

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Estudo da influência do solvente orgânico e do fluxo de injeção no controle de tamanho de nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas através do método de deslocamento de solvente

Alana Carina Klein

Porto Alegre, março de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Estudo da influência do solvente orgânico e do fluxo de injeção no controle de tamanho de nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas através do método de deslocamento de solvente

Dissertação apresentada por **Alana Carina Klein** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Química

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann, pela acolhida, pelos ensinamentos transmitidos e pela dedicada orientação, possibilitando a concretização deste trabalho.

À Profa. Dra. Silvia S. Guterres, pela disponibilização de seu laboratório e equipamentos de alta tecnologia, possibilitando a melhor fundamentação deste trabalho.

À minha família, em especial aos meus pais Carlos e Inês e irmão Carlos Eduardo, pelo apoio irrestrito, carinho e compreensão demonstrados ao longo deste percurso.

Aos colegas e amigos dos laboratórios K204 (Instituto de Química) e 405 (Faculdade de Farmácia) pela agradável companhia diária, ajuda sempre que solicitada e conhecimento compartilhado.

A todos que, de maneira direta ou indireta, participaram da realização desta dissertação.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	IX
ABREVIATURAS.....	XI
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Sistemas de liberação controlada de fármacos.....	19
2.2 Nanopartículas poliméricas.....	19
2.3 Nanocápsulas de núcleo lipídico.....	22
2.4 Design fatorial.....	22
2.5 Influência de parâmetros experimentais no tamanho e distribuição de tamanho de nanopartículas poliméricas.....	24
2.5.1 Viscosidade da fase orgânica.....	25
2.5.2 Fluxo de injeção.....	26
2.5.3 Solvente orgânico.....	28
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 Materiais.....	35
4.1.1 Matérias-primas.....	35
4.1.2 Aparelhos e equipamentos.....	35
4.1.3 Solventes e outros materiais.....	36
4.2 Métodos.....	37
4.2.1 Preparação das suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico.....	37
4.2.1.1 Fluxo de injeção.....	37
4.2.1.2 Solvente orgânico.....	38

4.2.2	Caracterização das suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico..	39
4.2.2.1	Distribuição de tamanho, tamanho médio, polidispersão, Diâmetro médio e índice de polidispersão das NCL.....	39
4.2.2.1.1	Difração de laser.....	39
4.2.2.1.2	Espalhamento de luz dinâmico ou espectroscopia de correlação de fótons.....	40
4.2.2.2	Potencial zeta.....	40
4.2.2.3	Estabilidade física.....	40
4.2.2.4	Medidas potenciométricas.....	41
4.2.2.5	Rastreamento de partícula.....	41
4.2.2.6	Viscosidade da fase orgânica.....	42
4.2.3	Cálculo do Número de Reynolds.....	42
4.2.4	Cálculo dos parâmetros de solubilidade.....	43
4.2.5	Cálculo da razão dos coeficientes de difusão.....	44
4.2.6	Estudo de gradiente de densidade.....	45
4.2.7	Análise morfológica.....	45
4.2.8	Design fatorial.....	45
4.2.9	Análise estatística.....	46
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1	Preparação e caracterização das suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico.....	48
5.1.1	Fluxo de injeção.....	48
5.1.1.1	Distribuição de tamanho, tamanho médio, polidispersão, Diâmetro médio e índice de polidispersão das NCL.....	48

5.1.1.2 Medidas potenciométricas.....	52
5.1.1.3 Potencial zeta.....	53
5.1.1.4 Estabilidade física.....	54
5.1.1.5 Rastreamento de partícula.....	55
5.1.1.6 Análise morfológica.....	56
5.1.2 Solvente orgânico.....	58
5.1.2.1 Distribuição de tamanho, tamanho médio, polidispersão, Diâmetro médio e índice de polidispersão das NCL preparadas com acetonitrila.....	60
5.1.2.2 Medidas potenciométricas.....	63
5.1.2.3 Potencial zeta.....	63
5.1.2.4 Estabilidade física.....	64
5.1.2.5 Viscosidade da fase orgânica.....	64
5.2 Estudo de gradiente de densidade.....	68
5.3 Estudo fatorial.....	69
5.4 Cálculo do Número de Reynolds.....	71
6. CONCLUSÕES.....	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema utilizado para variação do fluxo de injeção.....	38
Figura 2. Esquema da interpretação dos fenômenos de instabilidade analisados por espalhamento múltiplo de luz empregando o equipamento Turbiscan Lab®.....	41
Figura 3. Gráfico representativo da variação de diâmetro médio (D[4,3]) em função do fluxo de injeção.....	50
Figura 4. Gráfico representativo da variação de d(z-average) em função do fluxo de injeção.....	50
Figura 5. Resultados da técnica de difração de laser, distribuição por volume, para os três fluxos de injeção com diferença estatística de tamanho, 5 mL/min (curva azul), 15 mL/min (curva vermelha) e 38 mL/min (curva azul).....	52
Figura 6. Perfil de variação de <i>DeltaBackscattering</i> para as formulações preparadas nos três fluxos de injeção que apresentaram diferença estatística de tamanho, NCL F1, NCL F4 e NCL F6, respectivamente.....	55
Figura 7. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão para a formulação preparada no menor fluxo de injeção, 5 mL/min, utilizando acetona como solvente orgânico.....	57
Figura 8. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão para a formulação preparada no maior fluxo de injeção, 38 mL/min, utilizando acetona como solvente orgânico.....	57
Figura 9. Distribuição de tamanho obtido pela técnica de difração de laser para as formulações preparadas com acetonitrila.....	58
Figura 10. Distribuição de tamanho obtida pela técnica de difração de laser para as formulações preparadas com 1,4-dioxano.....	59
Figura 11. Perfil de variação de <i>DeltaBackscattering</i> para as formulações preparadas com acetonitrila, LNC ACN F1 e LNC ACN F6, respectivamente.....	64
Figura 12. Relação existente entre a viscosidade da fase orgânica em função do logaritmo da concentração de PCL, para o solvente 1,4-dioxano.....	65

Figura 13. Distribuição granulométrica das nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas segundo a proporção do ponto de inflexão.....	66
Figura 14. Distribuição granulométrica das nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas imediatamente após o ponto de inflexão.....	67
Figura 15. Relação existente entre a viscosidade da fase orgânica em função do logaritmo da concentração de PCL, para o solvente acetonitrila.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulações nomeadas segundo o fluxo de injeção avaliado em sua preparação.....	37
Tabela 2. Valores referentes aos parâmetros de solubilidade dos solventes envolvidos neste cálculo.....	44
Tabela 3. Diâmetro de 50% das partículas, por número (d(0,5)), diâmetro médio (D[4,3]), polidispersão (SPAN), d(z-average) e PdI para as formulações preparadas usando-se acetona como solvente orgânico em diferentes fluxos de injeção.....	49
Tabela 4. Valores de pH obtidos nos diferentes fluxos de injeção.....	53
Tabela 5. Resultados de potencial zeta para as formulações preparadas segundo diferentes fluxos de injeção.....	54
Tabela 6. Número de partículas presente na suspensão aquosa, para as formulações NCL F1 e NCL F6.....	56
Tabela 7. Resultados obtidos para as formulações preparadas com acetonitrila segundo o menor e o maior fluxo de injeção avaliados.....	60
Tabela 8. Valores de parâmetros de solubilidade para os pares solvente/anti-solvente avaliados neste trabalho.....	61
Tabela 9. Coeficientes de difusão para os três solventes orgânicos avaliados.....	62
Tabela 10. Valores de pH obtidos para as formulações preparadas com acetonitrila, no menor e maior fluxo de injeção avaliados.....	63
Tabela 11. Valores de potencial zeta para as formulações preparadas com acetonitrila, no menor e maior fluxo de injeção avaliados.....	63
Tabela 12. Resultado do fatorial 2 ² , avaliando duas variáveis independentes, X ₁ e X ₂ , em dois níveis, 1 e 2, obtendo Y ₁ e Y ₂	69

Tabela 13. Valores teórico e experimental obtidos para o diâmetro médio segundo a técnica de difração de laser, Y₁.....70

Tabela 14. Valores teórico e experimental obtidos para o diâmetro médio segundo a técnica de espalhamento de luz dinâmico, Y₂.....71

Tabela 15. Densidade relativa (ρ) e viscosidade dinâmica (η) obtidas para as fases orgânicas.....71

Tabela 16. Número de Reynolds para cada formulação em estudo.....72

LISTA DE ABREVIATURAS

NCL – Nanocápsulas de núcleo lipídico

MS – Monoesterato de sorbitano

TGCC – Triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico

PCL - poli(ϵ -caprolactona)

PLA - poli(ácido lático)

PLGA - poli(ácido lático-co-ácido glicólico)

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

DSC – do inglês Differential Scanning Calorimetry

MFA – Microscopia de força atômica

PCS – espalhamento de luz dinâmico

PMMA - poli(metacrilato de metila)

DMSO – dimetilsulfóxido

THF – tetrahidrofurano

PEG – poli(etilenoglicol)

atRA - trans-ácido retinóico

HPLC – do inglês High Performance Liquid Chromatography

PVC – poli(cloreto de vinila)

NCL F1 – Nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas no fluxo de injeção de 5 mL min⁻¹

NCL F2 - Nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas no fluxo de injeção de 8 mL min⁻¹

NCL F3 - Nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas no fluxo de injeção de 12 mL min⁻¹

NCL F4 - Nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas no fluxo de injeção de 15 mL min^{-1}

NCL F5 - Nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas no fluxo de injeção de 21 mL min^{-1}

NCL F6 - Nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas no fluxo de injeção de 38 mL min^{-1}

DLS – do inglês *Dinamic light scattering*

PDI – do inglês *Index Polidispersity*

BS – do inglês *Backscattering*

LNC ACN F1 – Nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas segundo o fluxo de injeção de 5 mL min^{-1} , utilizando acetonitrila como solvente orgânico

LNC ACN F6 - Nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas segundo o fluxo de injeção de 38 mL min^{-1} , utilizando acetonitrila como solvente orgânico

RESUMO

O fluxo de injeção e o solvente orgânico, utilizado no preparo de nanoesferas poliméricas, são parâmetros experimentais que controlam o diâmetro e a distribuição de diâmetro das nanopartículas, formadas pelo processo conhecido como nucleação. Considerando as nanocápsulas de núcleo lipídico, formadas pelo processo de auto-organização, estes parâmetros experimentais ainda não foram explorados. Assim, esse trabalho propõe avaliar o fluxo de injeção e o solvente orgânico na preparação destas suspensões aquosas, caracterizando físico-quimicamente estes sistemas. Para variação de fluxo de injeção, utilizou-se uma bomba peristáltica, sendo possível a avaliação dos seguintes fluxos: 5, 8, 12, 15, 21 e 38 mL min⁻¹. O diâmetro das nanocápsulas diminuiu de 256±9 nm a 127 ±8 nm pela técnica de difração de laser e 220±9 nm a 124±13 nm, segundo a técnica de espectroscopia de correlação de fótons. Os solventes orgânicos avaliados foram a acetona, acetonitrila e 1,4-Dioxano. Observou-se que a acetonitrila se mostrou adequada para a condição previamente otimizada com acetona, ao passo que o 1,4-Dioxano apresentou um pico micrométrico em sua distribuição. Assim, foi possível modelar este estudo através de um fatorial de design 2², onde têm-se dois fatores, fluxo de injeção e solvente orgânico, em dois níveis, nos fluxos de 5 e 38 mL min⁻¹ e considerando os solventes acetona e acetonitrila. Como resultado, viu-se que o fluxo de injeção é o parâmetro de maior influência na preparação destas suspensões aquosas, se comparado ao solvente orgânico selecionado. Para elucidar o papel do solvente orgânico na preparação destes sistemas, calculou-se os parâmetros de solubilidade e os coeficientes de difusão solvente orgânico\água e água\solvente orgânico para os três pares avaliados neste trabalho. Viu-se que os parâmetros de solubilidade e os coeficientes de difusão solvente orgânico\água explicam a não variação do diâmetro de partícula em função do solvente orgânico. Ainda, realizou-se um estudo de viscosidade, em função do log [PCL], para fases orgânicas preparadas com acetonitrila e 1,4-dioxano. Obteve-se o valor de 2,30 mg mL⁻¹ para a concentração de agregação crítica quando utilizado o 1,4-Dioxano e 10,47 mg mL⁻¹ para a fase orgânica preparada com acetonitrila. Então, pode-se dizer que este valor elevado encontrado para a acetonitrila é uma vantagem de sua utilização, uma vez que as características nanoscópicas são mantidas e um maior número de partículas pode ser formado.

Palavras-chave: nanoesferas, nanocápsulas, fluxo de injeção, solvente orgânico, diâmetro de partícula, estudo fatorial, concentração de agregação crítica.

ABSTRACT

Flow rate and organic solvent, used to prepare polymeric nanospheres, are experimental parameters that control the size and the size distribution curves of these nanoparticles, formed by particle nucleation. Considering the lipid core nanocapsules, formed by self-assembled process, these experimental parameters are not evaluated yet. Considering those, this work proposes to evaluate the flow rate and the organic solvent in the preparation of these aqueous suspensions, characterizing them physicochemically. To change the flow rate, it was used a peristaltic pump, it being possible to evaluate the following flows: 5, 12, 15, 21 and 38 mL min⁻¹. The nanocapsules diameters decreased from 256±9 nm to 127 ±8 nm, by laser difratometry and 220±9 nm to 124±13 nm, by the photon correlation spectroscopy technique. The organic solvents evaluated were acetone, acetonitrile and 1,4-dioxane. It was observed that the acetonitrile was adequate for the condition previously optimized with acetone, whereas in the 1,4-dioxane distribution appears a micrometric peak. So, it was possible to modelate this study by a 2² factorial design, two factors, flow rate and organic solvent, in two levels, 5 and 38 mL min⁻¹, considering acetone and acetonitrile. As a result, it was seen that the flow rate is the most influential parameter in the preparation of aqueous suspensions, compared to organic solvent selected. To elucidate the role of organic solvent in these systems, it was calculated the solubility parameter and the diffusion coefficients organic solvent/water and water/organic solvent to the three pairs evaluated in this work. It was seen that the solubility parameter and diffusion coefficient organic solvent/water explain the same diameter of the nanocapsules, even the change on the organic solvent. Even so, it was done a viscosity study, as a function of log [PCL], to organic phases prepared with acetonitrile and 1,4-dioxane. It was obtained a value of 2,30 mg mL⁻¹ to the critical aggregation concentration to the 1,4-dioxane solvent, and the value of 10,47 mg mL⁻¹ to the acetonitrile solvent. So, it can be said that this high value found for acetonitrile is an advantage in its use, since the nanoscopic characteristics are maintained and a larger number of nanoparticles can be formed.

Keywords: nanospheres, nanocapsules, flow rate, organic solvent, nanoparticle size, factorial study, critical aggregation concentration.

Os tratamentos clínicos tradicionais visam à utilização do fármaco na sua forma livre, seja por administração tópica, oral, parenteral ou oftálmica. Dentre os efeitos adversos relatados, destacam-se a baixa absorção do mesmo por parte do organismo, sua ação inespecífica e a sua liberação rápida, diminuindo o seu efeito terapêutico (SAHOO et al., 2003). Visando driblar estas desvantagens, a nanotecnologia farmacêutica vem se destacando nos últimos anos, com os sistemas de liberação controlada de compostos biologicamente ativos (COUVREUR et al., 2006).

Dentre os sistemas de liberação controlada já desenvolvidos, ganham destaque nas últimas décadas as nanopartículas poliméricas, devido às suas potencialidades terapêuticas e à maior estabilidade nos fluidos biológicos e durante o armazenamento (SCHAFFAZICK et al., 2003). A encapsulação de fármacos nestas nanopartículas podem também protegê-lo frente à degradação enzimática, química ou imunológica (BARRAT et al., 2000).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que possuem diâmetro médio inferior a 1 μm , podendo ser nanocápsulas ou nanoesferas, diferenciando-se entre si segundo sua estrutura organizacional. As nanocápsulas são carreadores vesiculares constituídos por um núcleo oleoso envolto por um polímero biodegradável, enquanto que as nanoesferas não possuem este núcleo (SCHAFFAZIK et al., 2003; JAGER et al., 2009). Essas nanopartículas poliméricas, nanocápsulas ou nanoesferas, podem ser preparadas por dois grupos diferentes de métodos, que são: polimerização *in situ* de monômeros dispersos (GALLARDO et al., 1993) e precipitação de polímeros pré-formados. Dentro deste último grupo, citam-se três métodos: emulsificação-difusão (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998), nanoprecipitação, também conhecido como deslocamento de solvente, e deposição interfacial de polímero (FESSI et al., 1989).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma nova classe de nanocápsulas, conhecidas como nanocápsulas de núcleo lipídico (NCL), que diferem das tradicionais pela adição de um tensoativo de baixo balanço lipofílico-hidrofílico, o monoesterato de sorbitano (MS). A presença deste tensoativo, além de estabilizar de forma mais eficiente a partícula, aumenta a viscosidade do núcleo oleoso. Assim, a liberação do fármaco é ainda mais controlada, devido à diminuição da permeabilidade do fármaco encapsulado frente à barreira polimérica (VENTURINI et al., 2011; JAGER et al., 2009). VENTURINI e col. (2011) verificaram a fração ótima de componentes para a obtenção exclusiva de nanocápsulas de núcleo lipídico, como sendo de 1:4,1:2,6 para monoesterato

de sorbitano, triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (TCC) e o polímero, poli(ϵ -caprolactona) (PCL), respectivamente, utilizando a acetona como solvente orgânico.

Mais comumente, estas nanocápsulas são preparadas segundo o método de nanoprecipitação, que consiste na preparação de uma fase orgânica que será vertida em uma fase aquosa. Este método apresenta algumas vantagens em relação aos demais, pois sua preparação consiste em uma única etapa, formando as nanocápsulas de forma instantânea, sendo conhecido como um método rápido e sem a necessidade de instrumentação específica (SANSON et al., 2009).

A partir deste método, obtêm-se partículas de tamanho médio entre 50 e 300 nm. O tamanho de partícula que se deseja obter está diretamente relacionado com a finalidade para o qual será utilizado este carreador, podendo variar, para tanto, parâmetros experimentais, como: polímero selecionado, assim como a sua massa molecular, solvente orgânico utilizado, concentração dos componentes na fase orgânica e fluxo de injeção da fase orgânica para a fase aquosa. Assim, percebe-se a importância do estudo e avaliação destes parâmetros experimentais, para controle de diâmetro e dispersão das nanocápsulas de núcleo lipídico, além de avaliação da sua estabilidade física (SANSON et al., 2009).

Dessa forma, propusemos avaliar a influência na caracterização físico-química de dois parâmetros experimentais na preparação de suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico: o fluxo de injeção da fase orgânica para a fase aquosa e o solvente orgânico utilizado na preparação da fase orgânica, tendo em vista que estes parâmetros ainda não foram avaliados para as nanocápsulas de núcleo lipídico, que se caracterizam por serem obtidas por auto-organização a partir de uma solução orgânica dos materiais injetada em uma solução micelar de polissorbato 80 (JORNADA et al., 2012).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sistemas de liberação controlada de fármacos

O controle da liberação de fármacos em sítios de ação específicos têm sido alvo de um grande número de publicações nos últimos anos. Estes sistemas visam à liberação do fármaco no sítio de ação específico (tecido, célula ou órgão), possibilitando maior absorção, menor número de efeitos colaterais devido a ação inespecífica e uma liberação mais lenta no organismo, podendo aumentar o efeito terapêutico, representando, assim, uma estratégia diferenciada, seja para administração tópica, oral, parenteral ou oftálmica (BARRATT et al., 2000; COUVREUR et al., 2006; JAGER et al., 2007; VILLANOVA, J. et al., 2010). Dentre os sistemas estudados, recebem maior destaque os sistemas micro e nanoestruturados, compostos principalmente de lipídeos e polímeros biodegradáveis (BARRATT et al., 2003).

De uma forma geral, os sistemas de liberação nanoestruturados possuem vantagens em relação aos sistemas convencionais, podendo citar: maior eficácia terapêutica com liberação progressiva e controlada do fármaco; redução da toxicidade; maior tempo de permanência na circulação; redução na dosagem e no número de doses administradas, se tornando mais econômico, seguro e facilitando a adesão por parte dos pacientes; e direcionamento deste ativo ao sítio de ação específico (GUTERRES et. al., 2007; TEDESCO et. al., 2007).

Estas vantagens relatadas na literatura referente a estes sistemas estão relacionados à versatilidade destes, uma vez que agentes terapêuticos de diferentes naturezas químicas e biológicas podem ser encapsulados, dispersos e/ou dissolvidos; bem como seu tamanho reduzido, permitindo que penetrem com maior facilidade até o sítio de ação. Os sistemas que atendem a estas características e que são alvo constante de pesquisas são: os lipossomas (FARRAT et al., 2001), as nanopartículas lipídicas sólidas (MULLER et al., 2007; SOUTO et al., 2011), as micelas poliméricas (VILLANOVA et al., 2010; FRANCIS et al., 2004) e as nanopartículas poliméricas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

2.2. Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas são sistemas de liberação controlada de fármacos com diâmetro médio inferior a 1 μm , que apresentam distribuição de tamanho estreita e monomodal (SAHOO e LABHASETWAR, 2003; SOPPIMATH et al., 2001; GUTERRES et al., 2010; DE MELO et al., 2011). Estes sistemas possuem vantagens, comparando-as aos demais, como a alta capacidade de carga de fármaco, a proteção do fármaco

incorporado frente à degradação, promovendo maior estabilidade nos fluidos biológicos e durante o armazenamento e o potencial de modificação de superfície por meio de transformações químicas (RONEY et al., 2005; VAUTHIER et al., 2006; KULKAMP et al., 2009; VENTURINI et al., 2011).

As nanopartículas poliméricas podem se apresentar de duas formas, nanoesferas ou nanocápsulas, diferenciando-se na sua estrutura morfológica. As nanoesferas são sistemas matriciais, constituídas por uma matriz polimérica, onde o fármaco fica retido ou adsorvido. As nanocápsulas diferem das nanoesferas por apresentarem um núcleo oleoso, sendo conhecidas então como sistemas vesiculares, onde o fármaco pode ficar adsorvido na parede polimérica e\ou dissolvido no núcleo (SCHAFFAZICK et al., 2003; SOPPIMATH et al., 2001; GUTERRES et al., 2007; GUTERRES et al., 2010).

Para a preparação destas nanopartículas, os métodos mais utilizados são baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (MONTASER et al., 2000; GALLARDO et al., 1993) e na precipitação de polímeros pré-formados (FESSI et al., 1989), incluindo, neste último, a emulsificação-difusão (QUINTANAR-GUERRERO et. al, 1998), a nanoprecipitação e deposição interfacial de polímero (FESSI et. al., 1989). Este último é amplamente utilizado devido a sua simplicidade e reprodutibilidade (SCHAFFAZICK et al., 2003), podendo ser aplicado a diversos grupos de matérias-primas. O método consiste em dissolver os constituintes das nanopartículas, o óleo, lipídeo líquido, quando estas forem nanocápsulas, o polímero, o tensoativo e a substância ativa em um solvente orgânico miscível em água. Esta fase orgânica é injetada em uma fase aquosa previamente preparada, contendo, além de água, um agente anticoagulante. Estas nanopartículas se formam espontaneamente, pela rápida difusão do solvente orgânico na água, de maneira que os constituintes destas partículas, por não serem solúveis em água, se auto-estruturam em uma fase dispersa. Posteriormente, o solvente orgânico é eliminado desta suspensão aquosa e a formulação é então concentrada com auxílio de um evaporador rotatório.

Diversos polímeros vêm sendo estudados como constituintes destas nanopartículas, sendo importante que sejam biocompatíveis e biodegradáveis, pois, desta forma, sofrerão degradação macromolecular *in vivo* por ação de microorganismos, enzimas e\ou células, não prejudicando a ação do fármaco e não apresentando nenhum efeito colateral acoplado ao seu uso (VILLANOVA et al., 2010). Relata-se a utilização de polímeros naturais, como albumina, quitosana e gelatina (LIU et. al., 2005;

SANTANDER-ORTEGA et. al., 2010), semi sintéticos ou sintéticos, sendo este último o mais utilizado (LAMPRECHT et al., 2000). Dentre a classe polimérica mais utilizada, destacam-se o poli(ácido lático) (PLA), o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) e a poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (RONEY et al., 2005). A poli(ϵ -caprolactona) é um polímero pertencente a classe dos poliésteres, semi cristalino, de degradação lenta, apresentando também características como biocompatibilidade e biodegradabilidade, se destacando como constituinte no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas (SINHA et al., 2004).

O componente lipofílico líquido (óleo) também se mostra um importante constituinte das nanopartículas, devendo apresentar características como alta estabilidade físico-química, ausência de toxicidade e alta afinidade química com o fármaco, podendo, assim, aumentar a quantidade deste encapsulada. Os óleos que apresentam estas características e vêm sendo amplamente utilizados com esta finalidade são os triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico, o óleo mineral e o metoxicinamato de octila (DE MELO et al., 2011). DE MELO et. al., demonstraram que a utilização de óleo mineral como componente lipofílico líquido em nanocápsulas de benzocaína promoveu o aumento da estabilidade física destas partículas, perfil de liberação mais lento, e aumento da atividade local do fármaco, comparando com outros dois óleos, miristato de isopropila e oleato de decila.

A presença de tensoativos nestas suspensões aquosas se mostra um importante parâmetro para maior estabilidade durante tempo de armazenamento, evitando aglomeração destas partículas (MOSQUEIRA et al., 2000).

A caracterização físico-química destas partículas, que inclui determinação de tamanho e polidispersão, morfologia (MET e MEV), rastreamento de partícula e teor de encapsulação é influenciada pelo método de preparação e pela composição quali e quantitativa destas suspensões, podendo alterar também estudos *in vitro* e *in vivo*. Dependendo da finalidade para o qual o sistema será utilizado, se mostra relevante o controle de tamanho e polidispersão destas partículas, e, para isso, pode-se variar os constituintes e/ou sua concentração na fase orgânica, o solvente orgânico utilizado, e também o fluxo de injeção de uma fase na outra.

2.3. Nanocápsulas de núcleo lipídico

Recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma nova classe de nanopartículas poliméricas, as nanocápsulas de núcleo lipídico, que diferenciam-se das tradicionais por possuírem, em seu núcleo, um lipídio sólido, o monoestearato de sorbitano, dissolvido no óleo tradicionalmente utilizado, os triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (JAGER et al., 2009; VENTURINI et al., 2011). Sua presença no núcleo destas partículas foi demonstrada por calorimetria exploratória diferencial (DSC) (MULLER et. al., 2001), por espalhamento de raios-X a baixo ângulo (CRUZ et. al., 2006b), por cinética de liberação comparando diferentes viscosidades do núcleo (JAGER et. al., 2009) e por microscopia de força atômica (MFA) (FIEL et. al., 2011).

O monoestearato de sorbitano é um tensoativo não-iônico biodegradável derivado de um ácido graxo natural. Ele é comumente utilizado como componente lipofílico sólido combinado ao componente lipofílico líquido, como as nanocápsulas poliméricas desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa, mas também pode ser combinado a outros lipídeos líquidos, como o óleo mineral (POHLMANN et. al, 2002; DE MELO et. al., 2011) e metoxicinamato de octila (DE MARCO et. al., 2009).

A grande vantagem de sua utilização gira em torno do fato de que, a presença deste lipídio sólido no núcleo tem a capacidade de aumentar a quantidade de fármaco lipofílico encapsulado (GUTERRES et al., 2010; VENTURINI et al., 2011), além de aumentar a proteção do mesmo frente à degradação. Comparando às nanocápsulas tradicionais, as nanocápsulas de núcleo lipídico possuem diferentes características morfológicas e funcionais (FIEL et. al., 2011) e também diferenciam-se na cinética de liberação *in vitro* (CONTRI et. al., 2010).

Venturini e colaboradores (2011) obtiveram a proporção ótima das matérias-primas constituintes destas nanocápsulas poliméricas, de maneira a obter apenas este tipo de carreador, como sendo de 1:4,1:2,6 de monoestearato de sorbitano (MS), triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (TGCC) e do polímero, poli(ϵ -caprolactona) (PCL), respectivamente.

2.4. Design fatorial

O design fatorial é uma ferramenta de planejamento experimental bastante empregada em diversos segmentos da pesquisa científica. Sua utilização tem como objetivo otimizar o número de experimentos a serem realizados, chegando a resultados

satisfatórios, se tornando uma ferramenta econômica e eficiente, diminuindo também o tempo despendido com experimentos.

O planejamento realizado estará diretamente relacionado com a realidade do pesquisador, do número de variáveis independentes e dependentes selecionadas e também do software matemático que têm-se disponível. Existem diversos softwares disponíveis no mercado, devendo encontrar aquele que vai se adequar melhor ao planejamento realizado.

O preparo de nanocarreadores, formados tanto por lipídeos, como as nanopartículas lipídicas sólidas, quanto por polímeros biodegradáveis, como as nanopartículas poliméricas, envolve um elevado número de variáveis experimentais. Estas variáveis irão gerar diferenças na caracterização físico-química destas partículas, podendo apresentar diferenças na estabilidade física, no diâmetro e distribuição de diâmetro, no potencial de superfície (potencial zeta), nos valores de pH obtidos, entre outros.

Desta forma, observa-se a importância do estudo fatorial no segmento da nanotecnologia farmacêutica, visando a otimização do número de formulações a serem preparadas, podendo controlar o diâmetro e distribuição de diâmetro das partículas, bem como sua estabilidade frente ao tempo de armazenamento, apresentando relevância nos estudos *in vitro* e *in vivo*, e, posteriormente, nos estudos clínicos.

BEI e colaboradores (2009) estudaram três variáveis independentes, quantidade de lipídeo, de polímero e de dacarbazina (fármaco utilizado no tratamento de melanoma) no preparo de cubossomos, um nanocarreador muito utilizado quando estuda-se a encapsulação de ativos hidrofílicos. Segundo um estudo fatorial de design 3^3 , as variáveis dependentes relatadas pelos autores foram a quantidade de ativo encapsulada e o tamanho de partícula, denominadas de Y_1 e Y_2 , respectivamente. Assim, após o preparo de 15 diferentes formulações, os autores observaram o diâmetro de partícula em um intervalo de 110 a 227 nm e a eficiência de encapsulação de 0,1 a 38%.

A utilização do design fatorial como ferramenta de investigação também se mostrou importante para DAS e colaboradores (2011) na preparação de nanopartículas lipídicas sólidas, para encapsulação de um ativo hidrofílico, que apresenta atividade anti-câncer, o tretinoín. Os efeitos das variáveis do processo, como tempo de homogeneização, tempo de sonicação, concentração e tipo de surfactante, concentração e tipo de lipídeo, foram avaliados segundo um design fatorial, onde as variáveis dependentes estudadas

foram o diâmetro de partícula, o índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação. O objetivo principal relatado pelos autores foi a seleção de uma formulação que apresentasse a maior eficiência de encapsulação, o qual foi alcançada em 94%. Dessa forma, concluíram o quão importante se mostrou modelar o estudo utilizando um design fatorial, sendo possível avaliar as variáveis do processo de forma quali e quantitativa, chegando ao resultado desejado.

Para as nanopartículas poliméricas, o design fatorial também foi utilizado por alguns autores. POLETTO e colaboradores (2009) estudaram duas diferentes variáveis independentes, velocidade de agitação e volume de etanol da fase orgânica, em três diferentes níveis, no preparo de nanoesferas de PCL pelo método de emulsificação-difusão. Foram avaliados o diâmetro de partícula e o índice de polidispersão, chamadas de Y_1 e Y_2 , respectivamente, nas formulações preparadas segundo um design 3^2 . Segundo os autores, quando utilizado a maior velocidade de agitação e a maior quantidade de etanol na fase orgânica, o diâmetro de partícula, assim como o índice de polidispersão, foram os menores observados para a série preparada, sendo, então, formulações consideradas mais homogêneas, com distribuição mais estreita. Assim, através de um design fatorial, foi possível a seleção de formulações com objetivos desejados pelos autores com um menor número de experimentos.

2.5. Influência de parâmetros experimentais no diâmetro e distribuição de diâmetro de nanopartículas poliméricas

Existem alguns trabalhos na literatura que buscam investigar e avaliar os parâmetros experimentais envolvidos no preparo de nanopartículas poliméricas, principalmente no que se refere ao diâmetro e homogeneidade granulométrica destas partículas. Esta variável mostra-se importante porque está relacionada com a habilidade destas partículas de cruzar barreiras biológicas de forma seletiva, conseguindo atingir os sítios de ação específicos, podendo ser células, tecidos ou órgãos (JORNADA et. al., 2012). Relata-se na literatura três parâmetros que estão recebendo maior destaque no número e qualidade de publicações, que são: influência da viscosidade da fase orgânica, do fluxo de injeção da fase orgânica para a fase aquosa e do solvente orgânico utilizado no preparo da fase orgânica.

2.5.1. Viscosidade da fase orgânica

A concentração de materiais na fase orgânica está diretamente relacionada com a viscosidade desta fase, sendo maior quanto maior for a quantidade de materiais utilizada na sua preparação. Acredita-se que a produção de nanopartículas poliméricas com controle de diâmetro e distribuição unicamente nanoscópica, está relacionada com o estado de agregação das matérias-primas da fase orgânica.

LEGRAND e colaboradores (2007) estudaram a influência da viscosidade, e, por conseqüência, do estado de agregação dos materiais, no controle de diâmetro e distribuição de nanoesferas, um sistema matricial, formado pelo mecanismo conhecido como nucleação. Os autores relatam a importância desta variável nesta avaliação, conseguindo determinar a concentração de agregação crítica para as nanoesferas.

Quando a supraestrutura molecular destas partículas é mais complexa, como as nanocápsulas de núcleo lipídico, que são sistemas vesiculares e não matriciais como as nanoesferas, formadas por um mecanismo diferente daquele proposto para o sistema matricial, poderia ser observado os mesmos resultados daqueles já relatados.

Com este objetivo, JORNADA e colaboradores (2012) estudaram a influência da viscosidade da fase orgânica no diâmetro e homogeneidade de suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico. Preparando a fase orgânica utilizando a proporção já estabelecida (VENTURINI et. al., 2011), em diferentes quantidades, e acetona como solvente orgânico, a concentração de agregação crítica foi determinada como sendo de 4,38 mg mL⁻¹. Os autores relatam que, em uma concentração de materiais menor do que a crítica, as cadeias poliméricas estão livres, em um regime diluído, assim, a distribuição unicamente nanoscópica para as suspensões é atingida. Quando a fase orgânica é preparada em uma concentração maior do que a estabelecida, este regime diluído é perdido, e as cadeias poliméricas já não estão mais livres, observando, então, uma distribuição também microscópica, mostrando a importância do controle da concentração no diâmetro e distribuição destas suspensões. Cabe salientar que este estudo foi realizado utilizando acetona como solvente orgânico, sendo que esta concentração crítica pode se manter ou não, quando o solvente orgânico puder ser modificado.

2.5.2. Fluxo de injeção

O fluxo de injeção é um parâmetro experimental importante na formação de nanopartículas poliméricas, mas, até o momento, o número de publicações envolvendo esta

variável é reduzido. Este parâmetro está relacionado com a velocidade em que a fase orgânica é vertida para a fase aquosa, com auxílio dos mais diversos dispositivos, com o objetivo de verificar como sua variação pode influenciar nas mais diferentes técnicas de caracterização físico-química.

É relatada a importância do controle de diâmetro e distribuição de diâmetro (homogeneidade) destas partículas, pois seu controle está relacionado com a habilidade que elas terão de atravessar barreiras biológicas, e, mais importante ainda, de forma seletiva, que é o que se espera dos sistemas de liberação de fármacos (JORNADA et. al. 2012, LINCE et. al., 2008; MOLPECERES et. al., 1995). Com o objetivo de estudar este parâmetro, alguns artigos merecem destaque.

MOLPECERES e colaboradores (1995) avaliaram alguns parâmetros experimentais na formação de nanoesferas de PCL, sem a presença de óleo em sua formulação, de ciclosporina (fármaco associado ao sistema imunossupressor). Estes parâmetros, temperatura da fase aquosa, volume de solvente da fase orgânica (acetona), quantidade de polímero e de surfactante e, por fim, o fluxo de injeção da fase orgânica para a fase aquosa, foram avaliados através de um design fatorial, resultando em 54 diferentes formulações. O fluxo de injeção, citado pelos autores como a variável de maior interesse, foi modificado variando o diâmetro da agulha e também a vazão de gás nitrogênio segundo um dispositivo previamente elaborado, em um intervalo de 6 a 272 mL min⁻¹.

Após a caracterização físico-química destas partículas, os autores observaram que o fluxo de injeção influenciou no diâmetro e na distribuição de tamanho das nanoesferas, em um intervalo de 113 a 215 nm, sendo o menor diâmetro e a maior homogeneidade no maior fluxo de injeção avaliado. Além da influência nos valores de diâmetro, foi observado também influência na eficiência de encapsulação do fármaco avaliado, sendo maior o teor de ativo encapsulado no menor fluxo de injeção avaliado, com uma diferença de, aproximadamente, 8%. Os autores concluem citando que o fluxo de injeção foi o parâmetro de maior relevância observado no estudo, principalmente pela possibilidade de encapsular maior quantidade de fármaco.

Em um segundo trabalho, LINCE e colaboradores (2008) estudaram a variação da massa molar e da concentração do polímero PCL e também do fluxo de injeção, na formação de nanoesferas poliméricas brancas, ou seja, sem a presença do fármaco,

partículas formadas apenas pelo polímero e o tensoativo, através do método de nanoprecipitação. O intervalo de fluxo de injeção avaliado foi de 3 a 120 mL min⁻¹.

Após caracterização físico-química, analisando apenas o parâmetro fluxo de injeção, os autores relatam que houve diferença novamente no diâmetro de partícula, obtido através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (PCS), variando de 100 a 600 nm, com distribuição estreita e monomodal. Os autores citam as três etapas responsáveis pela formação das partículas como sendo a nucleação, o crescimento molecular e a agregação, que governam o diâmetro final de partícula segundo a equação 1, delineada para o caso de uma esfera.

$$J = \frac{2D}{d^5} \exp\left(\frac{-16 \pi \gamma^3 \tau^2}{3 k^3 T^3 [\ln(S)]^2}\right) \quad (\text{Equação 1})$$

onde J é a taxa de nucleação (m/s), D é o coeficiente de difusão molecular do polímero, d é o diâmetro de partícula, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta (K), γ é a tensão interfacial entre as partículas já formadas e a solução, τ é o volume molecular do polímero.

Observando a equação 1, pode-se ver a relação existente entre a taxa de nucleação e o diâmetro de partícula, que é inversamente proporcional. Neste caso, verificou-se no estudo experimental o que é relatado teoricamente, ou seja, maiores taxas de nucleação, alcançado em maiores fluxos de injeção, levam a menores diâmetros de partícula.

CHACÓN e colaboradores (1996) também estudaram a formação de nanoesferas poliméricas de ciclosporina A, desta vez utilizando o polímero poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), através do método de nanoprecipitação, também conhecido como deslocamento de solvente. As variáveis envolvidas neste estudo foram o fluxo de injeção da fase orgânica para a fase aquosa, assim como o diâmetro da agulha e também a concentração de polímero. Assim como mencionado nos trabalhos citados, o diâmetro de partícula observado aumentou quando avaliado o menor fluxo de injeção. Neste caso, a eficiência de encapsulação do ativo avaliado foi maior quando utilizado o maior fluxo de injeção, ao contrário do resultado obtido por Molpeceres e colaboradores (1995). Os autores citam que isso deve-se ao fato de que, apesar das partículas apresentarem um tamanho reduzido se comparado às formadas pelo menor fluxo de injeção, elas se

apresentam em maior número, possibilitando uma maior quantidade de ciclosporina encapsulada.

2.5.3. Solvente orgânico

A seleção do solvente orgânico utilizado no preparo da fase orgânica para preparação de nanopartículas poliméricas, quando obtidas através do método de nanoprecipitação, é de extrema importância e deve seguir alguns critérios importantes, como: baixa toxicidade, tendo em vista a posterior administração terapêutica; solubilidade total em água, considerada o não solvente, critério que, se não atingido, irá influenciar negativamente na formação das partículas; ponto de ebulição, que deve ser igual ou inferior ao da água, visando sua eliminação ao final do processo; e, ainda, este solvente deve solubilizar todos os componentes presentes na fase orgânica (GALINDO et. al., 2004; CHIEWPATTANAKUL et. al., 2010).

Tratando-se do método de nanoprecipitação ou deslocamento de solvente, a acetona é o solvente orgânico mais largamente empregado nestes sistemas, devido a sua baixa toxicidade, solubilidade total em água, baixo custo e eliminação fácil e rápida devido ao seu baixo ponto de ebulição (CHORNY et. al., 2002). Sendo assim, a utilização de outros solventes orgânicos neste método de preparação recebe pouca atenção por parte dos pesquisadores.

GALINDO e colaboradores (2004) utilizaram o polímero [poli(metacrilato de metila)] (PMMA) como matriz na preparação de nanoesferas. Neste estudo, foram avaliados diferentes solventes orgânicos, entre eles acetona, álcool isopropílico e etílico e dimetilsulfóxido (DMSO) na preparação destas partículas, avaliando o comportamento destes solventes, assim como possíveis variações em sua caracterização físico-química. Foi observado pelos autores diferentes diâmetros de partícula, variando de 79 a 178 nm, dependendo do solvente orgânico utilizado, sendo que o álcool etílico apresentou o menor diâmetro de partícula.

Buscando uma explicação para o resultado encontrado e considerando a importância da interação solvente/não solvente nas diferenças de diâmetro de partícula observada pelos autores, foi procedido o cálculo de dois parâmetros teóricos, o parâmetro de solubilidade e o parâmetro de interação para os pares solvente/não solvente avaliados pelos autores. Estes dois parâmetros expressam a afinidade química entre duas

substâncias, sendo maior quanto menor a diferença encontrada. Assim sendo, o álcool etílico apresentou o menor valor teórico, corroborando com o resultado obtido experimentalmente, confirmando a importância da interação solvente/não solvente no diâmetro final de partícula.

Utilizando o mesmo método de preparação, mas empregando o PLA (poli ácido láctico) como matriz, CHIEWPATTANAKUL e colaboradores (2010) avaliaram dois diferentes solventes orgânicos, acetona e tetrahidrofurano (THF) no preparo de sistemas matriciais poliméricos, não observando variações na caracterização físico-química. Os autores citam que os solventes orgânicos atuaram apenas como veículos no preparo das formulações, não podendo modificar a caracterização físico-química destes sistemas, e, por isso, não foram observadas diferenças quando o solvente foi variado.

JEONG e colaboradores (2003) estudaram a preparação de nanoesferas poliméricas, utilizando o copolímero poli(ϵ -caprolactona) (PCL) / poli(etilenoglicol) (PEG) e o ativo trans-ácido retinóico (atRA), através do método de deslocamento de solvente. Após a preparação, utilizando acetona e tetrahidrofurano (THF) como solventes orgânicos, foi realizada a caracterização físico-química destas partículas. Os autores relatam a observação da variação do diâmetro de partícula quando houve a variação do solvente orgânico, sendo o maior diâmetro quando utilizado o THF. Além desta observação, os autores citam a variação na eficiência de encapsulação na variação do solvente, sendo que com acetona este valor foi maior, em cerca de 8%, se comparado com o THF. Assim sendo, os autores concluem que a acetona se mostrou o melhor solvente orgânico para o par ativo/copolímero avaliado.

A partir do exposto, pode-se observar que a avaliação destes dois parâmetros experimentais, solvente orgânico e fluxo de injeção, se mostra relevante para posterior aplicação destes sistemas, assim como avaliar a viscosidade das fases orgânicas quando há a variação do solvente orgânico, principalmente quando trata-se do diâmetro médio e distribuição de diâmetro destas suspensões. Apesar de seu recente desenvolvimento e avaliação *in vitro* e *in vivo*, as suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico já se mostram bastante promissoras, podendo ainda ampliar sua utilização e posterior aplicação avaliando, também para elas, estes parâmetros experimentais acima descritos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho é investigar a influência do fluxo de injeção, da fase orgânica para a fase aquosa, e do solvente orgânico utilizado na preparação da fase orgânica na caracterização físico-química de suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico, utilizando, para tanto, um modelo fatorial. Adicionalmente, propõe-se estudar de forma mais detalhada os solventes orgânicos avaliados neste trabalho.

3.2. Objetivos específicos

- * Aprender a manusear a bomba peristáltica, modelo Miniplus 3, com o intuito de variar o fluxo de injeção no preparo das formulações;
- * Verificar e definir os fluxos de injeção possíveis para o sistema em estudo;
- * Preparar suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo poli(ϵ -caprolactona) (PCL), monoestearato de sorbitano (lipídeo sólido) e triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (lipídeo líquido), utilizando acetona como solvente orgânico, nos fluxos de injeção previamente definidos;
- * Preparar suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo poli(ϵ -caprolactona) (PCL), monoestearato de sorbitano (lipídeo sólido) e triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (lipídeo líquido), utilizando acetonitrila e 1,4-dioxano como solventes orgânicos no preparo da fase orgânica, com auxílio de um funil;
- * Preparar suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo poli(ϵ -caprolactona) (PCL), monoestearato de sorbitano (lipídeo sólido) e triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (lipídeo líquido), utilizando acetonitrila e 1,4-dioxano como solventes orgânicos no preparo da fase orgânica, nos fluxos de injeção selecionados no estudo fatorial;
- * Proceder com a caracterização físico-química das formulações preparadas, segundo: diâmetro e distribuição de diâmetro, através das técnicas de difração de laser e espalhamento de luz dinâmico; avaliação da estabilidade física destas suspensões; monitoramento de pH; rastreamento de partícula; e análises de potencial de superfície (potencial zeta);

* Avaliar, de maneira mais detalhada, o comportamento dos solventes orgânicos acetonitrila e 1,4-dioxano frente ao sistema otimizado, procedendo com análises de viscosidade das fases orgânicas preparadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Matérias-primas

- * Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) $M_n = 14.000$ g/mol (Aldrich, França);
- * Monoestearato de sorbitano (Span 60) (Delaware – Brasil);
- * Triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (TGCC) (Delaware – Brasil);
- * Polissorbato 80 (Delaware – Brasil)

4.1.2. Aparelhos e equipamentos

4.1.2.1. Laboratório de Micro e Nanopartículas aplicadas na Terapêutica, coordenado pela professora Adriana R. Pohlmann, IQ/UFRGS:

- * Evaporador rotatório Buchi RE120 (Suíça);
- * Placa de agitação magnética com 15 pontos Velp (Europa);
- * Dispositivo de aquecimento e circulação de água, acoplado a termostato IKA EH4 (Alemanha);
- * Potenciômetro Micronal B-474;
- * Turbiscan LabExpert (Formulacion, Toulouse, França);
- * Bomba peristáltica, modelo Miniplus MP3, marca Gilson;
- * Nanosight LM10 & NTA 2.0 Analytical Software

4.1.2.2. Laboratório de Sistemas Nanoestruturados para a Administração de Fármacos, coordenado pela professora Sílvia S. Guterres, Faculdade de Farmácia/UFRGS:

- * Zetasizer Nanoseries (Malvern, Reino Unido) – análises pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons;
- * Mastersizer Nanoseries (Malvern, Reino Unido) – análise pela técnica de difração de laser;

* Viscosímetro Vibro Viscometer – modelo SV-10 (A & D, Japão);

4.1.2.3. Instituto de Química – UFRGS:

* ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corporation, Estados Unidos) análises pela técnica de eletroforese;

4.1.3. Solventes e outros materiais

* Acetonitrila grau HPLC (Tedia – USA);

* Acetona (Nuclear – Brasil);

* 1,4-Dioxano (Synth – Brasil);

* Água Milli-Q (Destilador/deionizador Milliq-Q – Millipore – EUA)

4.2. Métodos

4.2.1. Preparação das suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico

4.2.1.1. Fluxo de injeção

As suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico, também chamadas de formulações, foram preparadas conforme método descrito na literatura (JAGER et al., 2009) baseado na auto-organização das nanoestruturas (JORNADA et al., 2012). A fase orgânica foi preparada dissolvendo-se 0,1000 g do polímero, poli(ϵ -caprolactona), 0,1600 g de triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico e 0,0380 g do componente sólido, o monoestearato de sorbitano (SPAN 60), em 27 mL de acetona PA, conforme condição otimizada previamente por VENTURINI e col. (2011). A fase aquosa foi preparada dissolvendo-se 0,0770 g do tensoativo Polissorbato 80 (TWEEN 80) em 53 mL de água ultrapura.

Então, a fase orgânica foi vertida na fase aquosa sob diferentes fluxos de injeção, utilizando-se uma Bomba Peristáltica (modelo Miniplus MP3), acoplada a um tubo peristáltico de PVC, com diâmetro de 3,16 mm, como mostra a figura abaixo (Figura 1). A este tubo, por sua vez, foi adaptado uma ponteira com diâmetro de saída de 0,5 mm, a fim de obter apenas partículas de tamanho nanométrico. Os fluxos de injeção avaliados, em um intervalo possível para o sistema utilizado, foram de 5, 8, 12, 15, 21 e 38 mL min⁻¹, formulações chamadas de NCL F1, NCL F2, NCL F3, NCL F4, NCL F5 e NCL F6, respectivamente, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1. Formulações nomeadas segundo o fluxo de injeção avaliado em sua preparação.

Formulações	Fluxo de injeção (mL min ⁻¹)
NCL F1	5
NCL F2	8
NCL F3	12
NCL F4	15
NCL F5	21
NCL F6	38

Após a injeção, a suspensão aquosa foi mantida em banho de água, na temperatura de 40 °C, sob agitação magnética constante, durante 10 minutos. Então, foram levadas ao evaporador rotativo para eliminação do solvente orgânico e do excesso de água, sob pressão reduzida a 40 °C.



Figura 1. Sistema utilizado para a variação do fluxo de injeção.

4.2.1.2. Solvente orgânico

As suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico também foram preparadas empregando-se acetonitrila ou 1,4-dioxano conforme descrito acima no sub item 4.2.1.1. O sistema utilizado para a injeção no estudo preliminar de solvente orgânico foi o mesmo que o utilizado no sub-item 4.2.1.1, mantendo alguns fluxos de injeção mencionados anteriormente. Quando necessário, as formulações também foram preparadas com o auxílio de um funil de injeção, conforme técnica de bancada amplamente utilizada.

Após a injeção, as suspensões aquosas foram mantidas em banho de água, sob 40 °C, em agitação magnética constante, por 10 minutos. Então, foram levadas ao

rotavapor para eliminação do solvente orgânico e do excesso de água, sob pressão reduzida. As formulações foram preparadas em duplicata.

4.2.2. Caracterização das suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico

As suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico foram caracterizadas segundo: diâmetro, distribuição de diâmetro e polidispersão, pelas técnicas de difração de laser e espectroscopia de correlação de fótons; estabilidade física; medidas potenciométricas; determinação da viscosidade da fase orgânica; rastreamento de partícula e análise morfológica.

4.2.2.1. Distribuição de diâmetro, diâmetro médio, polidispersão, Diâmetro médio e índice de polidispersão das NCL

4.2.2.1.1. Difração de laser

O diâmetro médio ($D[4,3]$), a distribuição de diâmetro e a polidispersão (SPAN) das nanocápsulas foram determinados pela técnica de difração de laser, utilizando o equipamento Mastersizer 2000. Nesta técnica, não há a necessidade de preparo de amostra, ela foi adicionada diretamente no recipiente. As distribuições de diâmetro de partícula, por número e por volume, foram obtidas pelo cálculo do valor médio de diâmetro de esfera equivalente ($D[4,3]$) conforme equação 2, assim como os valores de polidispersão (SPAN), conforme equação 3.

$$D[4,3] = \frac{\sum d^4}{\sum d^3}$$

(Equação 2)

$$SPAN = \frac{(D_{0,9} - D_{0,1})}{D_{0,5}}$$

(Equação 3)

Em que $D_{0,9}$ é o diâmetro que abrange 90% da curva de distribuição, $D_{0,1}$ é o diâmetro que abrange 10% das partículas de menor diâmetro sob a curva de distribuição e $D_{0,5}$ é o diâmetro que representa a mediana da curva de distribuição de diâmetros.

4.2.2.1.2. Espalhamento de luz dinâmico ou espectroscopia de correlação de fótons

As determinações de diâmetro médio (z-average), calculado através do método de correlação (Cumulants), e do índice de polidispersão, calculado através da equação 4, foram analisados por espectroscopia de correlação de fótons, no equipamento Zetasizer®. O preparo das amostras consistiu em sua prévia diluição em água milliQ®, utilizando membrana de 0,45 µm para filtração da água utilizada. As medidas foram realizadas em triplicata, com 7 varreduras, a 10 segundos cada.

$$PDI = \frac{\sigma^2}{Z^2} \quad (\text{Equação 4})$$

em que σ é o desvio padrão de uma gaussiana hipotética de distribuição e Z é o diâmetro (z-average).

4.2.2.2. Potencial zeta

As determinações de potencial zeta das formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico foram baseadas em mobilidade eletroforética, que depende da viscosidade, da constante dielétrica e do modelo selecionado no software, através do equipamento ZETAPALS (Brookhaven Instruments). As amostras foram preparadas diluindo as formulações 100 vezes (v:v) em uma solução de cloreto de sódio (NaCl) 10 mM, previamente filtrada com auxílio de membranas de 0,45 µm. Para cada medida, foram realizadas 5 varreduras.

4.2.2.3. Estabilidade física

A estabilidade física das suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico foi avaliada segundo a técnica de espalhamento múltiplo de luz, através do equipamento Turbiscan Lab®. Este equipamento fornece a transmissão ou o retroespalhamento de luz, através de varreduras da base ao topo da cubeta óptica. As várias varreduras realizadas, em função do tempo, permitem verificar possíveis fenômenos de instabilidade, pela leve alteração no sinal de transmissão ou de retroespalhamento (*backscattering*). Os fenômenos de instabilidade que podem ser visualizados são divididos em dois grupos: fenômenos de

migração, sedimentação ou cremagem, e fenômenos de variação de tamanho de partícula, floculação ou coalescência, conforme esquema da figura 2.

Para a realização das medidas, a cubeta óptica foi preenchida com 20 mL da formulação, sem a necessidade de diluição prévia. As amostras foram avaliadas durante uma hora, com varreduras feitas a cada 5 minutos, na temperatura de 25 C.

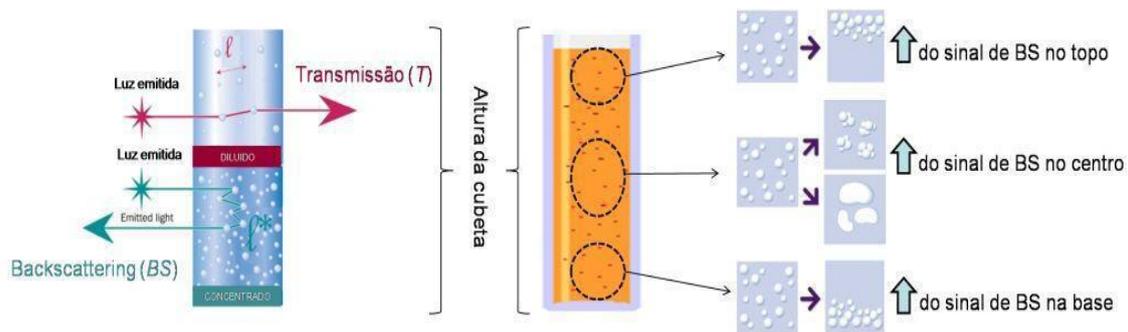


Figura 2. Esquema da interpretação dos fenômenos de instabilidade analisados por espalhamento múltiplo de luz empregando o equipamento Turbiscan Lab®.

4.2.2.4. Medidas potenciométricas

A determinação do pH das suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico foi realizado em potenciômetro calibrado com solução tampão de pH 4,0 e 7,0, sem preparo prévio das amostras.

4.2.2.5. Rastreamento de partícula

As suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico foram avaliadas individualmente e de forma simultânea, através de seu movimento browniano. As partículas são visualizadas por um microscópio óptico, no momento em que um laser entre em contato com as mesmas, gerando um vídeo. Então, a luz espalhada é analisada pelo software, pela Teoria de Mye, determinando seu diâmetro médio e distribuição de tamanho, além do número de partículas presente na formulação.

As amostras foram preparadas diluindo as formulações em água milliQ®, previamente filtrada, com auxílio de membranas de 0,45 μm . As diluições realizadas foram de 24.000, 27.000 e 30.000 vezes. Este rastreamento foi realizado apenas para as

formulações preparadas com acetona como solvente orgânico, com o objetivo de realizar um estudo da densidade de partículas (número de partículas por volume).

Para o cálculo do número de partículas por volume de formulação, foi realizado a multiplicação do número de partículas presente na diluição, determinada diretamente no equipamento, pela diluição realizada.

4.2.2.6. Viscosidade da fase orgânica

A análise da viscosidade das fases orgânicas foi realizada no viscosímetro vibracional com análises durante 60 segundos, com medidas a cada 5 segundos. A calibração prévia do equipamento foi realizada com o solvente orgânico utilizado no preparo da fase orgânica.

As análises de viscosidade foram realizadas somente com as fases orgânicas preparadas utilizando acetonitrila e 1,4-dioxano como solventes orgânicos, mantendo a concentração dos componentes, monoestearato de sorbitano, triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico e poli(ϵ -caprolactona) (PCL), conforme otimização realizada por VENTURINI e colaboradores (2011).

4.2.3. Cálculo do Número de Reynolds

Para a determinação do regime de escoamento das formulações preparadas segundo diferentes fluxos de injeção, como mencionado nos sub-itens descritos acima, o número de Reynolds (Re) foi determinado segundo a equação 5.

$$Re = D \cdot V_m \cdot \frac{\rho}{\eta} \quad (\text{Equação 5})$$

onde D é o diâmetro do tubo (m), V_m é a velocidade média de escoamento da fase orgânica (m/s), η (Pa.s) e ρ ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$) são a viscosidade e a densidade da fase orgânica, respectivamente.

As medidas de densidade das fases orgânicas foram determinadas utilizando o picnômetro, com capacidade de 25 mL, a temperatura ambiente, tendo como líquido de

referência a água. As medidas de viscosidade dinâmica foram realizadas no viscosímetro vibracional, a temperatura ambiente, com análises durante 60 segundos, com medidas a cada 30 segundos. A velocidade média de escoamento foi determinada tendo conhecimento do comprimento do tubo e do tempo em que o fluido (fase orgânica) leva para percorrer este tubo.

4.2.4. Cálculo dos parâmetros de solubilidade

Para as suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas segundo os diferentes solventes orgânicos avaliados neste trabalho, acetona, acetonitrila e 1,4-dioxano, foram calculados os valores teóricos de parâmetro de solubilidade, para cada par solvente\água, segundo a equação 6.

$$\Delta\delta_{\text{solvente}\backslash\text{água}} = [(\delta d, s - \delta d, a)^2 + (\delta p, s - \delta p, a)^2 + (\delta h, s - \delta h, a)^2]^{1/2}$$

(Equação 6)

onde:

$\delta d, s$ representa o componente das forças dispersivas, referente ao solvente orgânico;

$\delta d, a$ representa o componente das forças dispersivas, referente à água;

$\delta p, s$ representa o componente polar, referente ao solvente orgânico;

$\delta p, a$ representa o componente polar, referente à água;

$\delta h, s$ representa o componente das ligações de hidrogênio, referente ao solvente orgânico;

$\delta h, a$ representa o componente das ligações de hidrogênio, referente à água.

Os valores referente a cada um destes parâmetros, utilizados no cálculo da equação 6, estão dispostos na tabela 2.

Tabela 2. Valores referentes aos parâmetros de solubilidade dos solventes envolvidos neste cálculo.

Solvente	δd (MPa ^{1/2})	δp (MPa ^{1/2})	δh (MPa ^{1/2})
Acetona	15,5	10,4	7
Acetonitrila	15,3	18	6,1
1,4-dioxano	19	1,8	7,4
Água	15,5	16	42,3

* Valores retirados da dissertação de Lísias Pereira Novo, Universidade de São Paulo, 2012.

4.2.5. Cálculo da razão dos coeficientes de difusão

Para as suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas segundo os diferentes solventes orgânicos avaliados neste trabalho, acetona, acetonitrila e 1,4-dioxano, foram calculados os valores dos coeficientes de difusão, solvente/não solvente (D_{sa}) e não solvente/solvente (D_{as}), representados por D_{AB} , para cada par, segundo a equação 7.

$$D_{AB} = 8,93 \cdot 10^{-8} \left(\frac{V_A}{V_B^2} \right)^{1/6} \left(\frac{P_B}{P_A} \right)^{0,6} \left(\frac{T}{\eta_B} \right)$$

(Equação 7)

onde:

V_A e V_B representam os volumes molares, em mL mol⁻¹, dos componentes A e B, respectivamente;

P_A e P_B representam os valores de parachors, em mL g^{1/4} / s^{1/2} mol, para os componentes A e B, respectivamente;

T representa a temperatura, em K;

η_B representa a viscosidade dinâmica, em cP, do componente B.

Após, procedeu-se o cálculo da razão dos coeficientes de difusão, segundo a equação 8.

$$R = \frac{D_{sa}}{D_{as}} = \frac{\text{Difusão do solvente para a água}}{\text{Difusão da água para o solvente}}$$

(Equação 8)

4.2.6. Estudo de gradiente de densidade

A separação de partículas foi realizada utilizando um gradiente de sílica coloidal (Percoll® 54%, vv em NaCl 0,15 M) formada *in situ* durante ultracentrifugação com rotor PS28T (Hitachi CP70 MS, Japão) a 20 C, 45.000 x g por 60 minutos. Foram adicionados 0,4 mL da formulação, sem nenhum tratamento prévio, em 19,6 mL da solução preparada com Percoll® e NaCl. Para a calibração externa das bandas, em um tubo separado, Beads® de diferentes densidades pré-determinadas foram tratadas com as mesmas condições da amostra. As densidades foram calculadas a partir de uma curva, plotando a espessura do tubo versus a densidade de cada banda do marcador, totalizando uma curva com cinco pontos (JAGER et. al., 2009; VENTURINI et. al., 2011).

Este estudo foi procedido com as formulações preparadas com Acetonitrila e 1,4-Dioxano, na condição atingida no sub-item 4.2.2.6.

4.2.7. Análise morfológica

Para as formulações preparadas utilizando acetona como solvente orgânico, no menor e maior fluxo de injeção avaliados (5 e 38 mL min⁻¹), foi procedido a análise morfológica, no Centro de Microscopia Eletrônica, localizado na UFRGS.

Foram realizadas análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET), no equipamento MET JEM 1220.

4.2.8. Design fatorial

O design fatorial realizado neste trabalho, segundo os diferentes fluxos de injeção e solventes orgânicos empregados no preparo das formulações, foi modelado segundo o software Minitab 15®.

4.2.9. Análise estatística

Os resultados dos diâmetros de partícula obtidos segundo os diferentes fluxos de injeção e solventes orgânicos empregados no preparo das suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico foram analisados quanto à significância estatística por análises de variância univariada (ANOVA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Preparação e caracterização das suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico (NCL)

5.1.1. Fluxo de injeção

As suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico foram preparadas conforme método descrito na literatura (JAGER et al., 2009) baseado na auto-organização da nanoestrutura (JORNADA et al., 2012), segundo condição otimizada por VENTURINI e col. (2011) para os componentes em questão.

A fase orgânica foi vertida na fase aquosa segundo diferentes fluxos de injeção, de 5 a 38 mL min⁻¹, formulações nomeadas de NCL F1 a NCL F6, respectivamente, conforme sistema mencionado no sub-item 4.2.1.1. Todas as formulações apresentaram aspecto macroscópico homogêneo e leitoso, mostrando-se adequado para as suspensões preparadas, sendo preparadas em triplicata.

5.1.1.1. Distribuição de diâmetro, diâmetro médio, polidispersão, Diâmetro médio e índice de polidispersão das NCL

Os valores de diâmetro médio (D[4,3]), diâmetro de 50% das partículas em suspensão (d(0,5)) e a polidispersão (SPAM) obtidos pela técnica de difração de laser através do equipamento Mastersizer 2000 (Malvern, UK) e o diâmetro médio d(Z-average) obtido pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), através do equipamento Zetasizer Nano-ZS modelo ZEN 3600 (Malvern, UK), determinados para todas as formulações, mostraram-se monomodais e em escala nanométrica, para todos os fluxos de injeção em estudo (Tabela 1).

Cabe salientar que os valores de d(0,5) por número, obtidos pela técnica de difração de laser (Tabela 3), são menores do que 100 nm para todos os fluxos de injeção avaliados. Segundo a União Européia, através de uma norma publicada em outubro de 2011, as formulações preparadas são, então, consideradas nanomateriais, pois se enquadram na definição da Comissão Européia.

Tabela 3. Diâmetro de 50% das partículas por número ($d(0,5)$), diâmetro médio por volume ($D[4,3]$), polidispersão (SPAN), $d(z\text{-average})$ e PDI para as formulações preparadas usando-se acetona como solvente orgânico em diferentes fluxos de injeção.

Formulação	$d(0,5)$ (nm)	$D[4,3]$ (nm)	Polidispersão (SPAM)	$d(Z\text{-average})$ (nm)	PDI
NCL F1	69±1	256±9	1,99±0,10	220±9	0,141±0,03
NCL F2	68±2	252±8	2,00±0,13	217±1	0,148±0,02
NCL F3	66±0	217±2	1,94±0,00	200±7	0,144±0,02
NCL F4	63±1	175±1	1,73±0,00	176±7	0,119±0,04
NCL F5	63±0	165 ±1	1,62 ± 0,01	167±1	0,095±0,02
NCL F6	77±12	127 ±8	0,70 ± 0,56	124±13	0,090±0,00

Verificou-se uma variação de 256±9 nm a 127 ±8nm para a técnica de difração de laser (Figura 3), enquanto que para a técnica de espalhamento de luz dinâmico a diferença de diâmetros médios é de 220±8 nm a 124±13 nm (Figura 4). O tamanho médio de partículas diminuiu à medida em que o fluxo de injeção da fase orgânica para a fase aquosa aumentou. Segundo GALINDO-RODRIGUEZ e colaboradores (2004), o mecanismo de formação das nanopartículas, pode ser descrito segundo interações entre água-solvente, água-polímero e solvente-polímero. Assim, as interações água-solvente e o movimento de difusão do solvente exercem uma importante função para explicar a variação de diâmetro de partícula durante a preparação, como observado nos resultados obtidos para o estudo preliminar de fluxo de injeção.

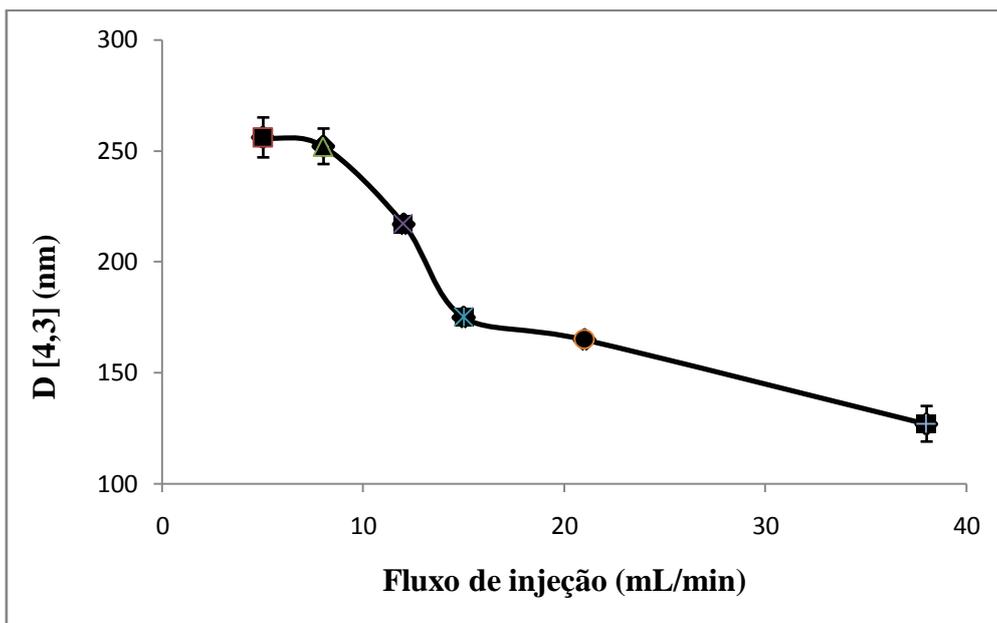


Figura 3. Gráfico representativo da variação de diâmetro médio (D[4,3]) em função do fluxo de injeção.

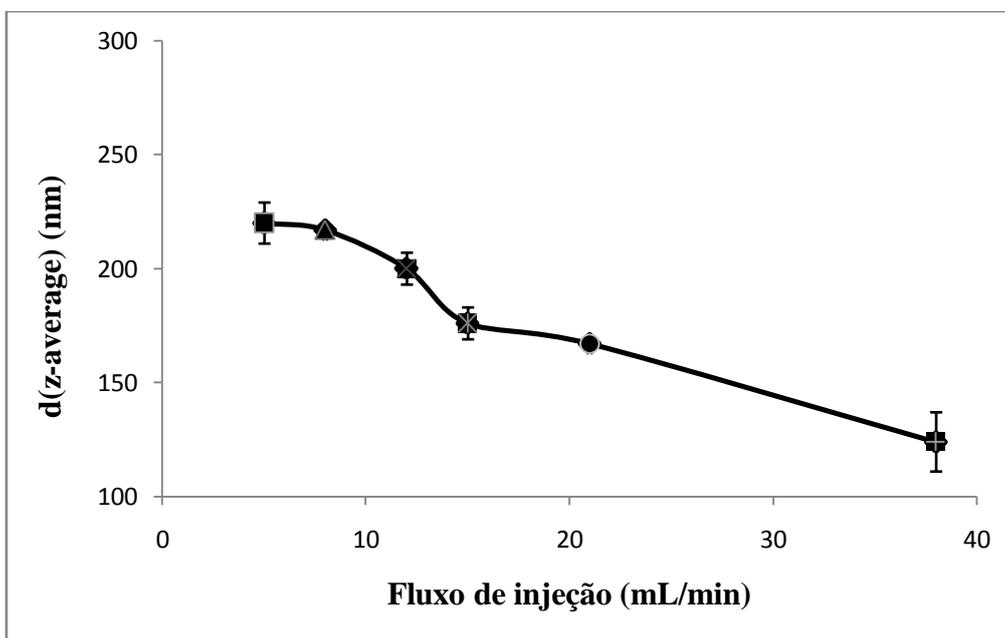


Figura 4. Gráfico representativo da variação de d(z-average) em função do fluxo de injeção.

Segundo LINCE e colaboradores (2008), para a formação de nanoesferas poliméricas a variação do tamanho de partícula devido aos diferentes fluxos de injeção está relacionada com a velocidade de nucleação, sendo este conhecido como um conjunto de processos que levam a formação das partículas. A taxa de nucleação, por sua vez, está diretamente relacionada à difusão molecular, que é mais alta quanto mais alto for o fluxo de injeção. Sendo assim, os autores concluem que quanta mais alta a taxa de nucleação, observada para os maiores fluxos, menores serão as partículas.

As observações de MOLPECERES e colaboradores (1995) corroboram com os resultados obtidos por LINCE e colaboradores, também para nanoesferas poliméricas. Para os maiores fluxos de injeção, os diâmetros de partícula foram os menores, assim como os menores fluxos de injeção apresentaram os maiores diâmetros de partícula. Os autores observaram, em um intervalo de 6 a 272 mL min⁻¹, uma variação de diâmetro de partícula de, aproximadamente, 100 nm. As nanopartículas preparadas nos trabalhos citados, LINCE e colaboradores, e MOLPECERES e colaboradores são sistemas matriciais, nanoesferas poliméricas, formadas pelo processo conhecido como nucleação, enquanto que as nanocápsulas de núcleo lipídico são sistemas vesiculares, formadas pelo processo de auto-organização. Observando os resultados obtidos nos trabalhos citados e com as nanocápsulas de núcleo lipídico, vê-se que pode-se fazer uma analogia, ou seja, em ambos os casos, observa-se uma diminuição do diâmetro de partícula com o aumento do fluxo de injeção. Assim, independente da presença ou ausência de óleo em sua estrutura e do processo de formação, o fluxo de injeção exerce um importante papel no controle de diâmetro e distribuição de diâmetro destes sistemas.

Cabe salientar ainda que, os sistemas vesiculares, as nanocápsulas de núcleo lipídico, são mais sensíveis a variação de fluxo de injeção, se comparado aos sistemas matriciais citados anteriormente. Isso porque, em um intervalo de fluxo de injeção menor, de 5 a 38 mL min⁻¹, foi observado uma variação de, aproximadamente 100 nm, enquanto que para as nanoesferas poliméricas, esta mesma variação foi observada para um intervalo maior, de 6 a 272 mL min⁻¹. Sendo assim, pode-se dizer que este parâmetro é mais influente na preparação dos sistemas vesiculares, se comparado aos sistemas matriciais.

Além disso, observa-se que a polidispersão (SPAM) e o índice de polidispersão (PdI), obtidos pelas técnicas de difração de laser e espalhamento de luz dinâmico, respectivamente, também são influenciados pelo fluxo de injeção. Observa-se que, a medida

em que o fluxo de injeção aumenta, a polidispersão diminui, chegando aos menores valores no maior fluxo de injeção em estudo, 38 mL min^{-1} . Sendo assim, para os maiores fluxos, a distribuição de tamanho é mais estreita, indicando maior homogeneidade da suspensão aquosa.

Segundo JORNADA e colaboradores (2012), a maior homogeneidade do sistema aquoso indica maior capacidade deste a atravessar barreiras biológicas de forma seletiva, atingindo o sítio de ação de forma mais efetiva. Sendo assim, visando futuras aplicações terapêuticas, a utilização do maior fluxo de injeção avaliado seria mais adequada.

Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA e indicam diferença estatística de tamanho, para $p \leq 0,05$, para os fluxos de injeção de $5, 15$ e 38 mL min^{-1} , sendo possíveis, então, de serem utilizados no modelo fatorial, objetivo principal deste trabalho. A distribuição de tamanho, por volume, segundo a técnica de difração de laser, para os três fluxos de injeção significativos, é apresentada abaixo (Figura 5).

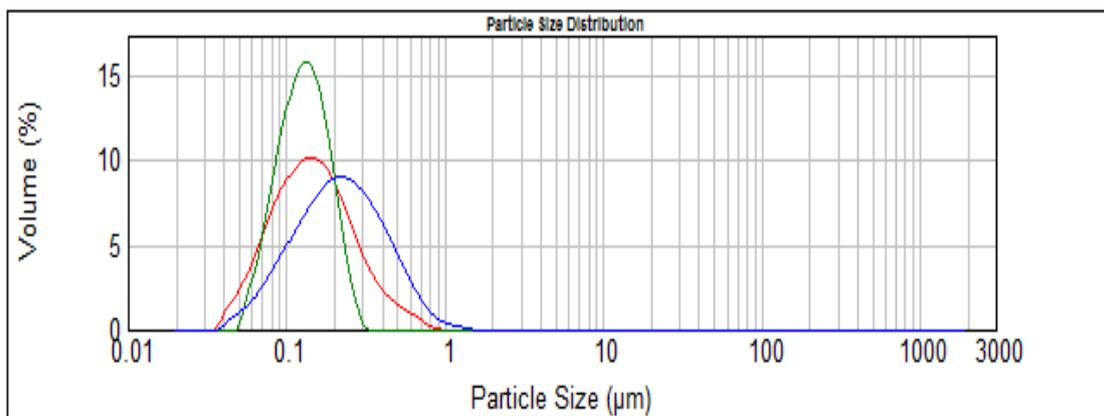


Figura 5. Resultados da técnica de difração de laser, distribuição por volume, para os três fluxos de injeção com diferença estatística de tamanho, 5 mL min^{-1} (curva azul), 15 mL min^{-1} (curva vermelha) e 38 mL min^{-1} (curva verde).

5.1.1.2. Medidas potenciométricas

Os valores de pH para as formulações preparadas segundo diferentes fluxos de injeção se mostraram adequadas para o sistema em questão (Tabela 4), uma vez que o principal constituinte destas partículas, o polímero poli(ϵ -caprolactona) (PCL), possui grupos derivados do ácido carboxílico em sua estrutura, justificando os valores de pH levemente ácidos.

Segundo teste estatístico realizado (ANOVA), os valores de pH obtidos não possuem diferença significativa. Sabe-se que pH está relacionado com a natureza química dos componentes de uma suspensão, assim como com sua quantidade. Como os componentes e as quantidades utilizadas nas formulações não variam em função do fluxo de injeção, era esperado que não houvesse diferenças significativas.

Tabela 4. Valores de pH obtidos nos diferentes fluxos de injeção.

Formulação	pH
NCL F1	5,92 ± 0,084
NCL F2	5,01 ± 0,063
NCL F3	5,32 ± 0,177
NCL F4	4,63 ± 0,382
NCL F5	5,59 ± 0,353
NCL F6	4,71 ± 0,092

5.1.1.3. Potencial zeta

Os valores de potencial zeta, obtidos através da técnica de eletroforese, são negativos (Tabela 5), independente do fluxo de injeção avaliado. Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA, para $\rho \leq 0,05$, e indicam que não há diferença significativa nos resultados obtidos. Como não há mudanças nos componentes nem nas quantidades utilizadas no preparo das formulações, esperava-se que o potencial zeta não sofresse influência do fluxo de injeção.

Sabe-se que o polímero e o tensoativo de interface são os constituintes destas partículas com maior influência no potencial de superfície, uma vez que encontram-se recobrando as mesmas (SCHAFFAZICK et. al., 2003). Devido ao caráter aniônico da poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e ao impedimento estéreo ocasionado pelas micelas de polissorbato 80 na superfície das partículas, justifica-se os valores negativos em torno de -15 mV. Os valores encontrados são considerados valores característicos para a composição da formulação em questão.

Tabela 5. Resultados de potencial zeta para as formulações preparadas segundo diferentes fluxos de injeção.

Formulação	Potencial zeta (mV)
LNC F1	- 14,7± 4
LNC F2	-17,1 ± 4
LNC F3	-18,9 ± 1,
LNC F4	-14,8 ± 3
LNC F5	-16,6 ± 2
LNC F6	-19,7 ± 5

5.1.1.4. Estabilidade física

Para visualização de possíveis fenômenos de instabilidade física, como sedimentação, cremagem, floculação e/ou coalescência, foram procedidos ensaios em Turbiscan Lab®. Em todos os fluxos de injeção avaliados, as suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico apresentaram transmitância nula, permitindo a avaliação apenas do sinal de *backscattering* (BS) (Figura 6).

Observa-se, no perfil gráfico apresentado, que as variações são menores do que 10%, no topo e na base da cubeta óptica, indicando que as suspensões aquosas são cineticamente estáveis no tempo e na temperatura de experimento (CELIA et. al., 2009). Essa variação é decorrente da migração das partículas de tamanho próximo a 1 micrometro presentes nas formulações, uma vez que partículas coloidais, nanoscópicas, não estão sujeitas a força gravitacional e se mantém na solução em movimento Browniano.

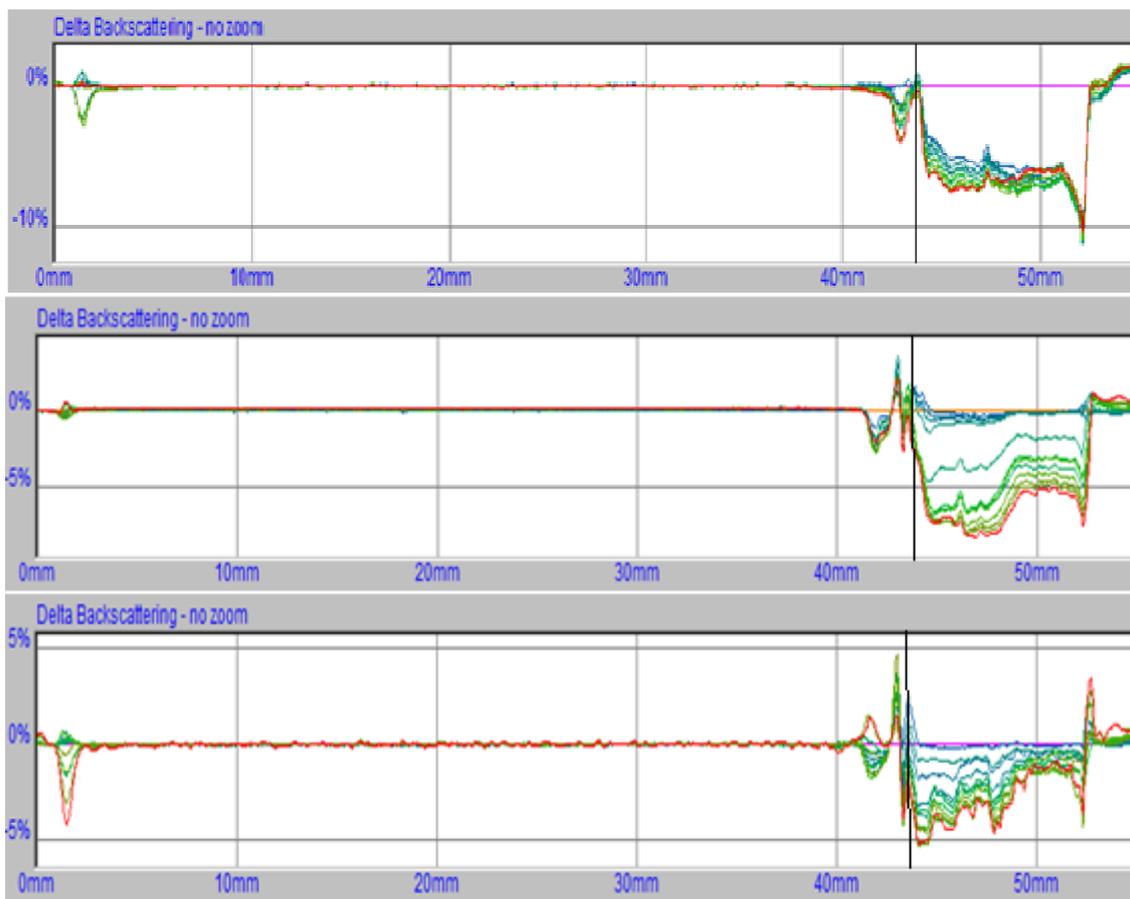


Figura 6. Perfil de variação de *DeltaBackscattering* para as formulações preparadas nos três fluxos de injeção que apresentaram diferença estatística de tamanho, NCL F1, NCL F4 e NCL F6, respectivamente.

5.1.1.5. Rastreamento de partícula

A análise de rastreamento de partículas, através do equipamento NanoSight, foi avaliada para todas as formulações em estudo, com o objetivo de determinar o número de partículas presente na suspensão aquosa. Serão apresentados somente os resultados referentes às formulações NCL F1 e NCL F6 (Tabela 6), tendo em vista que somente estas duas formulações, preparadas segundo os fluxos de injeção de 5 e 38 mL min⁻¹, apresentaram diferença estatística no número de partículas obtido, segundo teste estatístico realizado (ANOVA).

As diluições realizadas, 24.000, 27.000 e 30.000 vezes, foram selecionadas devido à sensibilidade do equipamento.

Tabela 6. Número de partículas presente na suspensão aquosa, para as formulações NCL F1 e NCL F6.

Formulação	Diluição (vezes)	Número de partículas na formulação (g/mL)
LNC F1	24.000	1,92.10 ¹³
	27.000	1,96. 10 ¹³
	30.000	1,32.10 ¹³
LNC F6	24000	2,22.10 ¹³
	27000	2,42.10 ¹³
	30000	1,69.10 ¹³

A formulação preparada segundo o menor fluxo de injeção, NCL F1, apresentou uma média de $1,73 \cdot 10^{13}$ partículas, enquanto que a formulação preparada segundo o maior fluxo de injeção, NCL F6, apresentou uma média de $2,11 \cdot 10^{13}$ partículas. Segundo teste estatístico realizado, as formulações apresentam número de partículas significativamente diferente.

As formulações apresentaram diâmetro de partícula diferente, 220 ± 9 nm para o menor fluxo de injeção, 5 mL min^{-1} , e 124 ± 13 nm para o maior fluxo de injeção, 38 mL min^{-1} , segundo a técnica de espectroscopia de correlação de fótons. Acredita-se que a variação no número de partículas foi devido aos diferentes diâmetros observados, uma vez que as suspensões aquosas foram preparadas utilizando a mesma quantidade de componentes. Assim, a formulação que apresentou o maior número de partícula foi a preparada segundo o maior fluxo de injeção, 38 mL min^{-1} .

5.1.1.6. Análise morfológica

A análise morfológica, através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), foi realizada para as formulações no menor (Figura 7) e maior (Figura 8) fluxo de injeção avaliados, 5 e 38 mL min^{-1} , respectivamente.

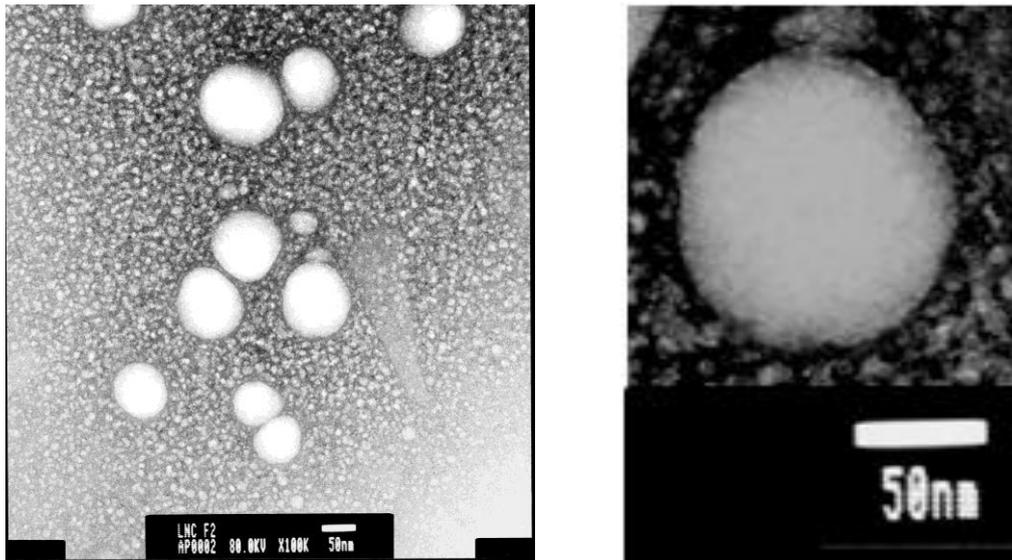


Figura 7. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão para a formulação preparada no menor fluxo de injeção, 5 mL min^{-1} , utilizando acetona como solvente orgânico.

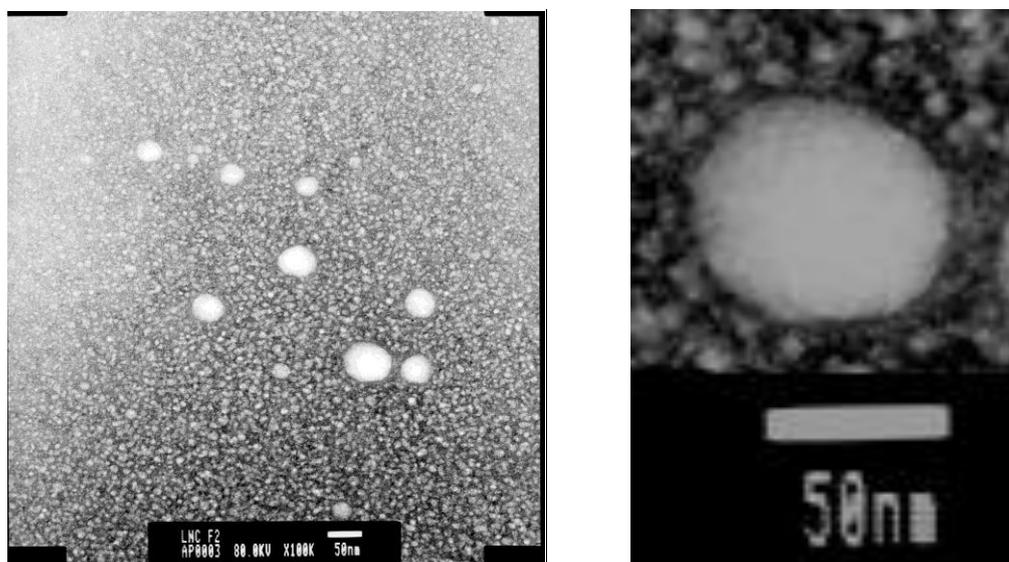


Figura 8. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão para a formulação preparada no maior fluxo de injeção, 38 mL min^{-1} , utilizando acetona como solvente orgânico.

Pela observação das imagens obtidas, pode-se verificar a diferença de diâmetro de partícula entre os dois fluxos de injeção em estudo, corroborando com os resultados obtidos segundo as técnicas de difração de laser e espectroscopia de correlação de fótons.

5.1.2. Solvente orgânico

As suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico foram preparadas conforme VENTURINI e col. (2011), variando somente o solvente orgânico utilizado na preparação da fase orgânica, utilizando, inicialmente, o funil de injeção, para avaliar o comportamento do solvente orgânico frente ao sistema.

Os resultados referentes a acetonitrila se mostraram adequados para a preparação destas formulações (Figura 9), uma vez que, observa-se, na técnica de difração de laser, apenas um pico nanométrico na distribuição de diâmetro desta suspensão. Quando da utilização do 1,4-dioxano como solvente orgânico para preparação da fase orgânica destas suspensões, observam-se dois picos na distribuição de tamanho pela técnica de difração de laser (Figura 10), indicando que, nestas condições, este solvente não se mostrou adequado. Todas as formulações foram preparadas em duplicata, como mostram os resultados.

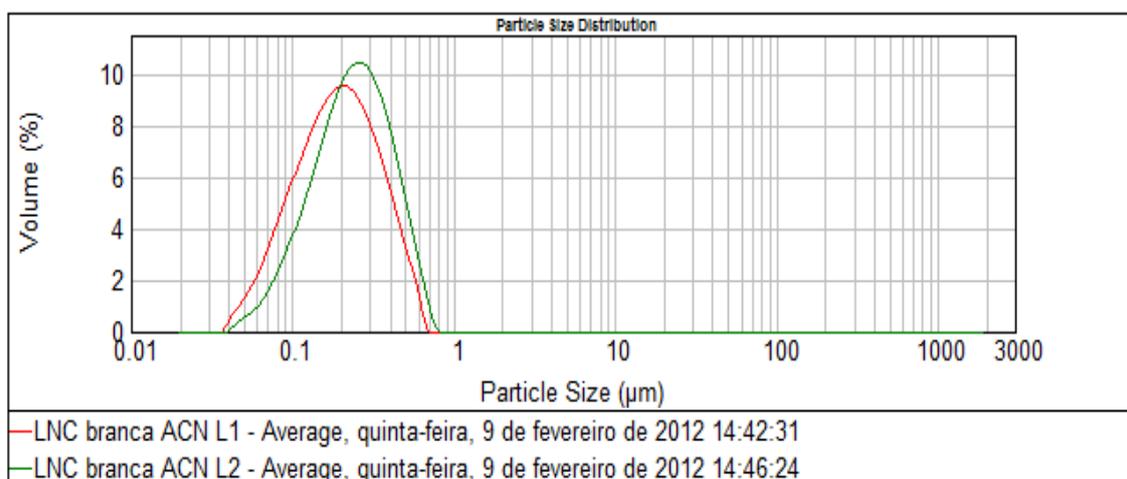


Figura 9. Distribuição de tamanho obtido pela técnica de difração de laser para as formulações preparadas com acetonitrila.

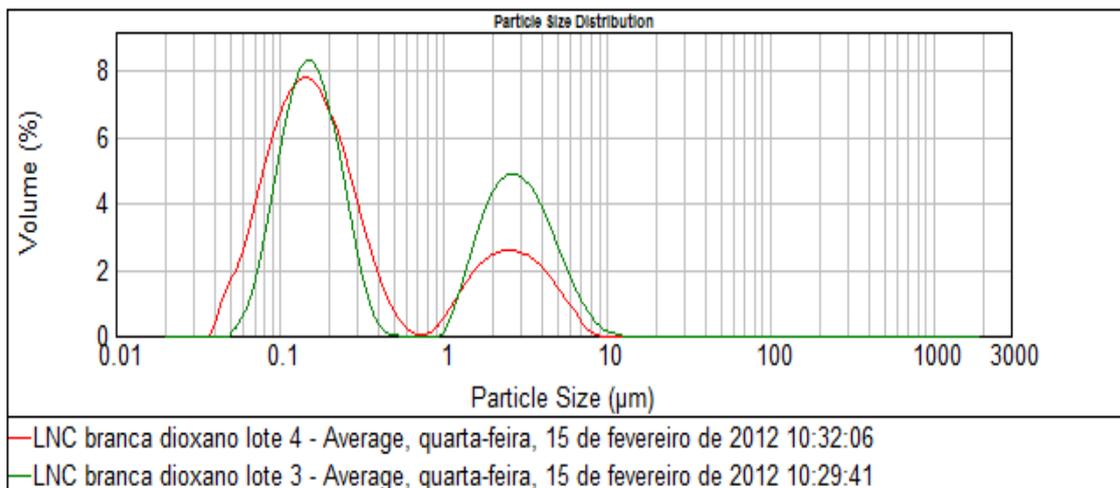


Figura 10. Distribuição de tamanho obtida pela técnica de difração de laser para as formulações preparadas com 1,4-dioxano.

Segundo JORNADA e colaboradores (2012), a quantidade dos componentes presentes nas fases orgânica e aquosa influencia na viscosidade dinâmica observada para estas fases. Foi verificado também que a tensão superficial da fase orgânica não influencia no diâmetro médio obtido para a formulação, enquanto que a viscosidade exerce um papel fundamental, sendo maior o diâmetro quanto maior for a viscosidade desta fase.

Em vista disso, medidas de viscosidade dinâmica foram realizadas para as duas fases orgânicas em questão, obtendo os resultados de 0,82 mPa.s para a fase orgânica preparada com acetonitrila e 1,48 mPa.s para a fase orgânica preparada com 1,4-dioxano. Sendo assim, duas hipóteses foram levantadas para explicar a distribuição bimodal observada quando da preparação com o solvente 1,4-dioxano. A primeira hipótese levantada está relacionada com a medida de viscosidade dinâmica, uma vez que a fase orgânica preparada com 1,4-dioxano apresenta um valor significativamente maior quando comparada com a fase orgânica preparada com acetonitrila e até mesmo com acetona, que apresenta o valor de 0,79 mPa.s, o que corroboraria com os resultados obtidos por Jornada e colaboradores (2012). A segunda hipótese levantada para explicar este resultado é de que os componentes utilizados no preparo da formulação podem estar em excesso, o que justificaria o aparecimento do pico micrométrico. Para testar as hipóteses, procedeu-se o estudo de viscosidade, seção 4.2.2.6, em função da concentração de

polímero na fase orgânica, para obtenção da concentração de agregação crítica (JORNADA et. al., 2012).

Tendo em vista os resultados obtidos para as formulações preparadas com acetonitrila e com 1,4-dioxano, pode-se dizer que a acetonitrila se enquadra na condição ótima atingida por VENTURINI e col. (2011), podendo ser incluída no estudo fatorial. O solvente orgânico 1,4-dioxano, por sua vez, não se mostrou adequado frente à condição em estudo, não podendo ser incluído no estudo fatorial, sendo necessário realizar um estudo à parte com este solvente.

5.1.2.1. Distribuição de diâmetro, diâmetro médio, polidispersão, Diâmetro médio e índice de polidispersão das NCL preparadas com acetonitrila

As formulações com acetonitrila se mostraram adequadas também quando utilizado o sistema citado no sub item 4.1.1, com variações de diâmetro e distribuição de partícula, tanto pelas técnicas de difração de laser quanto pelo espalhamento de luz dinâmico (Tabela 7). A formulação preparada segundo o menor fluxo de injeção estudado, 5mL min⁻¹, foi chamada de LNC ACN F1, enquanto que a formulação preparada segundo o maior fluxo de injeção estudado, 38 mL min⁻¹, foi chamada de LNC ACN F6.

Tabela 7. Resultados obtidos para as formulações preparadas com acetonitrila segundo o menor e o maior fluxo de injeção avaliados.

Formulação	D[4,3] (nm)	Polidispersão (SPAM)	Z-average (nm)	PDI
LNC ACN F1	207±10	1,71±0,05	199±3	0,102±0,00
LNC ACN F6	134±1	1,09±0,20	143±5	0,118±0,02

O diâmetro médio e a distribuição de diâmetro, pelas técnicas de difração de laser e espalhamento de luz dinâmico, apresentaram diferença estatística, segundo ANOVA, para as formulações preparadas com acetonitrila, quando comparado os dois fluxos de injeção deste pré-estudo, assim como observado para as formulações preparadas com acetona.

Para a formulação preparada com acetona, no menor fluxo de injeção avaliado, o diâmetro médio, pela técnica espalhamento múltiplo de luz, foi de 220±8 nm, enquanto que para a formulação preparada com acetonitrila, nas mesmas condições, o diâmetro médio

obtido foi de 199 ± 3 nm. Quando analisado o maior fluxo de injeção, o diâmetro médio obtido para a formulação preparada com acetona foi de 124 ± 13 nm, enquanto que, para a formulação preparada com acetonitrila, o diâmetro médio obtido foi de 143 ± 5 nm. Para uma avaliação completa dos solventes orgânicos estudados neste trabalho, preparou-se formulações com o solvente 1,4-dioxano, no maior fluxo de injeção, obtendo um valor de diâmetro médio de 133 ± 3 nm. Assim sendo, observa-se que não há diferença estatística no diâmetro médio avaliado segundo ANOVA, indicando que o solvente orgânico utilizado não influencia no diâmetro médio observado, assim como na distribuição de diâmetro.

Para justificar esta observação, procedeu-se o cálculo dos valores de parâmetros de solubilidade para os pares água/acetona, água/acetonitrila e água/1,4-dioxano, como citado no item 4.2.4 (Tabela 8).

Tabela 8. Valores de parâmetros de solubilidade para os pares solvente/não solvente avaliados neste trabalho.

Par solvente/não solvente	Parâmetro de solubilidade (MPa ^{1/2})
Água/acetona	35,74
Água/acetonitrila	36,25
Água/1,4-dioxano	37,84

Os valores deste parâmetro para os três pares avaliados não apresentam diferença estatística segundo ANOVA, o que significa que os três solventes orgânicos avaliados possuem aproximadamente a mesma solubilidade em água, indicando que a difusão do solvente orgânico na água, processo que ocorre durante a formação das nanopartículas, se procede da mesma maneira. Sendo assim, o solvente orgânico não poderia influenciar no diâmetro médio obtido para estas partículas. Segundo GALINDO e colaboradores, o parâmetro de solubilidade exerce um papel importante no diâmetro obtido para as nanopartículas poliméricas. Os autores observaram, para os solventes orgânicos avaliados, diferentes diâmetros de partícula, e, conseqüentemente, diferentes valores para os parâmetros de solubilidade solvente/não solvente. Assim sendo, em ambos os casos, o parâmetro de solubilidade se mostrou um parâmetro de influência no controle de diâmetro, quando o solvente orgânico é variado.

Visando elucidar o papel do solvente orgânico e como ocorre sua difusão na água durante o preparo das suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico, procedeu-se ao cálculo dos coeficientes de difusão solvente orgânico/água e também água/solvente orgânico, assim como o cálculo da razão dos coeficientes de difusão, segundo equações 7 e 8 (Tabela 9).

Tabela 9. Coeficientes de difusão para os três solventes orgânicos avaliados.

Solvente	D solvente/água	D água/solvente	R
Acetona	$1,05.10^{-5}$	$6,21.10^{-5}$	0,17
Acetonitrila	$1,18.10^{-5}$	$5,60.10^{-5}$	0,21
1,4-Dioxano	$0,96.10^{-5}$	$1,64.10^{-5}$	0,58

CHOI e colaboradores, em 2001, estudaram diferentes solventes orgânicos no preparo de nanoesferas poliméricas, pelo método de emulsificação-difusão. Nesta ocasião, os autores observaram que existe uma diferença significativa nos coeficientes de difusão calculados, e, conseqüentemente, na razão entre estes coeficientes, em uma ordem de até dez vezes. O diâmetro médio de partícula se mostrou diretamente relacionado com o valor de R, sendo menor quanto menor a razão entre os coeficientes de difusão. Ou seja, para este método de preparação, o valor de R se mostrou um parâmetro influente, justificando, de maneira coerente, os valores de diâmetro médio observado no estudo realizado.

No preparo das nanocápsulas de núcleo lipídico, pelo método de deslocamento de solvente, o diâmetro médio não se alterou quando o solvente orgânico foi variado, podendo dizer, então, que o R, a razão entre os coeficientes de difusão, não é um parâmetro importante. Considerando o coeficiente de difusão solvente orgânico/água, os valores encontrados para os três pares não apresentaram diferença estatística segundo ANOVA, enquanto que o coeficiente de difusão água/solvente orgânico apresentou valores significativamente diferentes. Neste caso, a difusão solvente orgânico/água ocorre na mesma velocidade para os pares acetona/água, acetonitrila/água e 1,4-dioxano/água, justificando os mesmos valores de diâmetro médio encontrados.

Assim sendo, pode-se dizer que o coeficiente de difusão solvente orgânico/água é o parâmetro de maior influência para o sistema em estudo. Esta hipótese foi levantada por CHOI e colaboradores, sendo comprovada pelos resultados obtidos neste trabalho.

5.1.2.2. Medidas potenciométricas

Nas análises de pH, as formulações LNC ACN F1 e LNC ACN F6 apresentaram valores próximos aos valores encontrados para as formulações preparadas com acetona, nas mesmas condições (Tabela 10). Assim, pode-se dizer que a estrutura da partícula não é influenciada pela natureza do solvente orgânico, atuando apenas como veículo no preparo da formulação.

Tabela 10. Valores de pH obtidos para as formulações preparadas com acetonitrila, no menor e maior fluxo de injeção avaliados.

Formulação	pH
LNC ACN F1	4,75±0,304
LNC ACN F6	5,23±0,205

5.1.2.3. Potencial zeta

Análises de potencial zeta também foram realizadas com as formulações preparadas com acetonitrila, nos fluxos de 5 e 38 mL min⁻¹, verificando valores próximos aos encontrados quando da utilização da acetona como solvente orgânico, sem diferença estatística segundo ANOVA (Tabela 11), indicando a mesma estrutura, mesmo com a mudança do veículo no seu preparo.

Tabela 11. Valores de potencial zeta para as formulações preparadas com acetonitrila, no menor e maior fluxo de injeção avaliados.

Formulação	Potencial Zeta (mV)
LNC ACN F1	-18,68±0,884
LNC ACN F6	-13,97±2,913

5.1.2.4. Estabilidade física

Nos testes de estabilidade física, as suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas com acetonitrila apresentaram transmitância menor do que 0,2%, para os dois fluxos de injeção, LNC ACN F1 e LNC ACN F6. Sendo assim, foi analisado apenas o sinal de *Delta Backscattering* (Figura 11). Observa-se, neste perfil gráfico, que as

variações são menores do que 10%, indicando que as suspensões aquosas são cineticamente estáveis no tempo e na temperatura de experimento (CELIA et. al., 2009).



Figura 11. Perfil de variação de *DeltaBackscattering* para as formulações preparadas com acetonitrila, LNC ACN F1 e LNC ACN F6, respectivamente.

5.1.2.5. Viscosidade da fase orgânica

Para testar a hipótese do resultado observado na difratometria de laser para a formulação preparada com 1,4-dioxano (Figura 10), procedeu-se as análises de viscosidade dinâmica das fases orgânicas preparadas com este solvente, seguindo a otimização realizada por VENTURINI e colaboradores (2011), para todos os constituintes. O componente da formulação que mais contribui com a viscosidade é a PCL, assim sendo, obteve-se uma relação entre a concentração de polímero da fase orgânica, em escala logarítmica, e a viscosidade acima citada (Figura 12) (JORNADA et. al., 2012).

A diferença no estado de agregação molecular é dependente da viscosidade dinâmica da fase orgânica, que, por sua vez, é dependente da variação de concentração de materiais desta fase. Observa-se uma solução no regime diluído, em que as cadeias poliméricas encontram-se livres (reta 1 – Figura 12) e uma solução no regime semi diluído, em que as cadeias poliméricas encontram-se enoveladas (reta 2 – Figura 12). Pode-se relacionar estes dois regimes através de duas equações de reta (Equações 7 e 8), igualando-as, obtendo a concentração de agregação micelar crítica da PCL.

$$\eta = 0,057 \log[PCL] + 0,946 \quad (\text{Equação 7})$$

$$\eta = 0,228 \log[PCL] + 0,884 \quad (\text{Equação 8})$$

Após igualar as duas equações, encontra-se o valor de $2,30 \text{ mg mL}^{-1}$ para a concentração de agregação micelar crítica da PCL, em 1,4-dioxano. Mantendo a proporção dos materiais, a concentração do óleo (triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico) e de monoestearato de sorbitano da fase orgânica corresponde a $3,63 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,89 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente.

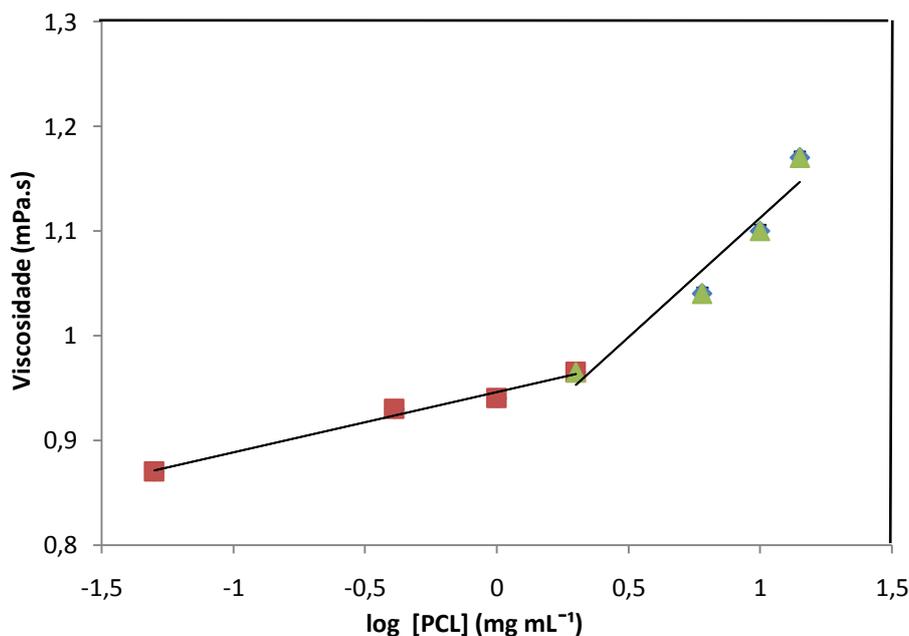


Figura 12. Relação existente entre a viscosidade da fase orgânica em função do logaritmo da concentração de PCL, para o solvente 1,4-dioxano.

Para verificar a validade dos resultados obtidos, foram preparadas formulações com as fases orgânicas que correspondem à concentração de agregação crítica e também uma imediatamente após, na concentração de $4,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Os resultados demonstram que, quando as cadeias de polímero estão livres, no regime diluído, até o ponto de inflexão, a

distribuição granulométrica das nanocápsulas de núcleo lipídico é unicamente nanométrica (Figura 13), enquanto que, após este ponto de inflexão, no regime semi diluído, as cadeias de polímero deixam de estar livres, devido a sua maior quantidade na fase orgânica, fazendo com que a distribuição apresente, além do pico nanométrico, um pico também micrométrico (Figura 14).

Comparando com o valor de concentração de agregação crítica obtida quando da utilização da acetona como solvente orgânico (JORNADA et. al., 2012), de $4,38 \text{ mg mL}^{-1}$, vê-se que o 1,4-dioxano comporta uma menor quantidade de componentes, justificando o pico micrométrico observado quando a formulação apresenta a otimização atingida por VENTURINI e colaboradores (2011) (Figura 10).

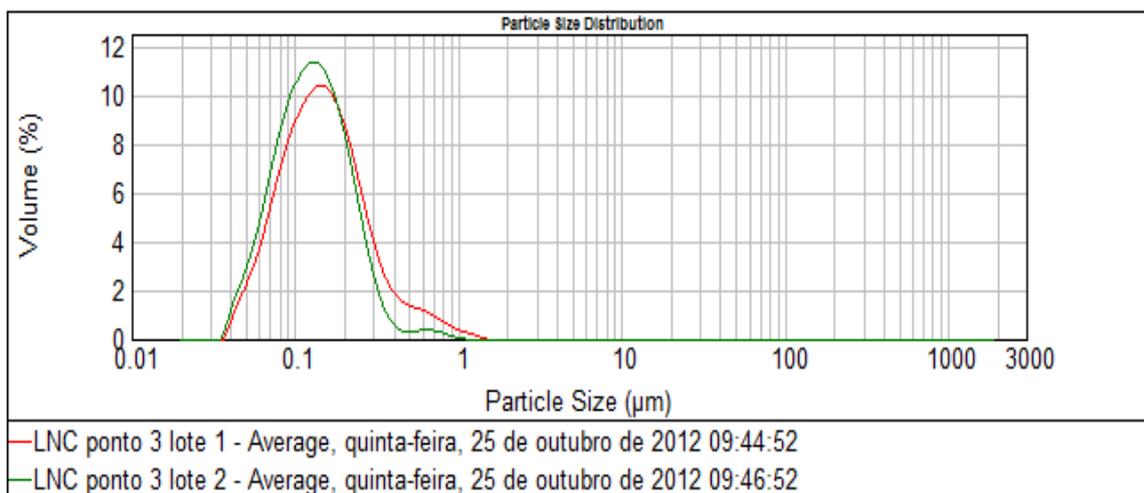


Figura 13. Distribuição granulométrica das nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas segundo a proporção do ponto de inflexão.

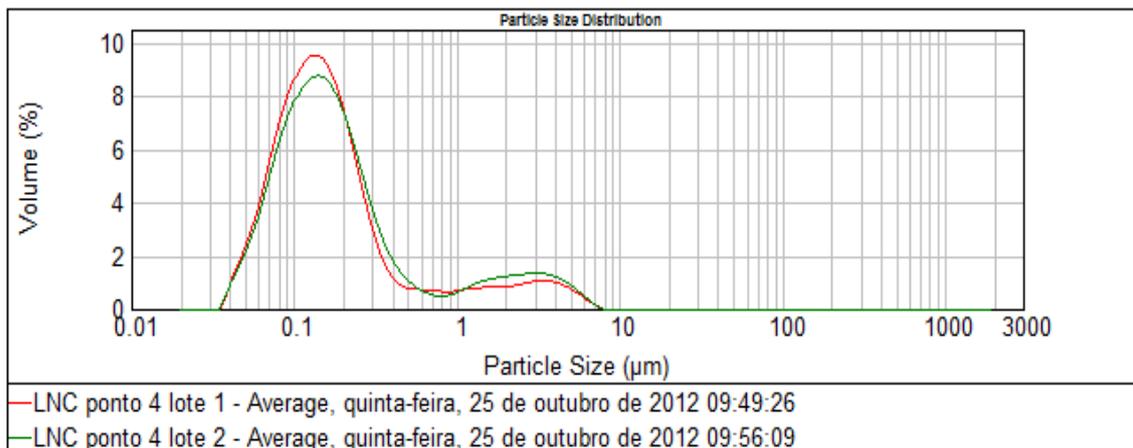


Figura 14. Distribuição granulométrica das nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas imediatamente após o ponto de inflexão.

Da mesma forma, procedeu-se o estudo da viscosidade dinâmica em função do logaritmo da concentração de PCL para as fases orgânicas preparadas utilizando acetonitrila como solvente orgânico, também mantendo a otimização dos componentes (Figura 16). Foram obtidas duas equações de reta (Equações 9 e 10), que, igualadas, fornecem uma concentração de agregação micelar crítica de $10,47 \text{ mg mL}^{-1}$.

$$\eta = 0,092 \log[PCL] + 0,441 \quad (\text{Equação 9})$$

$$\eta = 0,383 \log[PCL] + 0,144 \quad (\text{Equação 10})$$

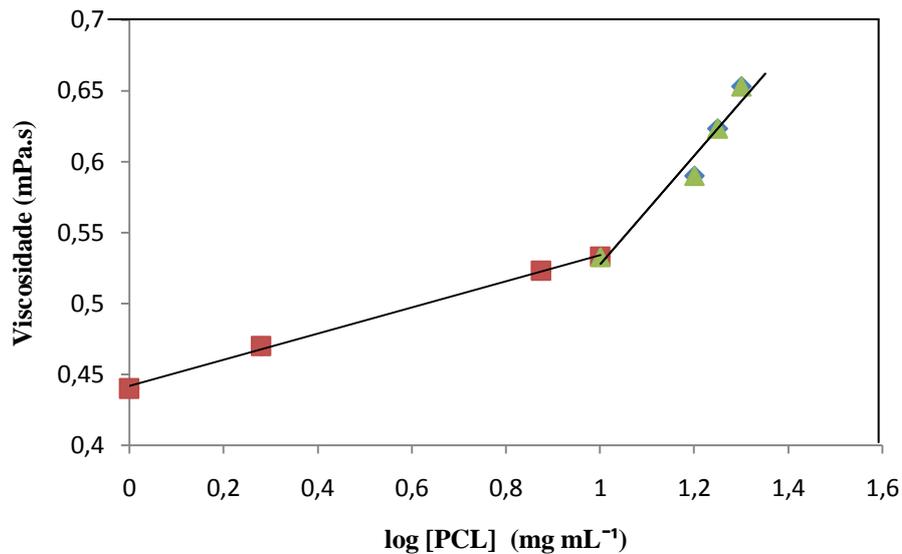


Figura 15. Relação existente entre a viscosidade da fase orgânica em função do logaritmo da concentração de PCL, para o solvente acetonitrila.

Esta concentração de agregação crítica encontrada pode indicar uma vantagem de sua utilização frente à utilização da acetona como solvente orgânico, uma vez que a fração volumétrica dos componentes pode ser aumentada, ou seja, a acetonitrila comporta uma maior quantidade de componentes, mantendo a proporção otimizada, sem comprometer suas características nanoscópicas. Assim, visando a utilização destas formulações em um possível estudo terapêutico, uma maior quantidade de nanopartículas seria formada, podendo, também, aumentar a quantidade de ativo encapsulada.

5.2. Estudo de gradiente de densidade

O estudo de gradiente de densidade realizado com as formulações preparadas com acetonitrila e 1,4-dioxano mostrou uma única banda no tubo de experimento, indicando a presença de apenas um tipo de partícula, as nanocápsulas. Este resultado mostra que a mudança do solvente orgânico no preparo destas suspensões aquosas não altera a formação unicamente de nanocápsulas, uma vez que poderíamos observar a formação de nanoesferas ou nanoemulsões, por exemplo.

A partir da calibração realizada, obteve-se uma densidade de partícula de 1,022 g mL⁻¹ para a formulação preparada com acetonitrila e 1,006 g mL⁻¹ para a formulação

preparada com 1,4-dioxano. Estas formulações foram preparadas com diferentes frações volumétricas, como visto no estudo de viscosidade da fase orgânica, resultando em formulações com diferente número de partículas. Sendo assim, a espessura da banda contendo a formulação preparada com acetonitrila deve ser maior, justificando sua maior densidade.

5.3. Estudo fatorial

Com base nos dados obtidos no estudo de fluxo de injeção e no estudo de solvente orgânico, pode-se, então, elaborar o estudo fatorial deste projeto. Obtiveram-se três fluxos de injeção possíveis de serem incluídos, NCL F1, NCL F4 e NCL F6, e apenas dois solventes que se apresentaram adequados frente à condição em estudo, acetona e acetonitrila.

Assim sendo, pode-se elaborar um fatorial de design 2^2 , onde avaliam-se dois parâmetros experimentais, ou seja, duas variáveis independentes, fluxo de injeção (X_1) e solvente orgânico (X_2), em dois diferentes níveis. Neste caso, a variável dependente é o diâmetro médio, avaliado em duas técnicas diferentes de análise, difração de laser (Y_1) e espalhamento de luz dinâmico (Y_2) (Tabela 12). Os dois níveis em estudo foram nomeados de 1 e 2, onde 1 é o nível correspondente ao fluxo de injeção de 5 mL min^{-1} em X_1 e ao solvente orgânico acetona em X_2 e 2 é o nível correspondente ao fluxo de injeção de 38 mL min^{-1} em X_1 e ao solvente orgânico acetonitrila em X_2 .

Tabela 12. Resultado do fatorial 2^2 , avaliando duas variáveis independentes, X_1 e X_2 , em dois níveis, 1 e 2, obtendo Y_1 e Y_2 .

Formulação	X_1	X_2	Y_1	Y_2
1	1	1	256 ± 9	220 ± 8
2	2	1	127 ± 8	124 ± 13
3	1	2	207 ± 10	199 ± 3
4	2	2	134 ± 1	143 ± 5

A equação que modela este estudo fatorial é representada pela equação 11, onde Y_i é a variável dependente, X_1 é a primeira variável independente, X_2 é a segunda

variável independente do estudo. Os coeficientes de regressão são representados por β_0 , β_1 , β_2 e β_3 .

$$Y_i = \beta^0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1 X_2 \quad (\text{Equação 11})$$

O Y_i apresentado acima, como já citado, é representado pelo diâmetro médio obtido pelas técnicas de difração de laser, Y_1 , e espalhamento de luz dinâmico, Y_2 , sendo possível, então, modelar este estudo fatorial segundo duas equações (Equação 12 e 13), obtidas pelo software estatístico Minitab 15.

$$Y_1 = 365 - 101X_1 - 21,3X_2 \quad (\text{Equação 12})$$

$$Y_2 = 289 - 76,6X_1 - 1,38X_2 \quad (\text{Equação 13})$$

Para verificar a validade destas equações modeladas pelo software Minitab 15, calculou-se o valor teórico, a partir das equações citadas acima, do diâmetro médio obtido segundo as duas técnicas utilizadas (Tabelas 13 e 14), comparando-os com os valores obtidos experimentalmente.

Tabela 13. Valores teórico e experimental obtidos para o diâmetro médio segundo a técnica de difração de laser, Y_1 .

Formulação	Y teórico (nm)	Y experimental (nm)
1	243	256
2	142	127
3	221	207
4	120	134

Tabela 14. Valores teórico e experimental obtidos para o diâmetro médio segundo a técnica de espalhamento de luz dinâmico, Y_2 .

Formulação	Y teórico (nm)	Y experimental (nm)
1	211	220
2	134	124
3	210	199
4	133	143

Observa-se, a partir das tabelas apresentadas, que os valores teóricos obtidos para o diâmetro médio, pelas técnicas de difração de laser e espalhamento de luz dinâmico, se aproximam dos valores obtidos experimentalmente, não apresentando diferença estatística segundo ANOVA. Assim sendo, as equações obtidas pelo software Minitab 15, para o fatorial em estudo, mostram-se adequadas.

5.4.Cálculo do Número de Reynolds

Tendo em vista os resultados obtidos no decorrer do trabalho, o número de Reynolds foi calculado apenas para as formulações presentes no estudo fatorial, ou seja, as formulações preparadas com os dois solventes deste trabalho, acetona e acetonitrila, segundo os fluxos de injeção de 5 mL min^{-1} e 38 mL min^{-1} . Para tanto, foram realizadas determinações da densidade relativa (ρ) e da viscosidade dinâmica (η) das fases orgânicas (Tabela 15).

Tabela 15. Densidade relativa (ρ) e viscosidade dinâmica (η) obtidas para as fases orgânicas.

Fase orgânica	Densidade relativa (ρ) (kg.m^{-3})	Viscosidade dinâmica (η) (Pa.s)
Acetona	770	$0,42.10^{-3}$
Acetonitrila	754	$0,44.10^{-3}$

Sabe-se que o comprimento do tubo é de 40 cm (0,40 m) e que o seu diâmetro é de 3,16 mm ($3,16.10^{-3}$ m) e calculando a velocidade média de escoamento para cada caso, pode-se, então, calcular o número de Reynolds segundo a equação 5 (Tabela 16). As formulações estão nomeadas de acordo com a tabela 13.

Tabela 16. Número de Reynolds para cada formulação em estudo.

Formulação	Número de Reynolds
1	4,2
2	22,0
3	3,9
4	19,5

Segundo literatura, se o número de Reynolds for $Re < 2000$ tem-se um escoamento laminar, enquanto $2000 < Re < 3000$ o escoamento é considerado instável e para $Re > 3000$ o escoamento é considerado turbulento. Sendo assim, para todas as formulações em estudo, o escoamento é considerado laminar, pois todas as suspensões preparadas apresentaram $Re < 2000$. Desta forma, foi possível manter um escoamento laminar mesmo empregando-se uma bomba peristáltica para a adição da fase orgânica na fase aquosa. Esses resultados abrem a possibilidade de automação do processo de fabricação das nanocápsulas de núcleo lipídico, seja em escala laboratorial ou mesmo em escala industrial.

A partir da realização deste trabalho, pode-se concluir os seguintes itens:

- O sistema utilizado neste trabalho, usando uma bomba peristáltica, se mostrou adequado para o objetivo ao qual se propôs, permitindo a variação e controle de fluxo de injeção, possibilitando a obtenção de formulações com diâmetros e distribuição de diâmetro que apresentaram diferença estatística, segundo duas técnicas diferentes de análise. Este controle se mostra importante, principalmente, visando uma futura administração terapêutica, pois partículas de diferentes tamanhos poderão ter rotas biológicas diferentes.
- Para o preparo das suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico, foi possível a utilização de dois solventes orgânicos diferentes do tradicionalmente usado nestes sistemas, a acetonitrila e o 1,4-dioxano, apresentando distribuição unicamente nanoscópica, com a mudança da fração volumétrica.
- Através do cálculo do parâmetro de solubilidade e dos coeficientes de difusão solvente orgânico\água e água\solvente orgânico foi possível explicar e elucidar o papel do solvente orgânico na preparação das suspensões aquosas de nanocápsulas de núcleo lipídico. Além disso, pode-se concluir que a difusão água\solvente orgânico não se mostrou um parâmetro importante para este método de preparação.
- A utilização de um modelo fatorial de design 2^2 foi utilizado para modelar este estudo, em que o fluxo de injeção se mostrou o parâmetro de maior influência no controle de diâmetro e distribuição de diâmetro, quando comparado com o solvente orgânico utilizado.
- A utilização da acetonitrila como solvente orgânico no preparo das fases orgânicas, apresentou uma grande vantagem em relação à acetona, uma vez que o valor de concentração de agregação crítica foi de $10,47 \text{ mg mL}^{-1}$, cerca de duas vezes maior que o valor encontrado para a acetona. Sendo assim, é possível aumentar a fração volumétrica, podendo aumentar o número de partículas presente na formulação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARRATT, G. M. Therapeutic Applications of Colloidal Drug Carriers. **Pharmaceutical Science and Technology Today**. V. 3, N^a 5, P. 163-171, 2000.
- BEI, D.; MARSZALEK, J.; YOUAN, B. C.. Formulation of Dacarbazine-Loaded Cubosomes Part I: Influence of Formulation Variables. **Pharmaceutical Science Tecnology**, v. 10, p. 1032-1037, 2009.
- CALVO, P.; SANCHEZ, A.; MARTINEZ, J. Polyester nanocapsules as new topical ocular delivery system for cyclosporine A. **Pharmaceutical Research**, v. 13, p. 1423-1433, 1996.
- CELIA, C.; TRAPASSO, E.; COSCO, D. TurbiscanLab Expert Analysis of the stability of ethosomes and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. **Colloids and Surfaces Biointerfaces**, v. 72, p. 155-160, 2009.
- CHÁCON, M.; BERGES, L.; MOLPECERES, J.; ABERTURAS, M. R.; GUZMAN, M. Optimized preparation of poly D, L (lactic-glycolic) microspheres and nanoparticles for oral administration. **Internacional Journal of Pharmaceutics**. V. 141, P. 81-91, 1996.
- CHIEWPATTANAKUL, P.; COVIS, R.; VANDERESSE, R. Design of polymeric nanoparticles for encapsulation of monoacylglycerol. **Colloid and Polymeric Science**, v. 288, p. 959-967, 2010.
- CHOI, S.; KWON, H.; KIM, W.; KIM, J.. Thermodynamic parameters on poly(D,L-lactide-co-glycolide) particle size in emulsification-diffusion process. **Colloids and surface**. V. 201, P. 283 – 289, 2002.
- CHORNY, M.; FISHBEIN, I.; DANENBERG, H.; GOLOMB, G. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. **Journal of controlled release**. V. 83, P. 389 – 400, 2002.
- CONTRI, R. V. ; KAISER, M. ; POLETTO, F. S. ; POHLMANN, A. R. ; GUTERRES, S. S. Simultaneous Control of Capsaicinoids Release from Polymeric Nanocapsules. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, p. 1-9, 2010.
- COUVREUR, P.; VAUTHIER, C.; Nanotechnology: Intelligent design to Treat Complex Disease. **Pharmaceutical Research**. V. 23. P. 1417-1450, 2006.
- CRUZ, L.; SOARES, L; DALLA COSTA, T.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A.. Diffusion and mathematical modeling of release profiles form nanocarriers. **Pharmaceutical Nanotechnology**. V. 313. P. 198 – 205, 2006.
- DE MELO, N. F. S.; GRILLO, R., GUILHERME, V. A.; ARAUJO, D. R.; DE PAULA, ENEIDA; ROSA, A. H., FRACETO, L. F. Poly(Lactide-co-Glycolide) Nanocapsules Containing Benzocaine: Influence of the Composition of the Oily Nucleus on Physico-Chemical Properties and Anesthetic Activity. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p.1984-1994, 2011.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S..Nanocapsules Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement.**International Journal of Pharmaceutics**.V. 55, P. r1-r4, 1989.

FIEL, L.A. Espalhamento múltiplo de luz em temperatura variável: um método inovador para determinação dos parâmetros termodinâmicos de dispersões coloidais Dissertação pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio grande do Sul, 2010.

FIEL, L. A.; REBÊLO, L. M.; DE MELO SANTIAGO, T.; ADORNE M. D.; GUTERRES S. S.; SOARES DE SOUZA, J.; POHLMANN, A. R. Diverse deformation properties of polymeric nanocapsules and lipid-core nanocapsules. **Soft Matter**. V. 7, P. 7240 – 7247, 2011.

FRANCIS, M. F.; CRISTEA, M.; WINNIK, F. M.. Polymeric micelles for oral drug delivery: Why and how. **Pure Application Chemical**. V. 76, P. 1321-1335, 2004.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

GALLARDO, M.; COURRAZE, G.; DENIZOT, B.; TREUPEL, L.; COUVREUR, P.; PUISIEUX, F..Study of the mechanisms of formation of nanoparticles and nanocapsules of polyisobutyl-2-cyanoacrylate.**International Journal of Pharmacy**. V. 100, P. 55-64, 1993.

GALINDO-RODRIGUEZ, S.; ALLEMANN, E.; FESSI, H. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion and nanoprecipitation methods. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 1428-1439, 2004.

GUTERRES, S. S.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R. Preparação eaplicações de nanopartículas para liberação controlada de fármacos. In: Marcelo M.Morales. (Org.). **Terapias avançadas: células tronco, terapia gênica enanotecnologia aplicada à saúde**. Atheneu, cap.17, p. 247-264, 2007.

GUTERRES, S. S.; POLETTO, F. S. ; COLOME, L. M. ; RAFFIN, R. P.;POHLMANN, A. R. Polymeric nanocapsules for drug delivery: an overview. In:MonzerFanun (Chief Editor). (Org.).**Colloids in Drug Delivery**, 1.ed. Boca Raton:Taylor& Francis/CRC Press, cap. 3, p. 71-97, 2010.

JAGER, A.; STEFANI, V.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R..Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 338, P. 297-305, 2007.

JAGER, E.; VENTURINI, C. G.; POLETTO, F.; COLOME, L. M.; POHLMANN, J. P. U.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. V. 5, P. 130-140, 2009.

- JEONG, Y.; KANG, M.; SUN, H.; et al.; All *trans*-retinoic acid release from core-shell type nanoparticles of poly(ϵ -caprolactone)/poly (ethylene glycol) diblock copolymer. **Internacional Journal of Pharmaceutics**. V. 273, P. 95-107, 2004.
- JORNADA, D.; FIEL, L.; BUENO, K. et al.; Lipid-core nanocapsules: mechanisms of self-assembly, control of size and loading capacity. **Soft matter**, v. 8, p. 6646-6655, 2012.
- KÜLKAMP, I. C.; PAESE, K.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, v. 32, p. 2078-2084, 2009.
- LAMPRECHT, A.; TORRES, H.R.; SCHÄFER, U.; LEHR, C. Biodegradable microparticles as a two-drug controlled release formulation: a potential treatment of inflammatory bowel disease. **Journal of Controlled Release**, v. 69, p. 445–454, 2000.
- LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery: a review. **Sciences Techniques et Pratiques Pharmaceutiques**, v. 9, p. 411-418, 1999.
- LINCE, F.; MARCHISIO, D.; BARRESI, A.. Strategies to control the particle size distribution of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 322, p. 505-515, 2008.
- LIU, S.; ZHANG, Z.; HAN, M-Y. Nanometer-sized gold-loaded gelatin/silica nanocapsules. **Advanced Materials**. V. 17. P.1862-1866 , 2005.
- MOLPECERES, J.; GUZMAN, M.; ABERTURAS, R.; CHACON, M.; BERGESM, L. Application of Central Composite Designs to the preparation of Polycaprolactone nanoparticles by solvent displacement. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, p. 206-213, 1996.
- MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(D,L-Lactide) Nanocapsules Prepared by a Solvent Displacement Process: Influence of the Composition on Physicochemical and Structural Properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 5, p. 614-626, 2000.
- MULLER, R. H.; PETERSEN, R. D.; HOMMOSS, A.; PARDEIKE, J.. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**. V. 59, P. 522-530, 2007.
- POHLMANN, A.; WEISS, V.; MERTINS, O.; da SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S.; Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Science**. V. 16, P. 305 – 312, 2002.
- POLETTI, F.; FIEL, L.; DONIDA, B.; RÉ, M.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A.; Controlling the size of poly(hydroxybutyrate-*co*-hydroxyvalerate) nanoparticles prepared by emulsification-diffusion technique using ethanol as surface agent. **Colloids**

and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. V. 324, P. 105 – 112, 2008.

QUAGLIA, F.; OSTACOLO, L.; DE ROSA, G.; LA ROTONDA, M. I.; AMMENDOLA, M.; NESE, G.; MAGLIO, G.; PALUMBO, L.; VAUTHIER, C. Nanoscopic core-shell drug carriers made of amphiphilic triblock and star-diblock copolymers. **Internacional Journal of Pharmaceutics.** V. 324, P. 56 – 66, 2006.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E.. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy.* V. 24, N° 12, P. 1113-1128, 1998.

RONEY, C.; KULKARNI, P.; ARORA, V.. Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease. **Journal of Controlled Release.** V. 108, P. 193-214, 2005.

SAHOO, S. K.; LABHASETWAR, V.; Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Elsevier Science,** V. 8. P. 1112-1120, 2003.

SANTANDER-ORTEGA, M.; LOZANO-LÓPEZ, M. V.; BASTOS-GONZÁLEZ, D.; PEULA-GARCÍA, J. M.; ORTEGA-VINUESA, J. L. Novel core-shell lipid-chitosan and lipid-poloxamer nanocapsules: stability by hydration forces. **Colloid and Polymer Science.** V. 288 P. 159–172, 2010.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova.** V. 26, N° 5, P. 726-737, 2003.

SINHA, V.R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. Polycaprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 278, p. 1–23, 2004.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release,** v. 70, p. 1-20, 2001.

SOUTO, A.; ARAÚJO, J.; NIKOLIC, S.; EGEEA, M. A.. Nanostructured lipid carriers for triamcinolone acetonide delivery to the posterior segment of the eye. **Colloids and surfaces B-Biointerfaces.** V. 88, P. 150-157, 2011.

TEDESCO, A. C.; SIMIONI, A. R.; PRIMO, F. L. Introdução à Nanotecnologia. In: Marcelo M. Morales. (Org.). **Terapias avançadas: células tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde.** Atheneu, cap. 16, p. 237-246, 2007.

VENTURINI, C. G.; JÄGER, E.; OLIVEIRA, C. P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,** v. 375, p. 200-208, 2011.

7. Referências Bibliográficas

VILLANOVA, J. C. O.; OREFICE, R. L.; CUNHA, A. S..
Pharmaceutical Application of Polymers. **Polímeros – Ciência e Tecnologia**. V. 20, P.
51-64, 2010.