEDS	Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids
XRD	X-ray diffraction

7.1 INTRODUCTION

The bioavailability of drugs is influenced by several factors such as dissolution rate, particle size, surface area, drug polymorphism, salt formation, permeability, lipophilicity and pKa. In the case of insoluble drugs, the bioavailability can be improved by micronization the raw material, which promotes an increase of its surface area [1]. Supercritical fluid micronization technology has gained increasing attention in the chemical and pharmaceutical industry because of its versatility, like there are numerous techniques for micronizing compounds using supercritical CO₂, which may have the role of solute, solvent and anti-solvent. The use of supercritical fluid in the pharmaceutical area has grown significantly in recent years driven by applications in the generation of products for use in food, cosmetic, therapeutic and analytical use [2].

The uniqueness of the supercritical anti-solvent mechanism is that it induces polymorphism in substances, which is not reproduced by other techniques. This is relevant because the importance of polymorphs for the pharmaceutical industry is well known, where it constitutes a tool to leverage and gain market share, since the polymorphic forms have the potential to transform physicochemical characteristics of the powders [3,4]. The polymorphism has impact on the melting point, bulk density, chemical reactivity, apparent solubility and dissolution rate. In other words, the polymorphism may affect the stability, manipulation and bioavailability of the drug [3–5].

N-acetylcysteine (NAC), a precursor of glutathione, has an original mechanism of action composed of the modulation of antioxidant, glutamatergic, inflammatory and neurotrophic pathways [6–8]. NAC is marketed for the treatment of paracetamol poisoning, lung disease, and in recent years an increasing number of clinical data reveals the benefits of NAC in the treatment of psychiatric conditions [9]. Favorable evidence of NAC performance has been reported for schizophrenia, autism, Alzheimer's disease, drug-induced neuropathy, bipolar disorder, depression, drug dependence, obsessive compulsive disorder [10–17]. However, NAC presents low bioavailability, which is one of the main limitations to maximize its therapeutic effects [18].

Considering the paucity of studies in the field of supercritical fluid micronization that evaluate *in vivo* besides *in vitro* properties, and the increasingly emerging need for *in vivo* assays of biological activity that can be modified and improved, the present work aims to innovate by comparing non-micronized versus micronized compounds by the

SEDS technique, evaluating possible bioavailability improvements of the compound using zebrafish as a biological model.

7.2 MATERIALS AND METHODS

7.2.1 Materials

N-acetylcysteine (NAC 99.2%) was purchased from Sigma-Aldrich. Dichloromethane (DCM 99.5%), acetone (99.5%) were purchased from Vetec (Sigma-Aldrich), carbon dioxide (99.9% in liquid phase) was provided by White Martins S.A., Bromazepan (BMZ, Lexotan®) was acquired from Roche (Rio de Janeiro, Brazil) and fluoxetine (FLU, Daforin®) from Sigma Pharma (São Paulo, Brazil).

7.2.2 Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids Technique (SEDS)

A schematic diagram of the experimental apparatus is presented in Fig. 7.1. The SEDS experimental apparatus and procedure used for the micronization of the pure compound, N-acetylcysteine, employing supercritical CO₂ as anti-solvents is described in detail by [19] and [20].

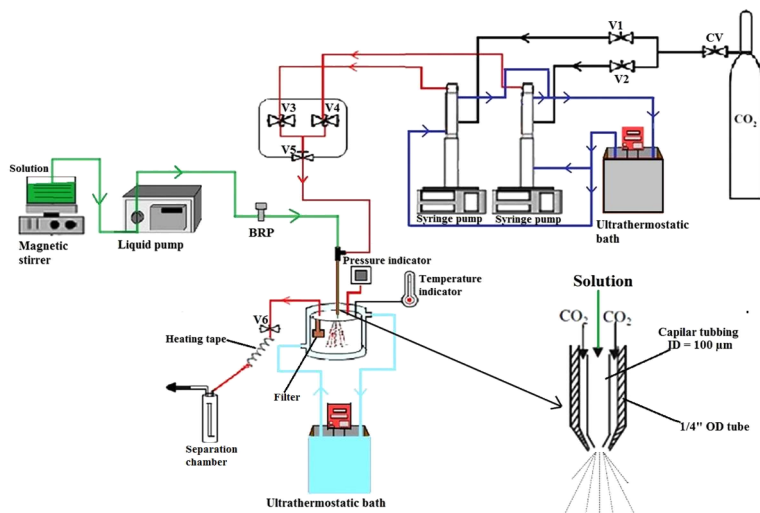


Figure 7.1 - Schematic diagram of the experimental apparatus using the SEDS technique. CV – Check – Valve; V1, V2, V3 and V4 – Ball valve; V5 and V6 – Needle valve; BRP – Back Pressure Regulator.

7.2.3 Experimental conditions for precipitation

For the micronization of N-acetylcysteine the following process parameters were adopted based on previous works of the group: solute concentration of 20, 30 and 40 mg·mL⁻¹, at 35 °C, solution flow rate of 1 mL·min⁻¹, anti-solvent flow rate of 20 mL·min⁻¹ and operating pressure of 8, 11,5 and 15 MPa [21,22]. In this work, solute solubilization was improved by a mixture of 40% (v/v) acetone + 60% (v/v) dichloromethane according to [21]. A 2² Central Composite Design (CCD) with triplicate runs at the central points (Table 7.1) was employed to evaluate the influence of process variables on the morphology, size and size distribution of particles produced.

Table 7.1 - Variables studied in the micronization process of the samples.

Variable	Level		
	-1	0	+1
Concentration (mg·mL ⁻¹)	20	30	40
Pressure (MPa)	8	11,5	15

7.2.4 Morphology and determination of particle size

The morphology of the N-acetylcysteine samples was determined using scanning electron microscopy (SEM) (JEOL JSM-6390LV, United States) to determine the shape and particle morphology, analyzed under the following conditions: magnification 100 of 5 kV power for runs 2, 3, 4, 5, 6, 7; magnification 1000 of 5 kV power for run 1 and magnification 50 of 5 kV power for NAC raw. The mean particle size was determined using the software Meter Size (version 1.1) [22]. From the calculated average particle size, the standard deviation and the variation coefficient (VC) were used as statistical tools to express the variability of the data.

7.2.5 Dissolution rate analysis

In order to determine the dissolution rate of N-acetylcysteine, a methodology was adapted from [23]. Samples (50 mg) were added to 100 mL distilled water and maintained under constant stirring (100 rpm) at 37 °C. At selected periods of 0, 60, 120, 180, 240, 300, 360 and 420 seconds, 1.5 mL was collected from the solution and immediately replenished with pure solvent to maintain the original volume. Then, the

samples were filtered using 0.22 μm membranes and assayed for N-acetylcysteine concentration employing the UV-visible Spectrophotometric procedure described by [24]. All tests being performed in triplicate.

7.2.6 DPPH radical scavenging assay

Free radical scavenging ability of the NAC sample was tested by DPPH radical scavenging assay according to [25]. After preparing the sample solution and DPPH ($0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) the reaction mixture was vortex thoroughly and left in the dark for 30 min at 37 °C. The absorbance of the mixture was measured spectrophotometrically at 517 nm. Percentage DPPH radical scavenging activity was calculated by the following equation (Eq. 1):

$$\text{DPPH radical scavenging activity} = 100 - \frac{[A_0 - A_1]}{A_c} \cdot 100 \quad (1)$$

where A_0 is the sample absorbance, A_1 is the absorbance of the standard and A_c is the absorbance of the control. The percentage of inhibition was plotted against concentration, and from the graph IC_{50} was calculated according from [26].

7.2.7 Powder X-ray diffraction (PXRD)

With the purpose of verifying possible modifications in the crystalline structure was realized PXRD. PXRD data was collected from a θ - θ D2 Phaser (Bruker) diffractometer equipped with a $\text{Cu K}\alpha$ source ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) operated at 30 kV and 10 mA, using Scintillation counter 1-dimensional LYNXEYE detector. Diffraction data were collected between 5 and 50 2θ degrees and 0.5 s counting time per step.

7.2.8 Thermal analysis

The phase transition (melting point) of micronized and non-micronized NAC was determined using a system of differential scanning calorimetry (DSC) (Jade-DSC, Perkin Elmer). The samples were prepared in aluminum pan (sample weight: 5-10 mg) and DSC measurements were performed by heating at 30 to 150 °C at a rate of 10 °C·min⁻¹ in an inert atmosphere (N₂ flow: 20 mL·min⁻¹).

7.2.9 Identification and quantification of residual solvent

Gas chromatography was used (GC model 5975C Inert MSD brand Agilent Technologies), coupled with mass spectrometer (GC-MS) in headspace vial for the identification of residual solvent in the particles produced. The operation conditions were adapted from the method for [21] with a DB624 - 30 m x 0.45 mm x 2.55 µm column. The quantification of residual solvent was then investigated by gas chromatography - flame ionization detector (GC-FID) using the same operation conditions as in the GC-MS.

7.2.10 Behavioral testing

7.2.10.1 Animals

A total of 165 wild-type short-fin strain adult zebrafish (*Danio rerio*, 4-6 months old, 50:50 male:female ratio) were obtained from the heterogeneous breeding stock of Federal University of Rio Grande do Sul. The fish were kept in 40-L aquariums (2.5 fish per liter), filled with non-chlorinated filtered water, with a light/dark cycle of 14/10 hours (lights on at 07:00 AM), for at least 2 weeks before experiments. Tank water was partially changed once per week and maintained under appropriate conditions (temperature 26 ± 1 °C; pH 7.0 ± 0.3; dissolved oxygen at 7.0 ± 0.4 mg·L⁻¹; total ammonia at < 0.01 mg·L⁻¹; total hardness at 5.8 mg·L⁻¹ and alkalinity at 22 mg·L⁻¹ CaCO₃). The fish were fed twice a day with a commercial flake fish food (Alcon BASIC®, Alcon, Brazil). All protocols were approved by the Ethics Committee of Federal University of Rio Grande do Sul (#30914).

7.2.10.2 Experimental design

The experimental apparatus is shown in Fig. 7.2, as described by [15]. Four fish at a time were placed for 10 min in 400 mL beakers with the following solutions (treatment groups): control (water), fluoxetine (FLU, $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), bromazepam (BMZ, $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), NAC ($0.01 \text{ e } 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and micronized NAC – Run 1 – ($0.01, 0.1 \text{ e } 1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). The drugs fluoxetine and bromazepam were used as positive controls as they are widely prescribed for anxiety disorders. New solutions were prepared for each group of four fish. Immediately after treatment, different sets of animals were transferred to the experimental apparatus and video recorded for later analysis by the software ANY-Maze (Stoelting co., EUA).

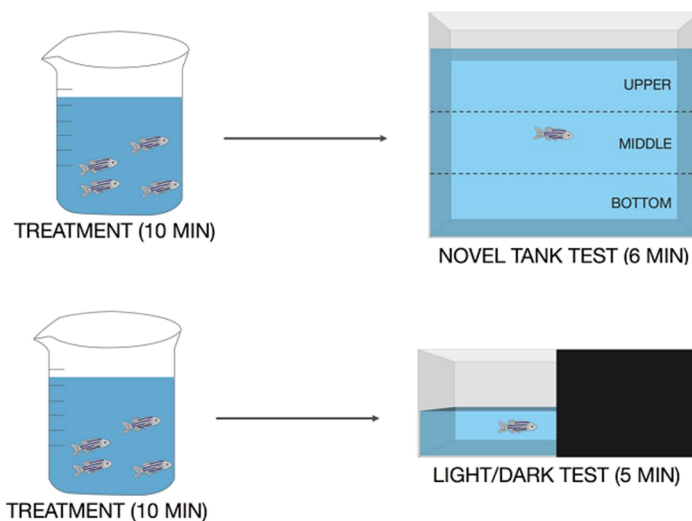


Figure 7.2 - Graphical representation of the experimental protocol.

7.2.10.3 Novel tank

The novel tank test consists of a 2.7 L ($24 \times 8 \times 20 \text{ cm}$) tank filled with water up to 15 cm [27–30]. The experimental apparatus was divided into 3 equal horizontal zones: bottom, middle and upper (Fig. 7.2). The following parameters were evaluated for 6 min: total distance moved and time spent in the upper zone of the tank. The vertical

location in a new environment is considered an anxiety parameter in zebrafish, analogous to the behavior that rodents exhibit in an open field [31].

7.2.10.4 Light/dark

The light/dark test was performed according to [15]. The experimental apparatus consists of a glass tank (18×9×7 cm) divided by a guillotine sliding partition (9×7 cm) into two equally sized white and dark compartments (Fig. 7.2). The water level of the tank was 3 cm and the partition was lifted 1 cm above the bottom of the tank to allow zebrafish to swim freely between the two sides of the tank. The animals were placed individually in the clear zone immediately after treatment and the time spent in the light compartment and the number of crossings between compartments were recorded for 5 min.

7.2.10.5 Statistics

The data are expressed as mean + standard error of the mean (S.E.M.). The normal distribution of data was confirmed by the Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, and the results were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. The differences were considered significant at $p < 0.05$.

7.3 RESULTS AND DISCUSSION

Results from the 2^2 CCD design are shown in Table 7.2, which informs the values of mean particle size (D_p), standard deviation (σ), as well as the variation coefficient (CV) of the experimental data.

Table 7. 2 - Results of 2² CCD experimental design of NAC micronization.

Run	Concentration (mg·mL ⁻¹)	Pressure (MPa)	Dp (µm)	CV
1	20 (-1)	8 (-1)	2.9±1.03	0.35
2	40 (+1)	8 (-1)	129.7±42.33	0.33
3	20 (-1)	15 (+1)	294.9±100.27	0.34
4	40 (+1)	15 (+1)	301.9±111.87	0.37
5	30 (0)	11.5 (0)	207.5±60.87	0.29
6	30 (0)	11.5 (0)	203.1±51.20	0.25
7	30 (0)	11.5 (0)	202.2±79.18	0.39

* Non-micronized NAC has an average size of 710 µm.

Non-micronized NAC has an average size of 710 µm and the smallest particle size obtained was 2.9 µm, which means a reduction of 245 times. The smallest particle size was obtained in run 1 while the largest in run 4, being the difference of such assays the use of lower concentration of NAC and lower operating pressure in run 1. This result is very interesting from an industrial point of view because smaller particles were obtained at the lowest operating pressure, which means lower CAPEX (capital expenditure) and OPEX (operational expenditure) investment investment [21].

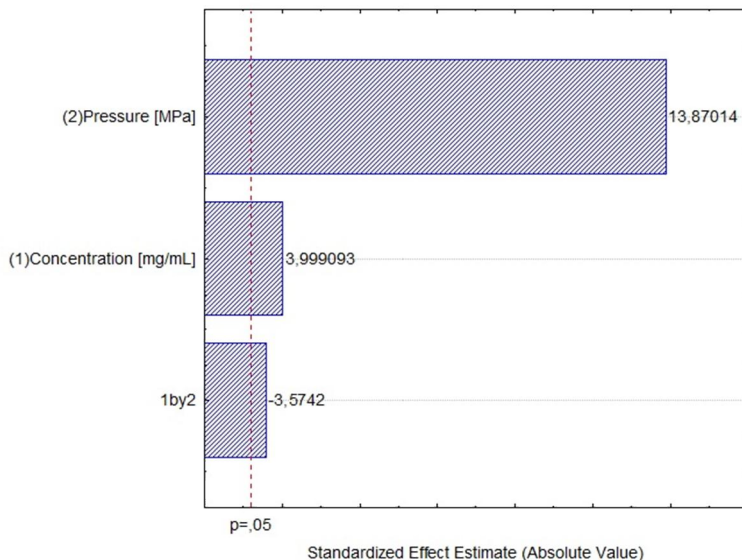


Figure 7.3 - Pareto Chart showing the effect of micronization process parameters.

From the Pareto graph (Fig. 7.3), all variables influenced the mean micronized particle size, with pressure being the most influential variable in the NAC micronization process. The pressure features positive effect, thus increased pressure causes an increase in the average particle size, something undesired; this can be observed in runs 1 and 2 compared with runs 3 and 4 where the average size varied from 2.95 to 301.97 μm . Therefore, lower operating pressure is better suited for obtaining smaller particles. The micronization process of *trans*-resveratrol using supercritical fluid technique SEDS was also investigated by [21] who also obtained better results using lower operating pressure and temperature (8 MPa e 35 °C).

The effect of pressure can be explained in terms of solubility, since the supersaturation is defined by the ratio of the concentration of the solute in the solvent + anti-solvent mixture and the concentration of saturation of the solute into the mixture. According to [32], when the solvent + antisolvent mixture is in a single phase, an increase in pressure above the critical point of the blend increases the solubility of the solute in the blend by decreasing supersaturation. Once the supersaturation decreases, the nucleation rate decreases, leading to increased size of the precipitated particles [19].

The concentration was the second most influential variable in the micronization process and as the pressure, by increasing the concentration of NAC there is an increase in particle size. This can be clearly seen in runs 1 and 2, since these tests are similar and the difference among them is the concentration of the solution. In run 1 ($20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) an average size of $2.95 \mu\text{m}$ was obtained and in run 2 ($40 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) the average particle size was $129.68 \mu\text{m}$. According to [19] the fact that the concentration affects positively, i.e. increasing particle size, can be explained in terms that an increase in concentration implies increased shear forces hindering the diffusion of CO_2 into the droplets formed on the dispersion solution. Thus, the evaporation of the organic solvent from the droplets by the action of CO_2 is more affected causing a decrease in the mass transfer rate, and according to the kinetics of precipitation, generating larger particles.

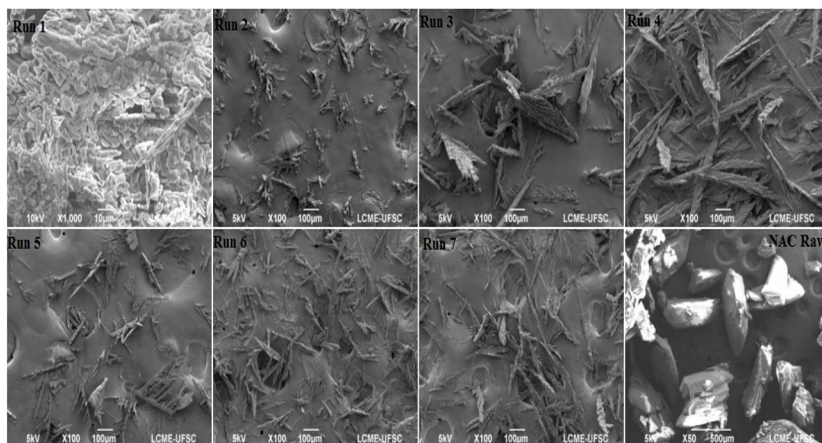


Figure 7. 4 - Scanning electron microscope (SEM) of the produced particles.

From Fig. 7.4 it can be observed that in all the micrographies of the particles only a magnification of 100 times was necessary to identify morphology except for run 1, where the smaller average particle size was obtained and hence a magnification of 1000 times was required.

The particles in general presented prismatic morphology in different sizes and formats that can confer different crystalline structures and consequently modifications in the properties of NAC. Another important fact is that, verified through the analysis of residual solvent

using CG-MS and CG-FID, the particles produced are organic solvent-free, being within the limits established by regulatory agencies for human consumption.

The model that describes the behavior of particle size (D_p) of the obtained NAC microparticles is represented by Eq. (2) shown below. Table 7.3 shows the variance analysis (ANOVA) of the average particle size values.

$$D_p = 204.2933 + 33.46C - 21.9283C^2 + 116.05P - 29.905C.P \quad (2)$$

Data: C = Concentration; P = pressure.

Table 7.3 - Variance analysis for the average particle size of NAC.

Variation Source	SQ	DF	MQ	F _{cal}	F _{tab}
Regression	62750.25	4	15687.562	1993.337	19.250
Error	15.740	2	7.87	r²=0.9998	
Total	62765.990	6			

SQ = quadratic sum; DF = degrees of freedom; MQ = quadratic mean; F = Fisher test.

According to [33,34], taking into account that a regression is not only statistically significant but also useful for predictive purposes, the value of $F_{\text{calculated}}$ must be at least 4 to 5 times higher than $F_{\text{tabulated}}$ value, therefore, it can be affirmed that there is rejection of the null hypothesis, concluding that the variation of the parameters presents interference in the mean diameter response (D_p). Therefore, the results showed a significant predictive model, as it had good fit ($r^2 = 0.987$) and the $F_{\text{calculated}}$ was 103.55 times greater than the value of $F_{\text{tabulated}}$ from Fisher's distribution table, used Alpha = 0.05 and $DF_{\text{Regression}} = 4$ and $DF_{\text{Residue}} = 2$ [34].

The system model equation (Eq. 2) was built from the regression coefficients of significant variables in the process, in case the concentration, pressure and interaction between pressure x concentration. The equation was constructed from the coded variables (-1, 0, +1). According to results obtained by Anova and Fisher, the equation is significant as a predictive model. Therefore, when using the encoded variables, it is possible to predict values of D_p for

microparticles of NAC (Table 7.4). By the results obtained in the model Dp (Table 7.4), it is verified that the generated system equation predicts data of particle size very close to the real values.

Table 7. 4 - Results of 2² CCD experimental design real and predicted of NAC micronization.

Run	Conc. (mg·mL⁻¹)	Pressure (MPa)	Dp real (µm)	Dp model (µm)	Setting Error	Relative Error (%)
1	20 (-1)	8 (-1)	2.9	2.95	-0.05	-1.72
2	40 (+1)	8 (-1)	129.7	129.68	0.02	0.02
3	20 (-1)	15 (+1)	294.9	294.86	0.04	0.01
4	40 (+1)	15 (+1)	301.9	301.97	-0.07	-0.02
5	30 (0)	11.5 (0)	207.5	204.29	3.21	1.55
6	30 (0)	11.5 (0)	203.1	204.29	-1.19	-0.59
7	30 (0)	11.5 (0)	202.2	204.29	-2.09	-1.03

As the model is significant and predictive it is possible to generate the response surfaces to better visualize the regions having the lowest mean particle size values.

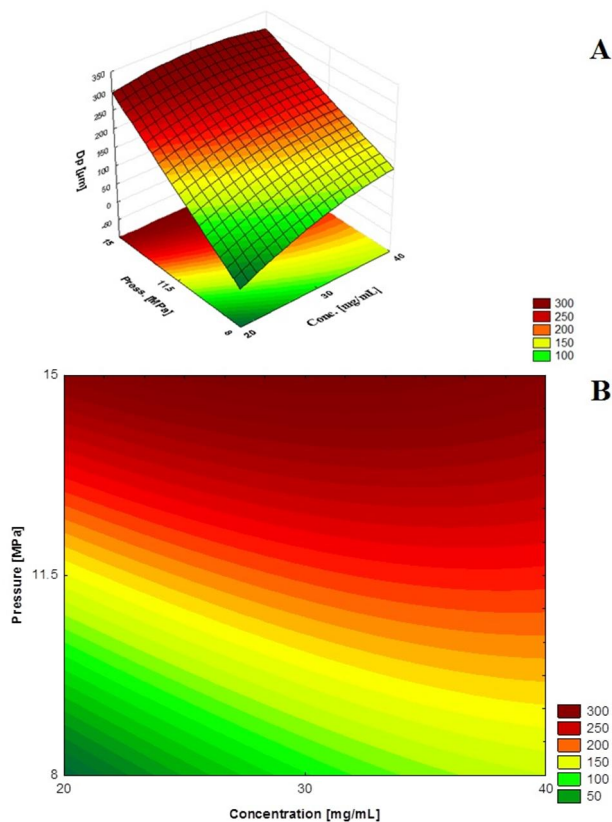


Figure 7.5 - (a) Response surfaces of pressure \times concentration. (b) Control curve of pressure \times concentration.

From the response surface and contour curves for D_p with variation of Concentration versus Pressure (Fig. 7.5), it is verified that the best regions to obtain particles with smaller size are in concentration $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 8 MPa pressure. The region with the highest D_p values is 15 MPa and concentration in any region of 20 to $40 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. These data clearly demonstrate what was obtained in the Pareto graph (Fig. 7.3), where the pressure influences the process more than the concentration.

7.3.1 Analysis of dissolution rate

Results of dissolution rate of NAC samples in water are presented in Fig. 7.6.

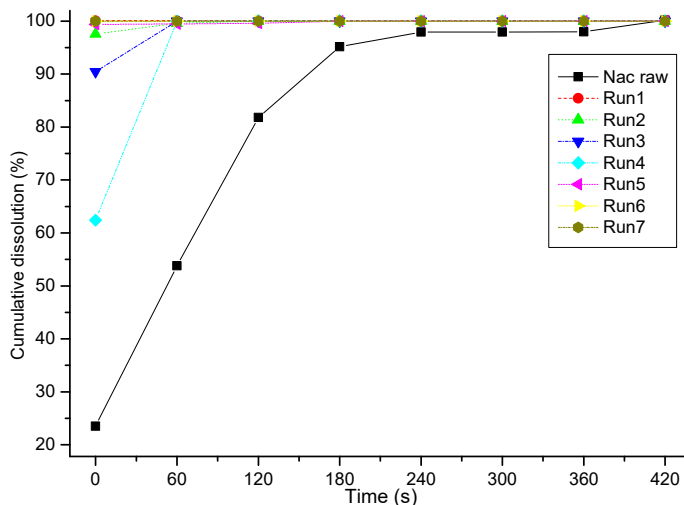


Figure 7.6 - Dissolution rate of micronized and non-micronized NAC.

From the cumulative dilution graph it can be seen that all runs showed a considerable increase in the dissolution rate of the compound after micronization compared to the non-micronized compound. The modification of the dissolution rate can already be clearly observed at the initial point, since all assays, except for runs 3 and 4, reaching dissolution of about 100 % larger than that of the non-micronized compound which is about 25% at the initial point. It should also be noted that runs 3 and 4 are the ones with the highest average particle size in the Central Composite Design (CCD), which may lead to lower dissolution rates, since the particle size influences the dissolution rate of the compounds. The non-micronized N-acetylcysteine only reached a complete dissolution in approximately 420 s, whereas the micronized samples reached 100 % dissolution at time zero, except for runs 3 and 4 (the largest particle size) where 100 % dissolution was reached at 60 s.

[35] in the micronization process of fenofibrate with supercritical CO₂ using RESS technique reported an increase in drug dissolution, obtaining 80% dissolution of the processed compound

versus 50 % of dissolution for the raw compound. [23] in the study of etoposide micronization with supercritical CO₂ using SEDS technique found that the best result increased by approximately 4 times the dissolution rate. In this way, micronization processes may lead to increased dissolution of bioactive compounds that can provide new applications.

7.3.2 DPPH radical scavenging assay

Table 7.5 shows the EC₅₀ values of non-micronized and micronized NAC.

Table 7.5 - EC₅₀ of NAC micronized and non-micronized.

	EC ₅₀ (µg·mL ⁻¹)
Raw	10.83±0.40 ^a
Run 1	8.89±0.06 ^b
Run 4	11.18±0.42 ^a

*Measurements followed by the same letter does not differ statistically (p > 0.05), One-way ANOVA followed by Tukey post hoc test.

The DPPH *radical scavenging assay* analysis showed that run 1 sample presented lower EC₅₀ than the raw sample and run 4, which means an increase in the antioxidant activity, because a reduction in EC₅₀ means greater antioxidant activity. Statistically, run 1 is different from the raw sample and run 4 is equal to the raw sample, which permits to conclude that run 1, due to smaller average particle size than the raw sample and run 4, had a slight increase in the antioxidant activity and consequently reduction of the EC₅₀.

The fact that the present process increases the antioxidant activity in run 1 can be attributed to the reduction of particle size, since [36] verified that after micronization of grape pomace and wheat bran occurred an increase in antioxidant activity. In view of this, [36] concluded that the increase of the contact surface of the particles was responsible for the greater antioxidant activity.

7.3.3 Powder X-ray diffraction (PXRD)

Samples of micronized and non-micronized NAC were characterized by Powder X-Ray Diffraction (PXRD) so as to investigate the reflection diffraction of samples, with results presented in Fig. 7.7.

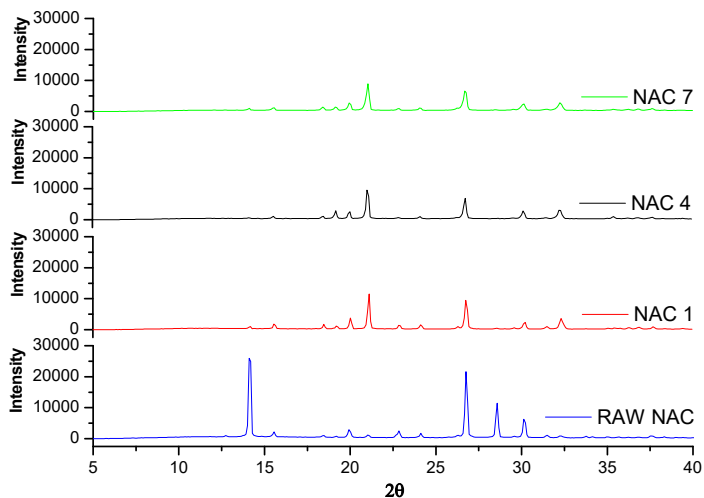


Figure 7.7 - Powder X-Ray Diffraction (PXRD) of micronized and non-micronized NAC particles.

The XRD patterns of the non-micronized compound presented features reflections of crystallinity of N-acetylcysteine, as observed by [37], [38] in 2θ equal to 14.104; 15.5609; 18.4746; 19.9315; 21.0242; 22.8453; 24.1201; 26.7608 and 30.1298.

It can be seen from Fig. 7.7 that there were changes in the pattern of reflection peaks presented by the non-micronized compound in relation to the micronized (runs 1, 4 and 7). The XRD pattern of particles of run 1 showed a slight change in the angle of reflection peaks compared to the raw sample. They are: Disappearance of reflection peak 12.7381, displacement of reflection peak 14.104 to 14.195 with reduction of intensity; Shift of the reflection peak 19.9315 to 20.0226 with increasing intensity; Displacement of reflection peak 21.0242 to 21.1353 and increase in intensity; Shift from reflection peak 30.1298 to 30.2209 with intensity reduction. Other reflection peaks remained at the same angle, but with reduction of intensity, they are: 15.5609; 22.8453; 24.1201; 26.7608 and 28.5819.

The XRD pattern of run 4 particles showed a slight change in the angle of some peaks compared to the raw sample in addition to

demonstrating reduction of the intensity of most reflection peaks. The reflection peaks that had displacement were: 12.7381 to 12.6471 with reduction of intensity; 19.9315 to 20.0226 and reduction of intensity. Other modifications in the XRD pattern were the disappearance of the reflection peak 28.5819, and maintenance of some peaks, but with a reduction in intensity: 14.104; 15.5609; 22.8453; 24.1201; 26.7608; 30.1298. There was also the maintenance of the reflection, but as an increase in peak intensity at angle 21.0242.

The XRD pattern of the particles formed in run 7 showed small changes in the angles of some peaks in comparison to the raw sample. Some peaks shifted and reduced the intensity, being: 12.7380 to 12.6471; 24.1201 to 24.0291 and 26.7608 to 26.6697. Other modifications in the XRD pattern were the disappearance of the reflection peak 28.5819, similar to run 4, besides maintenance of some peaks, but with reduction of intensity, except the peak 21.0242 where it maintained and increased the intensity. The peaks that maintained the position, but have reduced the intensity were: 14.1040; 15.5609; 19.9315; 22.8453 and 30.1298. The XRDs of runs 4 and 7 were very similar in the peaks displacements and in the reflection peaks that reduced the intensity.

When there are modifications of the reflection peaks appearance and disappearance of reflections there is an indicative of formation of polymorphic forms of the solid. The polymorphism in crystalline solids is defined with materials having the same chemical composition, but different network structures and/or conformations different molecules [39]. The vast majority of drugs can crystallize in various polymorphic forms. Each polymorph has a different energy, showing different physicochemical properties, such as melting point, density, solubility, among others [40,41].

Note in Fig. 7.7 that there was for the majority of the reflection peaks a reduction of the intensity which confers lower crystallinity of the compound which makes the same one to be more bioavailable [3]. Amorphous solids have higher energy than crystalline solids and typically, the solubility of an amorphous drug is superior to the corresponding crystalline drug. The solubility differences between amorphous and form crystalline have been described between 1.1 and 1000 times [41–43].

7.3.4 Thermal analysis

Fig. 7.8 shows the results of the differential scanning calorimetry (DSC) for raw sample and run 1 (smallest average particle size).

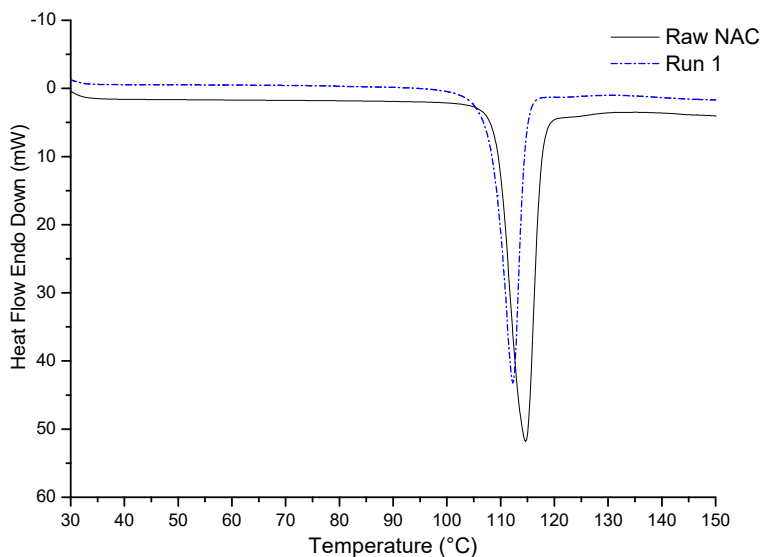


Figure 7.8 - Differential Scanning Calorimetry (DSC) of the micronized and non-micronized sample.

From the DSC chart (Fig. 7.8), there was a shift of the NAC melting point from 114.65 (Raw) to 112.28 °C (Run 1), which indicates a modification of the crystalline structure that is formation of a polymorph, since the polymorphism causes changes in the melting point of the compound, dissolution among other properties [3,5]. In this way the DSC corroborates the findings observed in the XRD, i.e., the micronized compound has a crystal structure different from the non-micronized NAC.

7.3.5 Behavioral testing

Fig. 7.9 A-B shows the effects of fluoxetine (FLU, $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), NAC ($1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and micronized NAC – Run 1 – (0.01 , 0.1 and $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) on the novel tank test in zebrafish. Run 1 was selected because of the smaller particle size and better dissolution rate.

As expected, the positive control FLU significantly increased the time fish spent in the upper zone of the tank (Fig. 7.9A), which is indicative of anxiolytic-like activity. Both micronized (run 1) and non-micronized NAC had no effect for this test. The results for non-micronized NAC are in accordance with a previous study by [15]. None of the treatments altered total distance moved as compared with the control group.

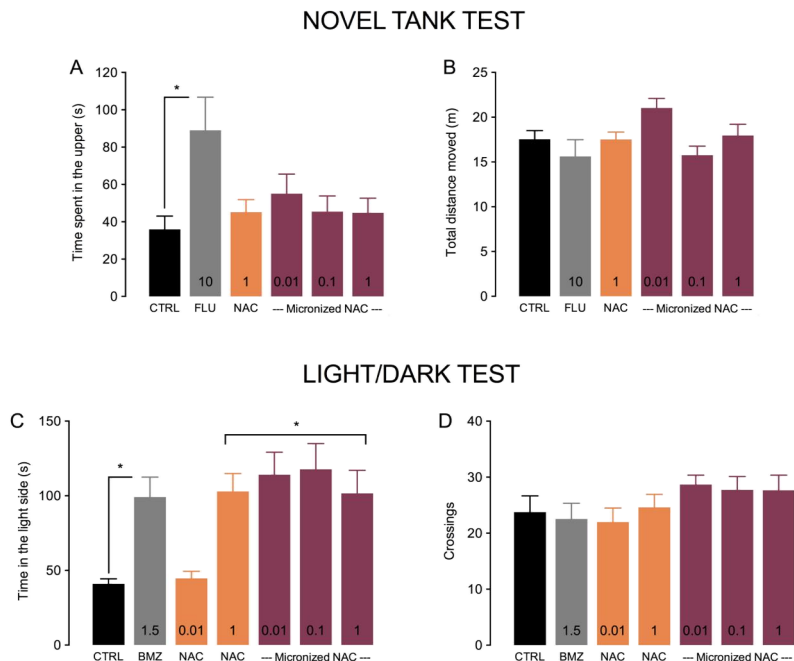


Figure 7.9 - Behavioral effects of micronized and non-micronized NAC in zebrafish. (A) Time spent in the upper zone of the tank and (B) total distance moved in the novel tank test in zebrafish; fluoxetine (FLU) was used as the positive control. (C) Time spent in the lit side of the tank and (D) number of crossings in the light/dark test; bromazepam (BMZ) was used as the positive control. Drug concentrations are indicated inside the bars as mg·L⁻¹. All values are mean + S.E.M.; *p<0.05, based on ANOVA followed by Tukey post hoc test.

The effects of micronized (run 1) and non-micronized NAC in the light/dark test are shown in Fig. 7.9 C-D. Number of crossing between the compartments, a measure of general locomotor activity, was not altered by any of the treatments (Fig. 7.9 D). As expected, the positive control bromazepam (BMZ) increased the time fish spent in the light side of the apparatus, confirming its anxiolytic-like activity in zebrafish (light environments are generally more anxiogenic to zebrafish). The higher concentration of non-micronized NAC (1.0 mg·L⁻¹) had the same effect, again replicating the previous results published by [15]. Regarding micronized NAC, all concentrations decreased

anxiety levels, even the lowest ($0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), which was devoid of effects in the standard formulation (Fig. 7.9 C). This result demonstrates that the micronization process, besides preserving the biological properties of NAC, significantly decreased its minimum effective concentration *in vivo*. This was probably achieved due to the reduced particle size obtained, which conferred increased bioavailability and thus increased potency due to a pharmacokinetic reason. Since the oral bioavailability of NAC has been shown to range between 4 to 10% [44,45], such improvement is particularly important to this drug.

7.4 CONCLUSION

The SEDS supercritical fluid micronization process conferred NAC better features both *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* it significantly increased the dissolution rate, improved antioxidant activity and altered the crystalline structure of the compound and its melting point, which may generate improvements both *in vivo* and *in vitro*. Regarding *in vivo* effects, in the light/dark test NAC presented biological activity even in a micronized concentration 100 lower than non-micronized NAC, with an effect size comparable to the widely used anxiolytic bromazepam. From the *in vivo* results it can be argued that the micronization process increased the pharmacological potency of NAC. These results, both *in vitro* and especially *in vivo*, bring new horizons for drugs with low bioavailability, since the technique of supercritical fluid micronization is able to increase drug bioavailability and possibly improve therapeutical effects.

Acknowledgements

The authors thank CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development, Brazil - Project 478520/2013-1) and CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, Brazil) for financial support and scholarships and LCME-UFSC for the SEM analysis. Central Analysis of Chemical Engineering and Food Engineering (UFSC) and also Central Analysis of Chemistry (UFSC) by XRD analysis.

7.5 REFERENCES

1. Fangueiro JF, Marques IR, Severino P, Santana MHA, Souto EB. Development, production and characterization of nanocrystals of poorly soluble drugs. *Quím. Nova.* 2012;35:1848–53.
2. Carrilho E, Tavares MCH, Lanças FM. Supercritical fluids in analytical chemistry. III.: applications. *Quím. Nova.* 2006;29:790–5.
3. Rodrigues MA, Tiago JM, Duarte A, Geraldes V, Matos HA, Gomes Azevedo E. Polymorphism in Pharmaceutical Drugs by Supercritical CO₂ Processing: Clarifying the Role of the Antisolvent Effect and Atomization Enhancement. *Cryst. Growth Des.* 2016;16:6222–9.
4. Rodrigues MA, Tiago JM, Padrela L, Matos HA, Nunes TG, Pinheiro L, et al. New thermoresistant polymorph from CO₂ recrystallization of minocycline hydrochloride. *Pharm. Res.* 2014;31:3136–49.
5. Martín Á, Scholle K, Mattea F, Meterc D, Cocero MJ. Production of Polymorphs of Ibuprofen Sodium by Supercritical Antisolvent (SAS) Precipitation. *Cryst. Growth Des.* 2009;9:2504–11.
6. Berk M, Malhi GS, Gray LJ, Dean OM. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. *Trends Pharmacol. Sci.* 2013;34:167–77.
7. Dean O, Giorlando F, Berk M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *J. Psychiatry Neurosci. JPN.* 2011;36:78–86.
8. Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim. Biophys. Acta.* 2013;1830:4117–29.
9. Deepmala null, Slattery J, Kumar N, Delhey L, Berk M, Dean O, et al. Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: A systematic review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2015;55:294–321.
10. Costa-Campos L, Herrmann AP, Pilz LK, Michels M, Noetzold G, Elisabetsky E. Interactive effects of N-acetylcysteine and antidepressants. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2013;44:125–30.

11. Gere-Pászti E, Jakus J. The effect of N-acetylcysteine on amphetamine-mediated dopamine release in rat brain striatal slices by ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr. BMC*. 2009;23:658–64.
12. Hashimoto K, Tsukada H, Nishiyama S, Fukumoto D, Kakiuchi T, Shimizu E, et al. Protective effects of N-acetyl-L-cysteine on the reduction of dopamine transporters in the striatum of monkeys treated with methamphetamine. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol*. 2004;29:2018–23.
13. Hastings TG. The role of dopamine oxidation in mitochondrial dysfunction: implications for Parkinson's disease. *J. Bioenerg. Biomembr*. 2009;41:469–72.
14. Herrmann AP, Benvenuti R, Pilz LK, Elisabetsky E. N-acetylcysteine prevents increased amphetamine sensitivity in social isolation-reared mice. *Schizophr. Res*. 2014;155:109–11.
15. Mocelin R, Herrmann AP, Marcon M, Rambo CL, Rohden A, Bevilaqua F, et al. N-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2015;139 Pt B:121–6.
16. Santos P, Herrmann AP, Benvenuti R, Noetzold G, Giongo F, Gama CS, et al. Anxiolytic properties of N-acetylcysteine in mice. *Behav. Brain Res*. 2017;317:461–9.
17. Steullet P, Neijt HC, Cuénod M, Do KQ. Synaptic plasticity impairment and hypofunction of NMDA receptors induced by glutathione deficit: relevance to schizophrenia. *Neuroscience*. 2006;137:807–19.
18. Bavarsad Shahripour R, Harrigan MR, Alexandrov AV. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain Behav*. 2014;4:108–22.
19. Franceschi E, De Cesaro AM, Feiten M, Ferreira SRS, Dariva C, Kunita MH, et al. Precipitation of β -carotene and PHBV and coprecipitation from SEDS technique using supercritical CO₂. *J. Supercrit. Fluids*. 2008;47:259–69.

20. Priamo WL, de Cezaro AM, Ferreira SRS, Oliveira JV. Precipitation and encapsulation of β -carotene in PHBV using carbon dioxide as anti-solvent. *J. Supercrit. Fluids*. 2010;54:103–9.
21. Aguiar GPS, Boschetto DL, Chaves LMPC, Arcari BD, Piatto AL, Oliveira JV, et al. Trans-resveratrol micronization by SEDS technique. *Ind. Crops Prod*. 2016;89:350–5.
22. Loss RA, Pereira GN, Boschetto DL, Aguiar GSP, Machado JR, Chaves LMPC, et al. Encapsulation of eugenyl acetate in PHBV using SEDS technique and in vitro release evaluation. *J. Food Sci. Technol*. 2016;53:3859–64.
23. Cheng Y, Xu W, Chen Z, Wang Z, Huang D. Micronization of etoposide using solution-enhanced dispersion by supercritical CO₂. *J. Supercrit. Fluids*. 2016;115:10–6.
24. Raggi MA, Cavrini V, Di Pietra AM. Colorimetric determination of acetylcysteine, penicillamine, and mercaptopropionylglycine in pharmaceutical dosage forms. *J. Pharm. Sci*. 1982;71:1384–6.
25. Khan MA, Rahman MM, Sardar MN, Arman MSI, Islam MB, Khandakar MJA, et al. Comparative investigation of the free radical scavenging potential and anticancer property of *Diospyros blancoi* (Ebenaceae). *Asian Pac. J. Trop. Biomed*. 2016;6:410–7.
26. Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, dos Santos TC, Coube CS, et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res. PTR*. 2001;15:127–30.
27. Gebauer DL, Pagnussat N, Piatto AL, Schaefer IC, Bonan CD, Lara DR. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2011;99:480–6.
28. Giacomini ACVV, Abreu MS, Giacomini LV, Siebel AM, Zimmerman FF, Rambo CL, et al. Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced-behavior. *Behav. Brain Res*. 2015;

29. Marcon M, Herrmann AP, Mocelin R, Rambo CL, Koakoski G, Abreu MS, et al. Prevention of unpredictable chronic stress-related phenomena in zebrafish exposed to bromazepam, fluoxetine and nortriptyline. *Psychopharmacology (Berl.)*. 2016;233:3815–24.
30. Piato ÂL, Capiotti KM, Tamborski AR, Oses JP, Barcellos LJG, Bogo MR, et al. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2011;35:561–7.
31. Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol. Behav.* 2007;90:54–8.
32. Miguel F, Martín A, Gamse T, Cocero MJ. Supercritical anti solvent precipitation of lycopene: Effect of the operating parameters. *J. Supercrit. Fluids*. 2006;36:225–35.
33. Box GEP, Wetz J. Criteria for Judging Adequacy of Estimation by an Approximating Response Function. [Internet]. WISCONSIN UNIV MADISON DEPT OF STATISTICS, WISCONSIN UNIV MADISON DEPT OF STATISTICS; 1973 Mar. Report No.: UWIS-DS-73-9. Available from: <http://www.dtic.mil/docs/citations/AD0769627>
34. Neto BB, Scarminio IS, Bruns RE. Como fazer experimentos: Aplicações na Ciência e na Indústria. Bookman Editora; 2010.
35. Hiendrawan S, Veriansyah B, Tjandrawinata RR. Micronization of fenofibrate by rapid expansion of supercritical solution. *J. Ind. Eng. Chem.* 2014;20:54–60.
36. Zhu F, Du B, Li R, Li J. Effect of micronization technology on physicochemical and antioxidant properties of dietary fiber from buckwheat hulls. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2014;3:30–4.
37. Desai KGH, Mallery SR, Schwendeman SP. Formulation and Characterization of Injectable Poly(dl-lactide-co-glycolide) Implants Loaded with N-Acetylcysteine, a MMP Inhibitor. *Pharm. Res.* 2008;25:586–97.
38. Kumar SS, Nangia A. A new conformational polymorph of N-acetyl-L-cysteine. The role of S–H···O and C–H···O interactions. *CrystEngComm*. 2013;15:6498–505.

39. Rodríguez-Spong B, Price CP, Jayasankar A, Matzger AJ, Rodríguez-Hornedo N. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: A supramolecular perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004;56:241–74.
40. Blagden N, de Matas M, Gavan PT, York P. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007;59:617–30.
41. Kawabata Y, Wada K, Nakatani M, Yamada S, Onoue S. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. *Int. J. Pharm.* 2011;420:1–10.
42. Hancock BC, Parks M. What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? *Pharm. Res.* 2000;17:397–404.
43. Huang L-F, Tong W-Q. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004;56:321–34.
44. Borgström L, Kågedal B, Paulsen O. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1986;31:217–22.
45. Olsson B, Johansson M, Gabrielsson J, Bolme P. Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1988;34:77–82.

CAPÍTULO 8

8. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

8.1. Conclusões gerais

Neste trabalho foi possível micronizar pela técnica SEDS tanto trans-resveratrol como N-acetilcisteína. Referente ao trans-resveratrol verificou-se que a variável mais influente no processo de micronização foi a temperatura do processo sendo que temperaturas altas aumentam o tamanho médio das partículas, algo não desejado visto que o processo de micronização objetiva a redução do tamanho médio de partícula. O melhor resultado do processo de micronização do trans-resveratrol foi no ensaio onde foram utilizadas as condições mais brandas de processo (80 bar e 35 °C). Isto é importante tanto do ponto de vista econômico como do ponto de vista operacional visto que o trans-resveratrol pode ser convertido facilmente para sua forma cis, devido o fato de ser um composto termosensível. O melhor resultado reduziu o tamanho médio de partícula do composto para cerca de 167 vezes (36,65 para 0,22 μm).

Em relação às propriedades do trans-resveratrol após o processo de micronização verificou-se um aumento da solubilidade do composto em água, cerca de 2,8 vezes comparado ao composto não-micronizado, incremento da velocidade de dissolução em 1,8 vezes, além de aumentar a atividade antioxidante do composto em relação ao não-micronizado. Pelas análises de DSC (Apêndice E) e DR-X observou-se que houve modificações na estrutura cristalina do Trans-resveratrol, fator este que pode ter levando a alterações físico-químicas do composto. Pode-se concluir, então, que isso apresenta indícios de possível formação de um polimorfo de trans-resveratrol, visto que ambas as análises comprovam modificações na estrutura cristalina.

Os resultados obtidos do processo de micronização do trans-resveratrol são promissores, pois possibilitam maior uso do trans-resveratrol na indústria de alimentos, química e farmacêutica visto que a maior barreira da atual aplicação industrial é sua baixa solubilidade em soluções aquosas, o que provoca baixa biodisponibilidade.

Já referente aos resultados da NAC, foram realizados 2 delineamentos experimentais e, em ambos os DCCs, o melhor resultado encontra-se na região mais branda do processo, sendo pressão de 80 bar e temperatura de 35 °C, obtendo-se assim, uma redução do tamanho da partícula de cerca de 248 vezes (709,8 para ~2,9 μm). Comparando as

propriedades físico-químicas do composto micronizado *versus* não-micronizado observou-se o aumento na velocidade de dissolução sendo que somente no contato do solvente com o composto ocorre total dissolução do mesmo, diferente do composto não-micronizado que leva cerca de 420 s (7 min) para alcançar 99 % da dissolução. Pelas análises de DR-X verificou-se que NAC micronizada reduziu a cristalinidade após o processo, visto que as reflexões do difratograma do composto micronizado apresenta menor intensidade nas reflexões e pela análise de DSC verificou-se que houve deslocamento do ponto de fusão do composto, indícios de modificações da estrutura química. A atividade antioxidante do composto aumentou após o processo de micronização, assim como no trans-resveratrol. Nos testes *in vivo* em *Zebrafish* observou-se que a NAC micronizada diminuiu a concentração eficaz mínima em 100 vezes, obtendo mesmo efeito tipo ansiolítico do composto não-micronizado. Tal resultado é excelente visto que a redução da concentração eficaz mínima provém do aumento da biodisponibilidade do composto, algo almejado nas indústrias farmacêutica, química e de alimentos.

Os resultados obtidos ao longo deste trabalho levam à conclusão de que a micronização por fluido supercrítico utilizando a técnica SEDS é uma ótima alternativa para aumentar a solubilidade e velocidade de dissolução de compostos, além de provocar modificações na cristalinidade acarretando melhoras tanto nas atividades biológicas *in vitro* como *in vivo*. Tais resultados (*in vitro/ in vivo*) abrem novos horizontes na área de micronização por fluido supercrítico, do ponto de vista científico e tecnológico, tanto para indústria farmacêutica, quando para a indústria química e de alimentos, visto que a solubilidade e a biodisponibilidade são fatores limitantes de alguns compostos que tornam inviável seu uso industrial em certos casos.

8.2 Sugestões para trabalhos futuros

Devido à escassez de trabalhos que abordam, além da influência das variáveis de operação em relação ao tamanho de partículas e ensaios *in vitro*, e a necessidade emergente de dados *in vivo*, pois a priori da micronizar é aumentar biodisponibilidade dos compostos que somente pode ser verificadas por meio de dados *in vivo*, seria interessante estudar outros compostos de grande interesse industrial que apresente baixa solubilidade em meio aquoso e baixa biodisponibilidade *in vivo*.

Outros aspectos que podem ser explorados em trabalhos futuros seria determinar a estruturas novas dos cristais formados por meio da

análise de DR-X em monocristal a fim de definir a estrutura dos possíveis polimorfismos obtidos e verificar em banco de dados de polimorfismos se já existe aquela estrutura registrada e patenteada. Ainda em relação à caracterização das partículas, vale o esforço de estudar a estabilidade térmica das partículas e tempo de armazenamento do composto.

Por fim, em relação ao processo de micronização seria de grande relevância estudar a influência do diâmetro do capilar utilizando capilares com diâmetro interno inferiores a 100 μm , a fim de otimizar mais o processo de micronização com finalidade de alcançar partículas nanométricas.

CAPÍTULO 9

9. PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA DECORRENTE (DIRETA OU INDIRETAMENTE) DA EXECUÇÃO DESTE TRABALHO

O referente capítulo apresenta a produção técnico-científica decorrente (direta ou indiretamente) da execução do trabalho relacionando artigos publicados e submetidos além de trabalhos publicados em anais de eventos científicos. Alguns trabalhos citados aqui não fazem parte do corpo do documento de tese, mas foram realizados em paralelo e têm fundamental importância no desenvolvimento do trabalho.

9.1 Trabalhos publicados/submetidos em periódicos

1. AGUIAR, G.P.S., BOSCHETTO, D.L., CHAVES, L.M.P.C., ARCARI, B.D., PIATO, A.L., OLIVEIRA, J.V., LANZA, M. Trans-resveratrol micronization by SEDS technique. *Ind. Crops Prod.* 89, 350–355, 2016. doi:10.1016/j.indcrop.2016.04.047
2. LOSS, R.A., PEREIRA, G.N., BOSCHETTO, D.L., AGUIAR, G.P.S., MACHADO, J.R., CHAVES, L.M.P.C., SILVA, M.J.A., OLIVEIRA, D., OLIVEIRA, J.V. Encapsulation of eugenyl acetate in PHBV using SEDS technique and in vitro release evaluation. *J. Food Sci. Technol.* 53, 3859–3864, (2016). doi:10.1007/s13197-016-2362-1.
3. DAL MAGRO, C.; AGUIAR, G.P.S.; VENERAL, J.G.; SANTOS, A.E.; CHAVES, L.M.P.C.; OLIVEIRA, J.V.; LANZA, M. Co-precipitation of trans-resveratrol in PHBV using Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids technique. *Supercritical fluid*, 127, 182-190, (2017). doi.org/10.1016/j.supflu.2017.03.025.
4. AGUIAR, G.P.S., CHAVES, L.M.P.C., BOSCHETTO, D.L., PIATO, A.L., OLIVEIRA, J.V., LANZA, M. N-acetylcysteine micronization by SEDS technique using supercritical CO₂. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, aceito para publicação em 24 nov. de 2016.

5. AGUIAR, G.P.S., ARCARI, B.D., CHAVES, L.M.P.C., DAL MAGRO, C., BOSCHETTO, D.L., PIATO, A.L., LANZA, M., OLIVEIRA, J.V. Micronization of trans-resveratrol by supercritical fluid: dissolution, solubility and *in vitro* antioxidant activity. Journal of Food Engineering, submetido, 2017.
6. AGUIAR, G.P.S., MARCON, M., MOCELIN, R., HERRMANN, A.P, CHAVES, L.M.P.C., OLIVEIRA, J.V., LANZA, M., PIATO, A.L. Micronization of N-acetylcysteine by supercritical fluid: evaluation of *in vitro* and *in vivo* biological activity. Pharmaceutical Research, submetido, 2017.

9.2 Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

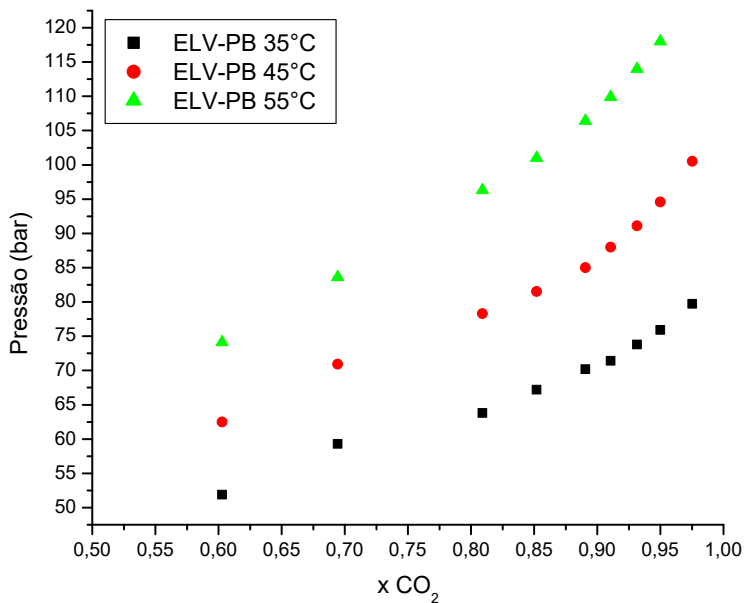
1. AGUIAR, G. P. S.; ARCARI, B. D. ; BOSCHETTO, D. L. ; PIATO, A. L. ; OLIVEIRA, J. VLADIMIR; LANZA, M. Micronização de Trans-resveratrol por fluido supercrítico: solubilidade e atividade antioxidante. In: XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2016, Gramado-RS. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2016.
2. CARVALHO, G. O. ; AGUIAR, G. P. S.; SANTOS, A. E.; MAGRO, C. D.; OLIVEIRA, J. VLADIMIR; LANZA, M. Encapsulamento de antocianinas do resíduo de uva Niágara bordô usando a técnica SEDS. In: XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2016, Gramado-RS. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2016.
3. DAL MAGRO, C.; AGUIAR, G. P. S.; SANTOS, A. E.; CHAVES, L. M. C.; OLIVEIRA, J. VLADIMIR; LANZA, M. Coprecipitação de trans-resveratrol em PHBV utilizando a técnica de dispersão de solução aumentada por fluido supercrítico (SEDS). In: XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2016, Gramado-RS. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2016.
4. AGUIAR, G. P. S.; CHAVES, L. M. C. ; BOSCHETTO, D. L. ; ANDRADE, K. S.; PIATO, A. L.; OLIVEIRA, J. V.; LANZA, M. N-acetylcysteine micronization by solution enhanced dispersion by

- supercritical fluids technique (SEDS). In: IV Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids - PROSCIBA 2016, 2016, Vina del Mar - Chile. Anais da IV Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids – PROSCIBA, 2016.
5. ANDRADE, K. S.; AGUIAR, G. P. S.; LANZA, M.; FERREIRA, S. R. S. Encapsulation of pink pepper (*Schinus terebinthifolius* R.) extract by SEDS technique.. In: IV Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids - PROSCIBA 2016, 2016, Vina del Mar - Chile. Anais da IV Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids - PROSCIBA, 2016.
 6. SANTOS, A. E.; AGUIAR, G. P. S.; CHAVES, L. M. C.; CARVALHO, G. O.; LACOWICZ, R. A.; LANZA, M. Otimização da extração de compostos bioativos da casca e polpa de Jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). In: III Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de alimentos. Anais do III CBSEA 2016.
 7. MAGRO, C. D.; AGUIAR, G. P. S.; SANTOS, A. E.; CHAVES, L. M. C.; CARVALHO, G. O.; OLIVEIRA, J. VLADIMIR ; LANZA, M. Coprecipitação de resveratrol em PHBV utilizando Tecnologia Supercrítica. In: III Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de alimentos. Anais do III CBSEA 2016.
 8. AGUIAR, G. P. S.; BOSCHETTO, D. L. ; CHAVES, L. M. C.; ARCARI, B. D. ; OLIVEIRA, J. V.; LANZA, M. Micronização de trans-resveratrol utilizando técnica de dispersão de solução aumentada por fluidos supercríticos. In: VIII Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada (CBTermo), 2015, Aracaju. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada (CBTermo), 2015.
 9. LOSS, R. A.; PEREIRA, G. N.; BOSCHETTO, D. L. ; AGUIAR, G. P. S.; MACHADO, J. R.; CHAVES, L. M. C.; HENSE, H.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Encapsulamento de acetato de eugenila obtido por síntese enzimática utilizando técnica de dispersão de solução aumentada por fluidos supercríticos (SEDS). In: VIII Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada (CBTermo), 2015, Aracaju. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Termodinâmica Aplicada (CBTermo), 2015.

10. RIBEIRO, J.M.; AGUIAR, G.P.S. ; LOSS, R.A.; BOSCHETTO, D.; PEREIRA, G.N.; CHAVES, L.M.C.; HENSE, H.; LANZA, M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; NINOW, J.L. Emprego de fluído supercrítico no encapsulamento de acetato de eugenila obtido por síntese enzimática. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos e Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa, 2015. v. 2.

APÊNDICE A

Figura A.1 - Diagrama P, x, y experimental para sistema ternário CO₂ (1) + diclorometano (2) + acetona (3).



Todos os ensaios ficaram na região de única fase ficando na composição de 0,95 de CO₂.

APÊNDICE B

Figura B.1 - Curva de calibração para determinação da concentração de trans-resveratrol.

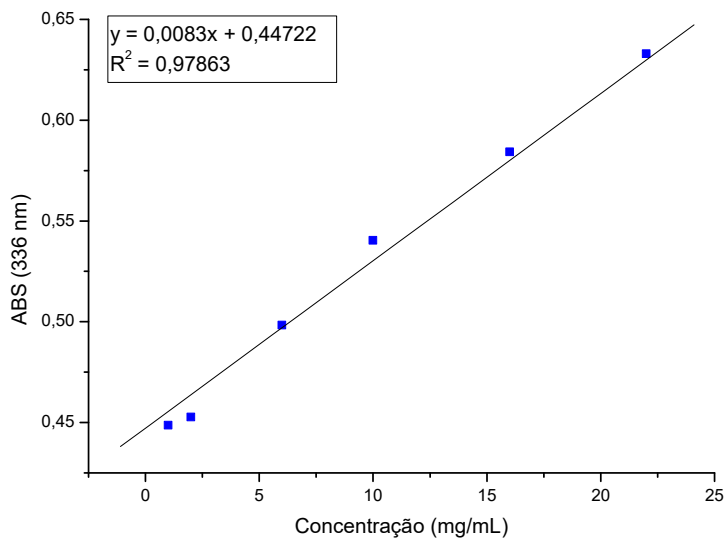
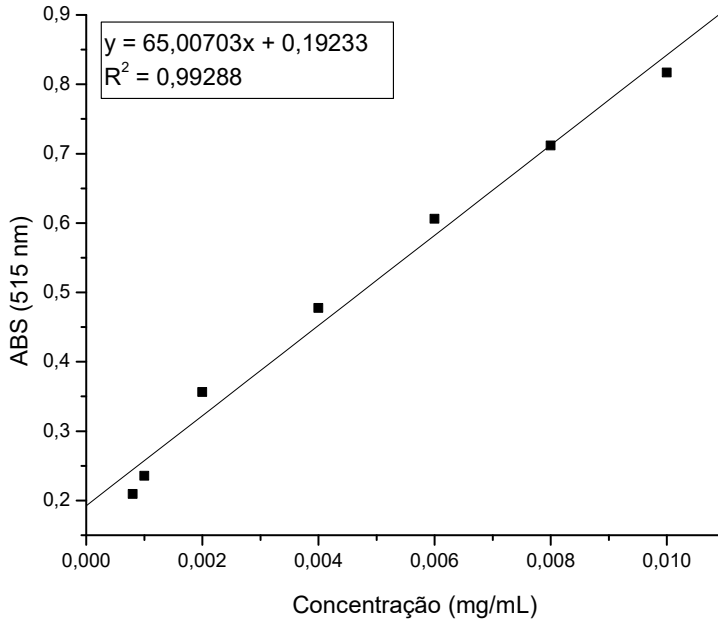


Figura B.2 - Curva de calibração para determinação da concentração de NAC.

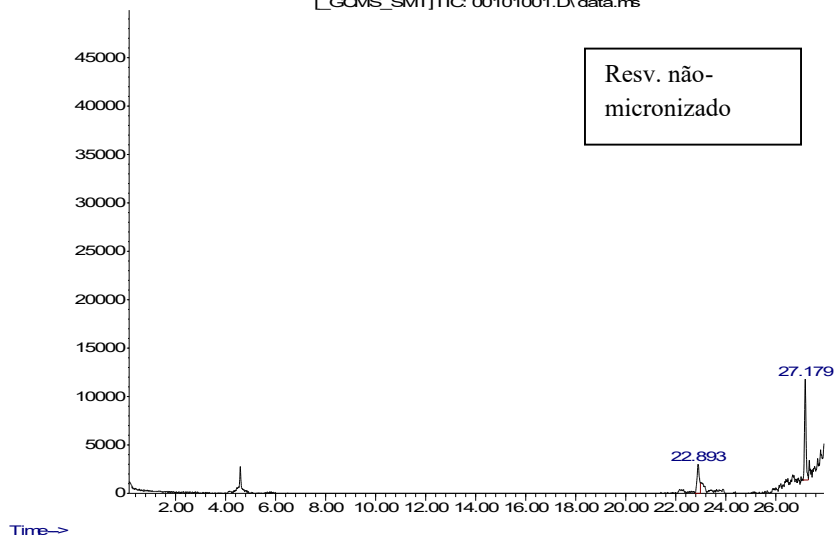


APÊNDICE C

Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) das amostras de trans-resveratrol.

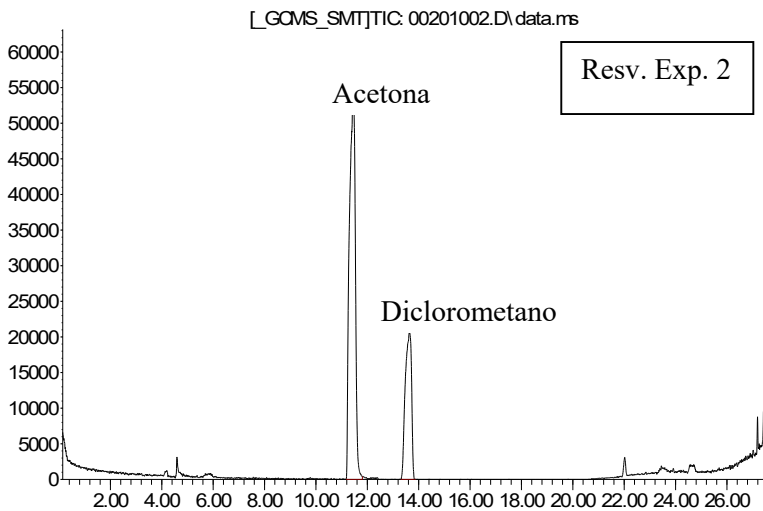
Abundance

[_GCMS_SMT]TIC: 00101001.D\data.ms



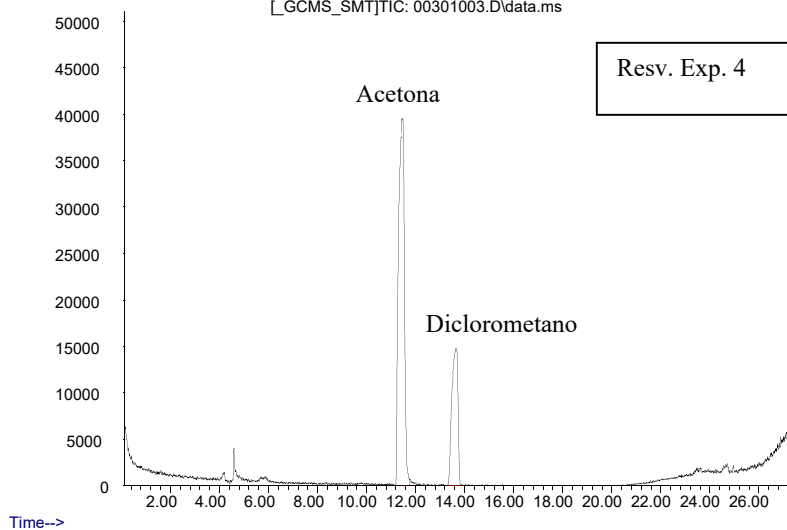
Time→

Abundance

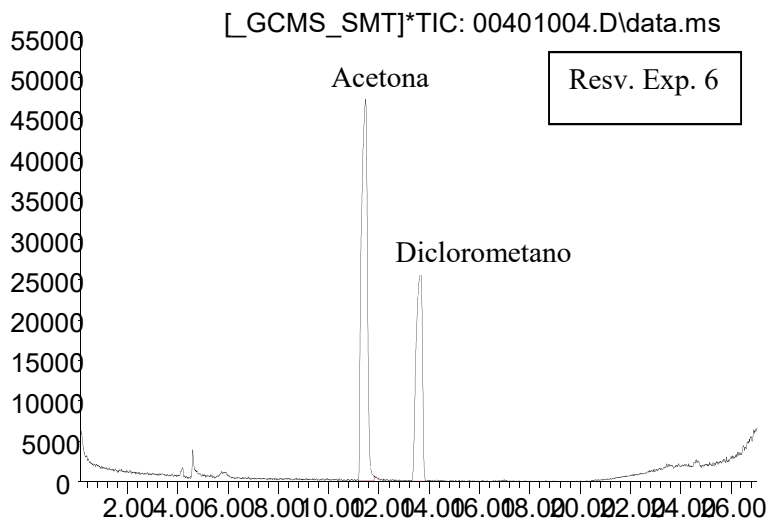


Abundance

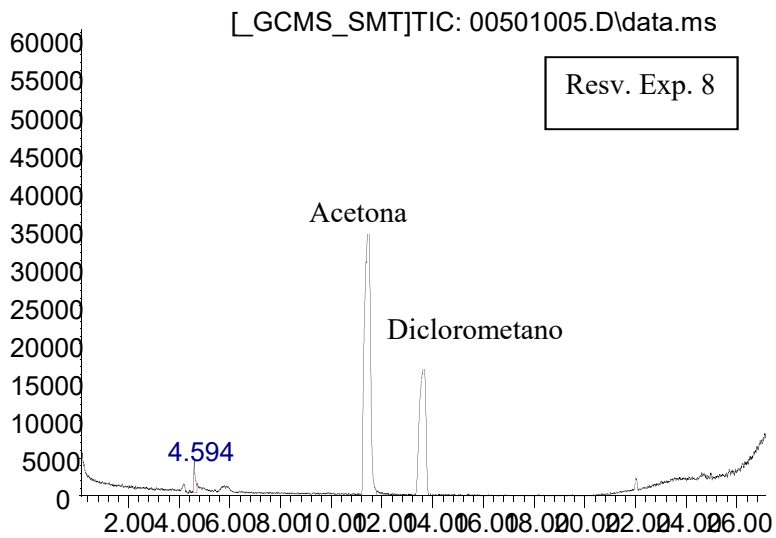
[GCMS_SMT]TIC: 00301003.D\data.ms



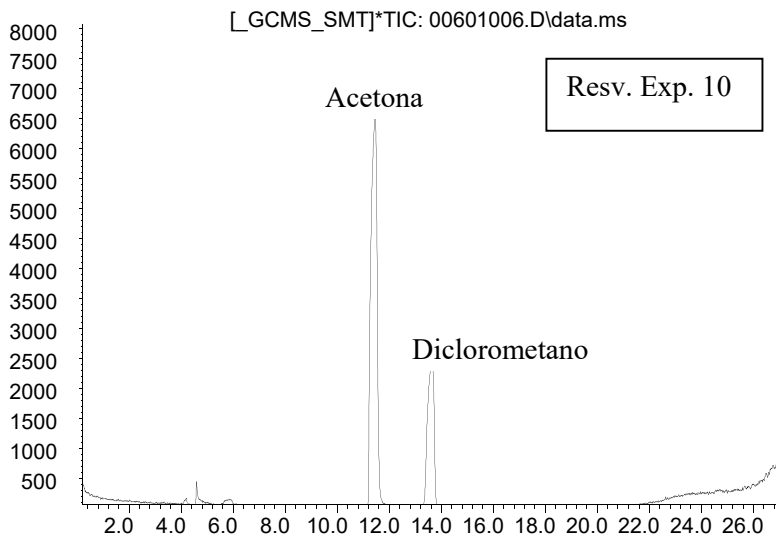
Abundance



Abundance

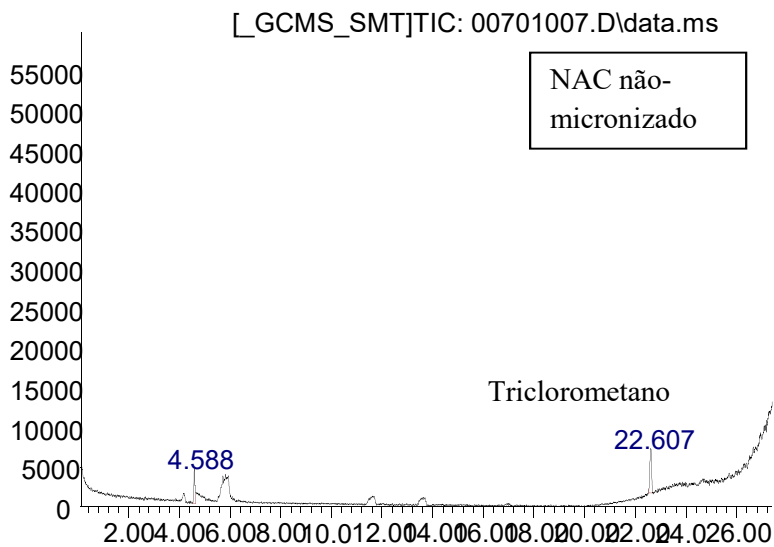


Abundance

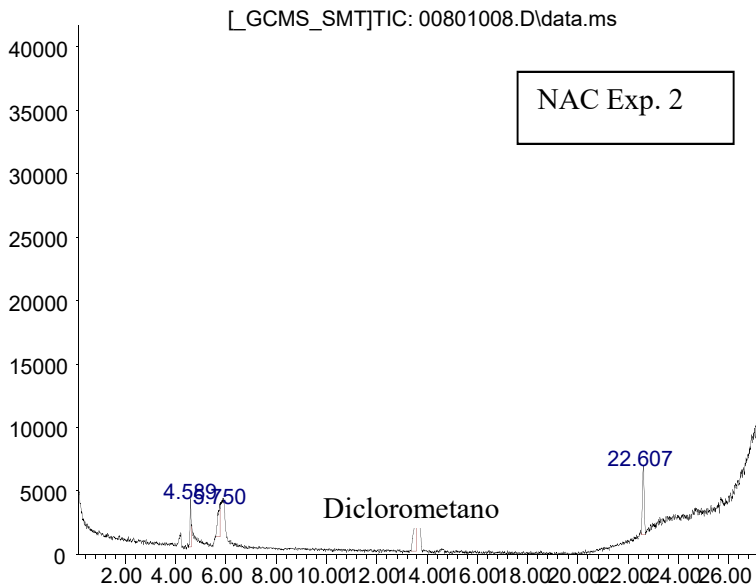


Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) das amostras de N-aceticisteína.

Abundance

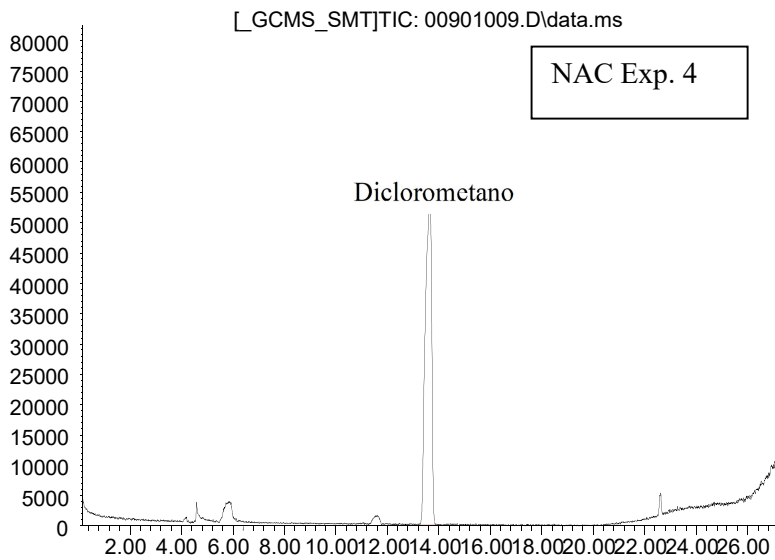


Abundance

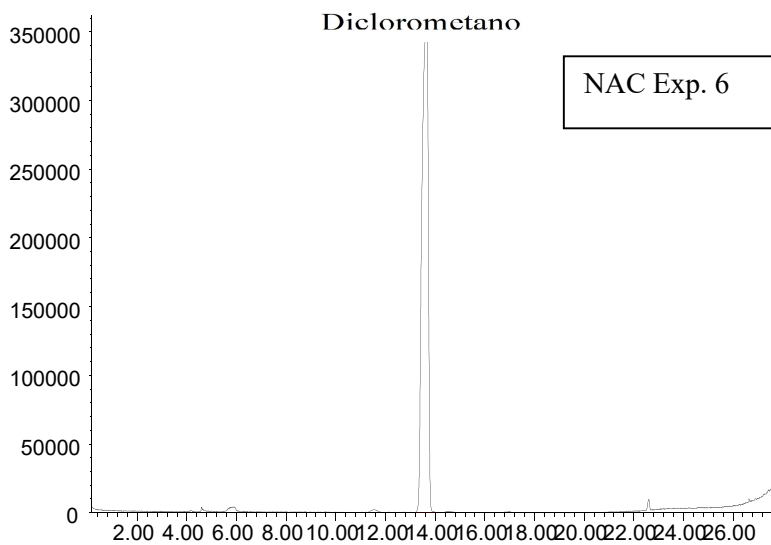


Time-->

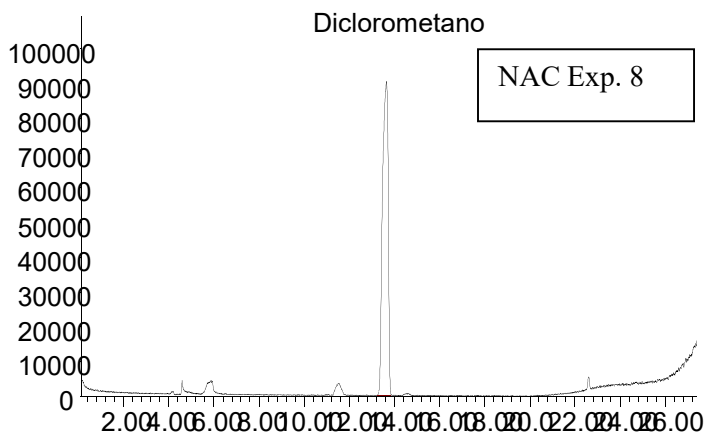
Abundance



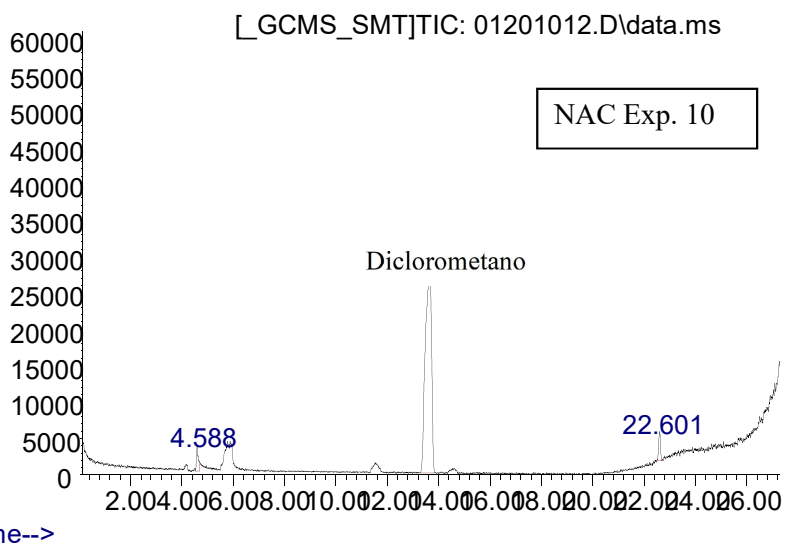
Abundance



Abundance

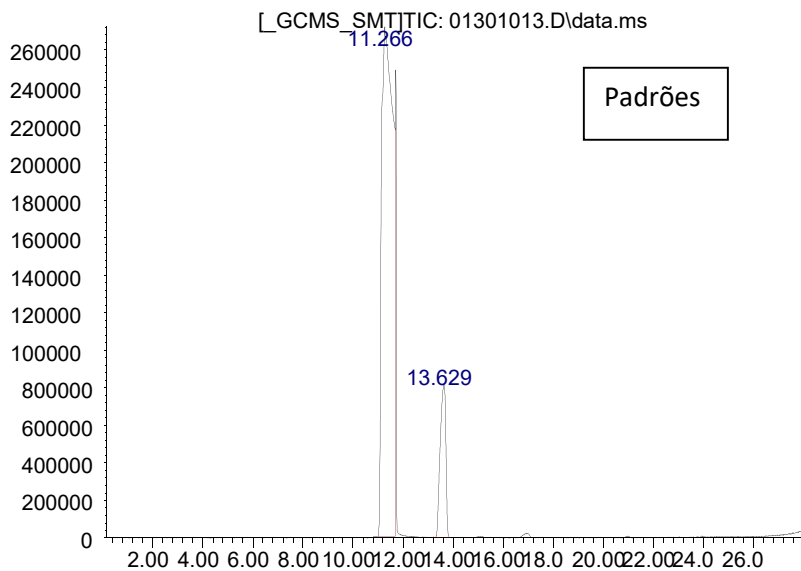


Abundance



Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) dos padrões acetona e diclorometano.

Abundance



Time-->

APÊNDICE D

Curvas de calibração construídas para o CG-FID.

Figura D.1 - Curva de calibração para quantificação de ppm residual de diclorometano.

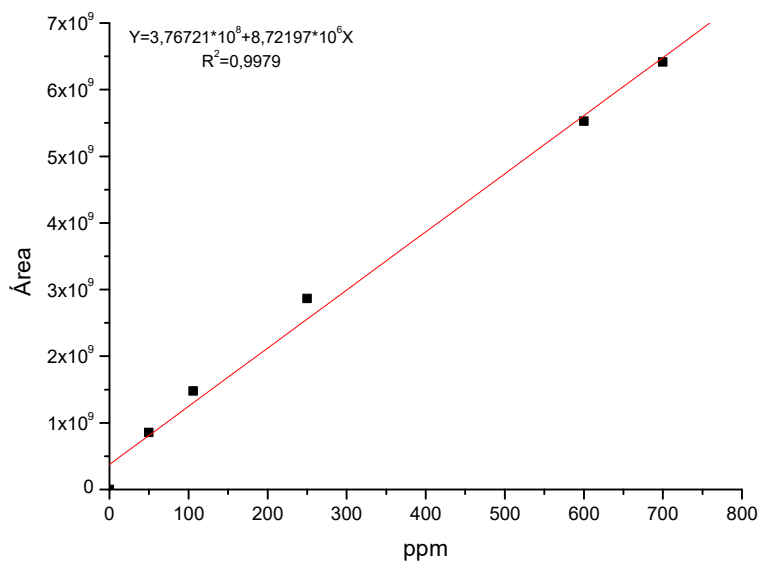
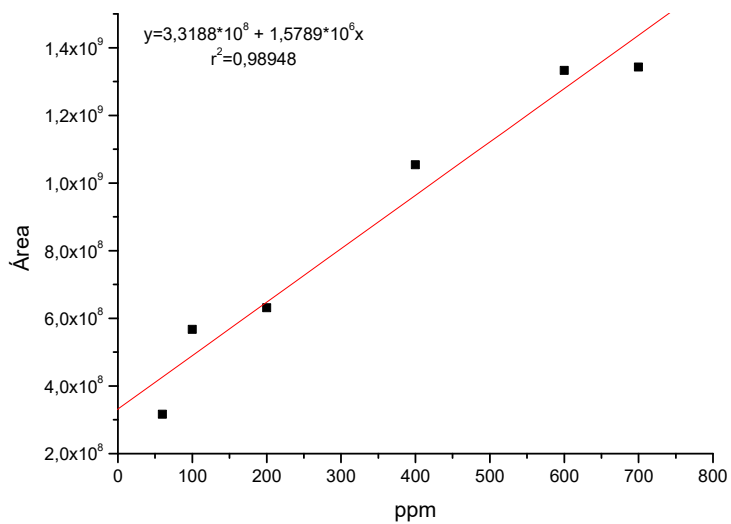
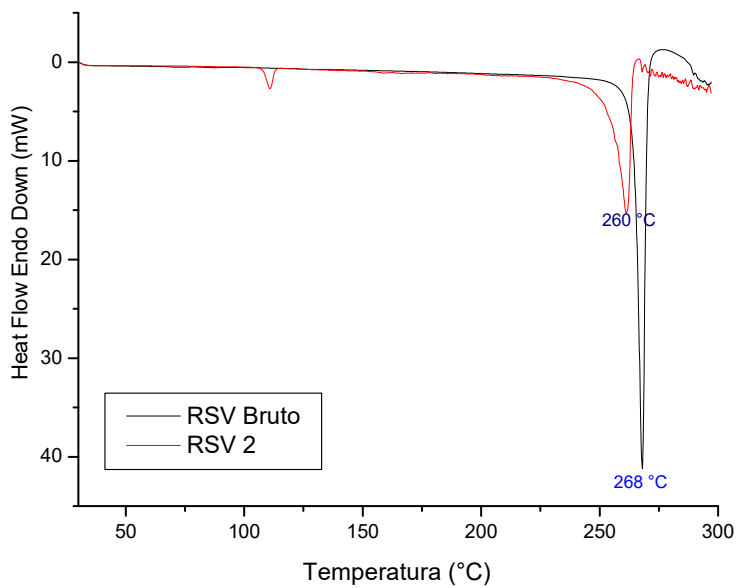


Figura D.2 - Curva de calibração para quantificação de ppm residual de Acetona.



APÊNDICE E

Figura E.1 - DSC da amostra de Trans-resveratrol micronizado e não-micronizado.



ANEXO A



CERTIFICADO DE ANÁLISE

Dens = 0,516g
 Ref: 105
 P: 0,250g x 1

INSUMO: N-ACETIL-L-CISTEINA		DOB/DOICAS: 00067 / NA / 616-91-1	
ORIGEM / PROCEDÊNCIA: CHINA / CHINA		CÓD. PRODUTO: 23170058	
LOTE IBEROQUÍMICA: 14060096		LOTE FABRICANTE: 140302	
DATA DE FABRICAÇÃO: 02/03/2014		DATA DE VALIDADE: 01/03/2016	
FORMA FARMACÉUTICA: PÓ		DATA DA ANÁLISE: 27/06/2014	
DATA DA EMISSÃO: 27/06/2014		ORDEM DE FRACTIONAMENTO: 1.146	
OBS: FM: C3H9NO3S PM: 163,20			
ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO	REFERÊNCIAS
FÍSICO - QUÍMICO			
Aparência	Pó cristalino branco com ligeiro odor acético	Pó cristalino branco com ligeiro odor acético*	USP 32
Identificação por IR	Conforme	Conforme	USP 32
M ⁺ Pesados	≤ 10 ppm	< 10 ppm*	USP 32
Perda por Secagem	≤ 1,0%	0,1%*	USP 32
Solvente Residual	Nenhum solvente orgânico é utilizado no processo de fabricação	Conforme	USP 32
Teor	No mínimo 98,0% e no máximo 102,0% (calculado na base seca)	99,2%	USP 32
Rotação Específica	+21,0° a +27,0°	+26,0°*	USP 32
pH	Entre 2,0 e 2,8 (solução à 1%)	2,2*	USP 32
Resíduo de Ignição	≤ 0,5%	0,4%*	USP 32
Densidade aparente	Informativo	0,57 g/mL*	USP 32
Solubilidade em água	Facilmente solúvel	Facilmente solúvel*	USP 32
Solubilidade em álcool	Facilmente solúvel	Facilmente solúvel*	USP 32
Solubilidade em clorofórmio	Praticamente insolúvel	Praticamente insolúvel*	USP 32
Solubilidade em éter	Praticamente insolúvel	Praticamente insolúvel*	USP 32

(*) Resultados obtidos de análises realizadas pelo laboratório de controle de qualidade físico-químico e microbiológico, os demais foram transcritos conforme indicação de análise do fabricante.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO: Conservar em recipiente hermético protegido da umidade, ao abrigo de luz solar direta, afastado de produtos químicos.

RESULTADO: APROVADO

Daniel Barão Duarte
 Coordenador do Controle da Qualidade

Maria Carolina T. Bigueti
 Farmacêutica Responsável
 CRF SP-67546

PF = 104 - 110 °C

PP = 104 °C



Certificado de Análise

Nr.Clt.: 038124.00GD005/6937

RESVERATROL EXTRACT 100%

C.A.S.: 501-36-0

Seq.9/10 Página: 1/1

569

Data de Fabricação: 10/11/2012
 Data de Validade: 9/11/2015
 Lote Galena (CIQ): 1306017302
 Ordem Fracionamento (OF): 340942

Lote de Fabricação: PRES98-121110
 País de Origem: CHINA
 Nota Fiscal: 0189569

Produto encontra-se nos
 seguintes volumes

1

Dados do Requisitante

Requisitante: GALENA QUIMICA E FARMACEUTICA LTDA.
 Endereço: RUA PEDRO STANCATO, 860 - CAMPO AMARAIS

CNPJ: 57.442.774/0001-90
 Cidade: CAMPINAS/SP

Fone: 0800 7714 270
 CEP: 13.082-050

ARMAZENAMENTO: Amaz.Temp. Ambiente, em recipiente fechado protegido da luz e umidade.
 Produto Higroscópico

Análises/Componentes	Especificações	Incerteza de Medição (U)	Resultados das análises
IDENTIFICAÇÃO			
HPLC (0)	Positivo		Positivo
MICROBIOLOGICO			
Fungos e leveduras (0)	Não mais que 100UFC/g	35	<10 UFC/g
Contagem de bactérias (0)	Não mais que 1000UFC/g	71	10UFC/g
Salmonella spp (0)	Ausente		Ausente
Escherichia coli (0)	Ausente		Ausente
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS			
Descrição (0)	Pó fino branco a quase branco, com odor característico		Pó fino quase branco, com odor característico
Doseamento * (0)	Não menos que 99,0%	1,4 %	99,5%
Perda por dessecação (0)	Não mais que 0,50%	0,17 %	0,10%
Ponto de fusão (0)	258°C a 263°C	3,29	260°C
Água (Karl Fischer) (0)	Não mais que 0,50%	4,54 %	0,08%
Impurezas * (0)	Não mais que 0,10%		Conforme

OBSERVAÇÕES

- Os resultados presentes neste Certificado de Análise, tem seus valores restritos a este lote.

* - Análises em acordo com o certificado de análise do fabricante.

- As demais análises foram realizadas no Laboratório de Controle da Qualidade Galena.
 Referências: (0) Conforme metodologia do fornecedor.

- A incerteza expandida de medição relatada é declarada como a incerteza padrão da medição multiplicada pelo fator de abrangência k.
 Para o ensaio Água por Karl Fisher K= 2,52; pH K=2,37; Ponto de Fusão K=2,65; Perda por Dessecação K=2,10 para os demais testes do escopo K=2 que para uma distribuição normal corresponde a uma probabilidade de abrangência de aproximadamente 95%.
 A incerteza padrão de medição foi determinada de acordo com a publicação EA-4/02.

Resultado: (X) Aprovado

Dt.Início: 15/04/2013 Dt.Término: 18/04/2013

Galena
21

ANEXO B



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão De Ética No Uso De Animais

**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 31940

Título: Investigação do mecanismo de ação ansiolítico da n-acetilcisteína em peixes-zebra (Danio rerio)

Vigência: 13/09/2016 à 01/09/2018

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ÂNGELO LUIS STAPASSOLI PIATO - coordenador desde 13/09/2016
Ricieri Naue Mocelin - Aluno de Doutorado desde 13/09/2016
Matheus Felipe Marcon - Aluno de Doutorado desde 13/09/2016

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 21/11/2016 - SALA 330 DO ANEXO I - PRÉDIO DA REITORIA DA UFRGS/CAMPUS CENTRO/UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de peixes-zebra (Danio rerio) selvagens adultos jovens (mais de 3 meses de vida), machos e fêmeas (50/50%), obtidos da colônia a partir de cruzamentos entre animais adquiridos do Departamento de Bioquímica da UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 5 de Dezembro de 2016

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética