



**INSTITUTO  
FEDERAL**  
Rio de Janeiro

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Campus Realengo

Curso de Graduação em Farmácia

Dinah Possidonio dos Santos

**ESTUDO DO IMPACTO DO TENSOATIVO E  
PARÂMETROS DE PRODUÇÃO NO DESENVOLVIMENTO  
DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS**

Rio de Janeiro

2020

DINAH POSSIDONIO DOS SANTOS

**ESTUDO DO IMPACTO DO TENSOATIVO E PARÂMETROS DE  
PRODUÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS  
POLIMÉRICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto Federal do Rio de  
Janeiro, como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadores: Dr. Beatriz Ferreira de  
Carvalho Patricio

Profa. Dr. Ana Ferreira Ribeiro

Rio de Janeiro

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação.

Elaborada por Alane Elias Souza

Bibliotecária - CRB 7 n° 6321

S237

Santos, Dinah Possidonio dos.

Estudo do impacto do tensoativo e parâmetros de produção no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas. / Dinah Possidonio dos Santos, 2020.

56f. :il.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Farmácia) – Instituto Federal do Rio de Janeiro, 2020.

Orientador: Ana Ferreira Ribeiro e Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio.

1. Nanomedicina. 2. Nanopartículas Poliméricas. 3. Caracterização Físico-Química. 4. Desenho Experimental Fatorial. I. Instituto Federal do Rio de Janeiro. Campus Realengo. II. Ribeiro, Ana Ferreira. III. Patricio, Beatriz Ferreira de Carvalho. IV. Título.

COBIB/CReal

CDU 615

DINAH POSSIDONIO DOS SANTOS

**ESTUDO DO IMPACTO DO TENSOATIVO E PARÂMETROS DE  
PRODUÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS  
POLIMÉRICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto Federal do Rio de  
Janeiro, como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em 16 / 06 / 2021.

Banca Examinadora



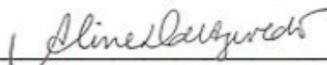
---

Profª Dra. Ana Ferreira Ribeiro - (Orientador)  
Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ)



---

Dra. Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio - (Orientador)  
Instituto Biomédico - IB Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro  
(UNIRIO)



---

Profª. Dra. Aline Damico de Azevedo - (Membro interno)  
Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ)



---

Dra. Michele Álvares Sarcinelli - (Membro externo)  
Instituto de Tecnologia de Fármacos (Farmanguinhos) / Fiocruz

Rio de Janeiro  
2021

Dedico esse trabalho a Deus, aos meus pais, Marcia Possidonio e Marcos Santos e a toda minha família, em especial à memória da minha tia avó Ana Marta que sempre esteve comigo ao longo da minha jornada.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que me sustentou ao longo desta difícil caminhada, que me fortaleceu a cada oração de clamor e hoje a realização desse trabalho é prova de seu amor e compaixão para com seus filhos.

Agradeço aos meus pais que foram e são os meus maiores incentivadores, eles que nunca me permitiram desistir e que sempre estiveram ao meu lado nos momentos de maior angústia, mas também nos de maior felicidade.

Aos meus irmãos por todo carinho, paciência e amor ao longo deste percurso de trabalho.

Agradeço aos meus tios, em especial a minha tia Márcia Cristina, um referencial de profissional de saúde que sempre me apoiou e me aconselhou para tomada das melhores decisões.

À minha avó, Benny Janette, que vibra a cada conquista minha e verá sua primeira neta graduada como Bacharel em Farmácia.

Agradeço a minha tia avó, Ana Marta Possidonio, a quem dedico este trabalho, pois esteve comigo em todas as minhas etapas e evoluções acadêmicas, orando pelo meu sucesso, mas que infelizmente não está mais aqui para comemorar mais esta conquista.

Agradeço a minha família de modo geral, especialmente aqueles que ao longo dos anos entraram em minha vida e se tornaram eternos, como minha madrastra Joelma Lilian que sempre esteve torcendo, orando por mim e vibrando cada conquista.

Agradeço a todos meus amigos e ao meu namorado por me incentivarem a todo momento a não desistir e mostrarem a força que tenho. Em especial agradeço às minhas amigas Ana Carolina Esteves, Isadora Colmann, Letícia Borges, Rayanne Esteves, Susana Suzuki e Thaisa Viana que desde o Ensino Médio estão ao meu lado em todos os momentos mais cruciais.

Agradeço a todos meus amigos de graduação, que sem eles a conclusão desse ciclo não seria possível, a todos nossos momentos de tensão, felicidade, bagunça, por cada risada que nesses cinco anos foram as melhores possíveis. Agradeço em especial meus “grupinhos”: Bruna Soares, Karina Morgado, Vitória Miranda, Stephanny de Araújo, Anne Caroline Marcos, Milena Machado, Diego Barbosa, Juliane Falcão e Tércio Junior.

Agradeço à minha orientadora Beatriz Patrício, por me acolher tão bem desde o início da graduação como minha professora de farmacologia até se tornar minha orientadora. Com muita dedicação e paciência me orientou e aconselhou como superior, profissional de saúde, colega de profissão e amiga. Me guiou com muita diligência e permitiu com que esse trabalho saísse da imaginação e se tornasse real.

Agradeço aos meus professores de graduação, em especial a professora Ana Ribeiro que são exemplos de profissionais e me inspiram todos os dias a me tornar uma farmacêutica tão habilidosa quanto eles.

“Estas coisas vos tenho dito para que  
tenhais paz em mim. No mundo, passais  
por aflições; mas tende bom ânimo; eu  
venci o mundo.”

João 16: 33

## RESUMO

A nanomedicina vem crescendo cada vez mais no campo da nanotecnologia. Nela, destacam-se as nanopartículas poliméricas como vantajoso sistema de entrega de fármacos, que vêm sendo desenvolvidas aspirando variadas aplicações terapêuticas, como liberação controlada do ativo e maior proteção do fármaco frente ao sistema biológico. Entretanto compreender como fatores de produção e composição impactam nas estruturas finais deles ainda é pouco conhecido. Assim, esse trabalho visou determinar a influência da amplitude e tempo de sonicação, bem como do tensoativo sobre o tamanho médio, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta de nanopartículas poliméricas (NPP). Para designar os efeitos particulares dessas variáveis foi usado a metodologia do desenho experimental (DoE) por análise fatorial  $2^3$  com ponto central. Ao todo foram propostos 18 experimentos e como variáveis independentes foram avaliados: tipo de tensoativo: álcool polivinílico (PVA) ou Pluronic F68; tempo de sonicação: 2 min, 6 min e 10 min; e amplitude de sonicação: 10%, 30% e 50% sobre as variáveis dependentes. As NPP foram produzidas pelo método de polimerização a partir de polímeros pré-formados pela técnica de emulsificação simples seguida de evaporação do solvente. Em seguida, elas foram lavadas por ultracentrifugação e caracterizadas quanto o tamanho por espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta por mobilidade eletroforética. Os modelos gerados foram considerados significativos ( $p < 0,05$ ) para as três variáveis dependentes analisadas (tamanho médio, PDI e PZ). Todas as variáveis independentes influenciam no tamanho e PDI, no entanto, especial destaque foi observado ao tipo de tensoativo, no qual de uma forma geral as NPP produzidas com PVA apresentaram menor tamanho médio e PDI. As condições ideais do processo foram estipuladas e através dos modelos gerados, foi proposta a seguinte formulação: PVA como tensoativo; 2 minutos de tempo de sonicação; e 10% de amplitude. Isto posto, a metodologia de DoE foi eficiente ajudando a entender como determinados parâmetros influenciam na produção das NPPs, permitindo obtê-las de forma eficiente.

Palavra-chave: Nanomedicina; Nanopartículas Poliméricas; Caracterização Físico-Química; Desenho Experimental Fatorial.

## ABSTRACT

In the nanotechnology field, nanomedicine has been growing. Polymeric nanoparticles (NPP) stand out as an advantageous drug delivery system since it provides controlled release of the active and protection of the drug against the biological system. However, understanding how production and composition of the particles their final structures are still unknown. Thus, this work aimed to determine the influence of the amplitude and sonication time, as well as the surfactant type on the average size, polydispersity index (PDI) and zeta potential of NPP. To designate the effects of these variables, the methodology of experimental design (DoE) by factor analysis  $2^3$  with a central point was used. Eighteen experiments were proposed, and as independent variables were evaluated: type of surfactant: polyvinyl alcohol (PVA) or Pluronic F68; sonication time: 2 min, 6 min and 10 min; and sonication amplitude: 10%, 30% and 50%. The NPP were produced by the polymerization method from pre-formed polymers using the technique of simple emulsification followed by solvent evaporation. Then, they were washed by ultracentrifugation and characterized for size by dynamic light scattering and zeta potential by electrophoretic mobility. The generated models were considered significant ( $p < 0.05$ ) for the three dependent variables analyzed (mean size, PDI and PZ). All independent variables influence the size and PDI, however, special emphasis was observed on the type of surfactant, in which, in general, the NPP produced with PVA had a smaller mean size and PDI. The ideal conditions of the process were analysed in the models, the following formulation was proposed: PVA as a surfactant; 2 minutes of sonication time; and 10% of amplitude. That said, the DoE methodology was efficient in helping to understand how certain parameters influence the production of NPPs, allowing to obtain an optimized formulation.

Keywords: Nanomedicine; Polymeric Nanoparticles; Physical-Chemical Characterization; Factorial Experimental Design.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- EXEMPLO DE NANOFORMULAÇÕES. ....	21
FIGURA 2 - ESTRUTURA DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS. ....	23
FIGURA 3 - DIFERENTES METODOLOGIAS PARA PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS. ....	24
FIGURA 4 - MÉTODO DE PREPARO DE NANOPRECIPITAÇÃO.....	26
FIGURA 5 - EXEMPLO EMULSÃO SIMPLES (A) E DUPLA EMULSÃO (B). ....	28
FIGURA 6 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE NPPS.....	35
FIGURA 7 - GRÁFICO DE DISPERSÃO BASEADO NOS VALORES OBTIDOS EXPERIMENTALMENTE E CALCULADO PELO MODELO PARA A VARIÁVEL DEPENDENTE TAMANHO DE PARTÍCULA, CONSIDERANDO OS TENSOATIVOS. PLURONIC F68(A); PVA (B). ....	41
FIGURA 8 - GRÁFICO DE DISPERSÃO BASEADO NOS VALORES OBTIDOS EXPERIMENTALMENTE E CALCULADO PELO MODELO PARA A VARIÁVEL DEPENDENTE PDI, CONSIDERANDO OS TENSOATIVOS: PLURONIC F68 (A); PVA (B). ....	44
FIGURA 9 - GRÁFICO DE DISPERSÃO BASEADO NOS VALORES OBTIDOS EXPERIMENTALMENTE E CALCULADO PELO MODELO PARA A VARIÁVEL DEPENDENTE PZ, CONSIDERANDO OS TENSOATIVOS.....	46

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - NANOFORMULAÇÕES COMERCIAIS APLICADAS À TERAPIA CLÍNICA.....	20
QUADRO 2 - VALORES CODIFICADOS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES.....	36
QUADRO 3 - DESENHO EXPERIMENTAL - VARIAÇÃO DOS FATORES: TENSOATIVO (A); TEMPO DE SONICAÇÃO (B); AMPLITUDE (C). .....	37

## LISTA DE TABELA

TABELA 1 - DESENHO EXPERIMENTAL - VARIÁVEIS INDEPENDENTES: TENSOATIVO (A); TEMPO DE SONICAÇÃO (B); AMPLITUDE (C) E VARIÁVEIS DEPENDENTES: POTENCIAL ZETA (PZ); ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE (PDI); TAMANHO MÉDIO.....	39
TABELA 2 - TABELA ANÁLISE DE VARIÂNCIA - TAMANHO MÉDIO.....	41
TABELA 3 - TABELA ANÁLISE DE VARIÂNCIA - PDI. ....	44
TABELA 4 - TABELA ANÁLISE DE VARIÂNCIA - PZ.....	46
TABELA 5 - FORMULAÇÕES OTIMIZADAS .....	48
TABELA 6 - RESULTADO EXPERIMENTAL DA FORMULAÇÃO OTIMIZADA. ....	48

## LISTA ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
A/O	Água/Óleo
A/O/A	Água/Óleo/Água
ANOVA	Análise de Variância
CMC	Concentração Micelar Crítica
CS	Quitosana
DCM	Diclorometano
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DoE	Desenho Experimental
EO	Óxido de Etileno
EPR	Efeito de Permeabilidade e Retenção Aumentada
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HPMA	N-(2- hidroxipropil)-metacrilato
IFAs	Insumos Farmacêuticos Ativos
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NPPs	Nanopartículas Poliméricas
NPs	Nanopartículas

PCL	Poli (caprolactona)
PDI	Índice de Polidispersividade
PEO	Copolímero de óxido de etileno
PGA	Poli (ácido glutâmico)
PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Poli (ácido D, L-láctico-co glicólico)
PO	Óxido de Propileno
PPD	Poli (p-dioxanona)
PPO	Copolímero de óxido de propileno
PVA	Álcool Polivinílico
PZ	Potencial Zeta
QbD	Qualidade por Design
R <sup>2</sup>	Coeficiente de Determinação
R <sup>2</sup> Adj	Coeficiente de Determinação Ajustado
R <sup>2</sup> Pred	Coeficiente de Determinação Predito

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
<b>1.2.1 Nanomedicina</b> .....	17
<b>1.2.2 Tipos de nanoformulações</b> .....	20
<b>1.2.3 Nanopartículas Poliméricas</b> .....	21
<b>1.2.4 Métodos de preparação de nanopartículas a partir de polímeros pré- formados</b> .....	25
1.2.4.1 Nanoprecipitação.....	25
1.2.4.2 <i>Salting-Out</i> .....	26
1.2.4.3 Emulsificação seguida por difusão do solvente.....	26
1.2.4.4 Emulsificação seguida de evaporação do solvente.....	27
<b>1.2.5 Caracterização de nanopartículas poliméricas</b> .....	30
1.2.5.1 Distribuição de Tamanho.....	30
1.2.5.2 Carga Superficial.....	31
1.2.5.3 Monitoramento de pH.....	32
1.2.5.4 Avaliação Morfológica.....	32
1.3 OBJETIVOS.....	34
<b>1.3.1 Objetivo Geral</b> .....	34
<b>1.3.2 Objetivos Específicos</b> .....	34
<b>2 DESENVOLVIMENTO</b> .....	34
2.1 METODOLOGIA.....	34
<b>2.1.1 Metodologia Experimental</b> .....	34
2.1.1.1 Preparo de nanopartículas poliméricas.....	35
2.1.1.2 Análise Experimental.....	36
<b>2.1.2 Caracterização das nanopartículas poliméricas</b> .....	38
2.1.2.1 Tamanho de partícula e índice de polidispersão.....	38
2.1.2.2 Potencial Zeta.....	39
2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
2.2.1 Tamanho Médio.....	40
2.2.2 Índice de Polidispersividade.....	43
2.2.3 Potencial Zeta.....	45
2.2.4 Otimização.....	47
<b>3 CONCLUSÃO</b> .....	49
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	50

## 1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia pode ser entendida como um campo multidisciplinar que se desenvolve cada vez mais na ciência. Seu princípio é marcado pelo discurso intitulado “*There is plenty of room down there – an invitation for a new field of Physics*” proferido pelo físico Richard Feynman em 1959, no Encontro Anual da *American Physical Society* (GUPTA *et al.*, 2013; FEYNMAN, 1960; SCHULZ, 2018). Esta tecnologia é baseada em sistemas funcionais em escala nanométrica com tamanhos variados (1 a 1000 nm), que são aplicadas de acordo com suas propriedades físico-químicas, nos mais diferentes campos, desde o eletrônico até na área médica (BAMRUNGSAP *et al.*, 2012; GUPTA *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2010).

A produção dessas estruturas nanométricas resulta em dispositivos com diferentes características físicas, químicas e biológicas, as quais são dependentes de atributos como: tamanho estrutural, condutividade, reatividade e conformação funcional. A área da nanotecnologia aplicada a medicina é conhecida como nanomedicina, e é responsável por ações de prevenção, diagnóstico e tratamento para doenças, sendo este último caso uma estratégia de melhorar propriedades biofarmacológicas dos insumos farmacêuticos ativos (IFAs) (BAMRUNGSAP *et al.*, 2012; GUPTA *et al.*, 2013; MAZZEO; SANTOS, 2018).

Os sistemas nanoestruturados (nanoformulações) podem ser entendidos como um conjunto variado de formulações utilizadas para entrega de IFAs em escala nanométrica. A partir desses, agentes terapêuticos podem ser encontrados absorvidos ou conjugados na superfície de partículas, encapsulados no interior delas ou até dissolvidas em suas matrizes (BAMRUNGSAP *et al.*, 2012). A utilização deste sistema demonstrou ser promissor por melhorar a eficácia terapêutica, proteger o composto encapsulado passível de degradação frente a ambientes desfavoráveis, encobrir propriedades adversas relacionadas a ele e reduzir os efeitos tóxicos relacionados aos agentes administrados. Esses últimos ocorrem graças à falta de diferenciação de alguns medicamentos entre tecidos normais e patogênicos (AGRAHARI *et al.*, 2019; SANEJA *et al.*, 2018).

Dentre alguns exemplos de nanoformulações, pode se destacar os seguintes carreadores: lipossomas, micelas, nanoemulsões, nanotubos de carbono, ciclodextrinas, nanopartículas lipídicas e nanopartículas poliméricas (NPP) (AGRAHARI *et al.*, 2019). O emprego dessa última como forma de entrega de fármaco

vem crescendo na literatura, uma vez que esse sistema apresenta vantagens como, encapsular e liberar agentes terapêuticos de maneira controlada nos sítios específicos graças a sua efetiva distribuição e, com isso, levam a uma diminuição dos efeitos colaterais. As NPP também permitem realizar modificações na superfície que irão auxiliar na entrega específica destas nanoestruturas (MARQUES, 2017; PIKTEL *et al.*, 2016; RIZZO *et al.*, 2013; THORLEY; TETLEY, 2013). Ademais, essas nanoestruturas podem ser produzidas por diferentes metodologias onde variações entre os meios de produção, a composição e alguns parâmetros como, por exemplo, o polímero utilizado, a concentração do tensoativo, o solvente orgânico, a natureza do óleo, a concentração e solubilidade do fármaco irão influenciar nas propriedades físico-químicas das partículas e, com isso, a distribuição no organismo (RAO; GECKELER, 2011; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). A metodologia de desenho experimental por análise fatorial tem sido empregada em alguns trabalhos com o intuito de otimizar a produção de NPP (TROIANO *et al.*, 2016; SONI *et al.*, 2020). Por conseguinte, esse trabalho visa estudar a influência dos parâmetros de produção de nanopartículas poliméricas, na distribuição de tamanho e carga de superfície das mesmas, através de um desenho experimental.

## 1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.2.1 Nanomedicina

A nanomedicina é uma área de pesquisa dentro da nanotecnologia que estuda as aplicações médicas que a mesma oferece. Dentro da área de entrega de fármacos, os nanossistemas apresentam grandes vantagens como: melhorar a farmacocinética e conseqüentemente sua eficiência, direcionar a entrega dos agentes terapêuticos provocando a redução dos efeitos adversos, além de melhorar estabilidade das moléculas ativas (CSUK, 2014; BAMRUNGSAP *et al.*, 2012). Além disso, as nanoformulações são planejadas a fim de melhorar a biodisponibilidade, aumentar a proteção gastrointestinal de fármacos administrados por via oral; evadir do sistema retículo endotelial e conseqüentemente preservar uma maior circulação na corrente sanguínea; e aumentar a seletividade dos fármacos, garantindo uma entrega específica aos tecidos. Ademais, o aumento de seletividade, que leva a uma diminuição da toxicidade dos ativos, é atribuído ao processo de vetorização, dividido

em dois métodos: vetorização passiva e vetorização ativa (DUNCAN; GASPAR, 2011; CHO *et al.*, 2008, MARQUES, 2017).

Em condições normais o endotélio se apresenta íntegro, com fenestrações de tamanho entre 5 e 10 nm, nestas condições somente fármacos livres conseguem atravessar o tecido íntegro. Porém, em doenças como tumores ou tecidos inflamados e infecciosos, a vasculatura apresenta-se anormal, ou seja, uma hipervascularização não estruturada e com arquitetura defeituosa que exibe um espaçamento maior entre as células endoteliais (podendo chegar a 800 nm), portanto apresentando maior permeabilidade (ALEXIS *et al.*, 2008; FANG; NAKAMURA; HOBBS *et al.*, 1998; MAEDA, 2011; NICHOLS; BAE, 2014; THORLEY; TETLEY, 2013). Essa anormalidade ocorre graças ao processo de angiogênese, que visa fornecer oxigênio e nutrientes para tais locais, somados a um sistema linfático deficiente. Desta forma, esse fato permite que não só os fármacos livres, mas, também as nanoformulações como, micelas, lipossomas, nanopartículas e outras partículas penetrem nestes tecidos (ALEXIS *et al.*, 2008; FANG; NAKAMURA; HOBBS *et al.*, 1998; MAEDA, 2011; NICHOLS; BAE, 2014; THORLEY; TETLEY, 2013).

Todavia, o acúmulo das nanoestruturas neste espaço intersticial é garantido, pois com comprometimento do sistema linfático a depuração dessas nanoformulações se torna limitado, desta maneira, há diminuição da saída do material do tecido, prolongando o tempo das nanoformulações no local lesionado. Diferentemente do que ocorre com os fármacos livres, que mesmo estando presente no espaço intersticial conseguem voltar para circulação sanguínea por difusão (HOBBS *et al.*, 1998).

O acúmulo das nanoformulações somente no tecido doente favorece a diminuição de efeitos adversos que poderiam acontecer caso estes nanosistemas tivessem em contato com tecidos saudáveis, além de garantir um tratamento mais eficiente. Todo esse processo é designado como efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR, do inglês *Enhanced Permeability and Retention*) e em virtude de sua dependência às propriedades patológicas do tecido alvo, este direcionamento é conhecido como vetorização passiva (BAMRUNGSAP *et al.*, 2012; BROCHADO, 2013, RIZZO *et al.*, 2013; THORLEY; TETLEY, 2013).

Esse método possui limitações, pois são dependentes de fatores ligados às características fisiopatológicas da doença. Uma outra solução para garantir a seletividade dos tratamentos é o sistema de vetorização ativa, que envolve a funcionalização do sistema de distribuição terapêutico por ligação de moléculas de

afinidade, como anticorpos, proteínas e peptídeos à superfície das nanoestruturas para que interajam com receptores celulares específicos (PIKTEL *et al.*, 2016; MARQUES, 2017).

No universo farmacêutico encontram-se diversos IFAs que possuem tanto a vetorização passiva, quanto à ativa, como tecnologia para entrega específica dos fármacos. No primeiro caso, pode-se exemplificar, o mais antigo medicamento aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) à base de nanotecnologia, o Doxil<sup>®</sup>, uma formulação lipossomal da doxorrubicina utilizada para o tratamento do sarcoma de Kaposi associado ao HIV. Já como exemplo de conjugação ativa, também aprovado pela FDA, foi o conjugado anticorpo-fármaco, trastuzumabe entansina conjugado a um anticorpo monoclonal IgG1 anti-HER2 humanizada, o Kadcyra<sup>®</sup>, utilizado para e pacientes com câncer de mama HER2-positivo metastático (MACHADO, 2018; MOREIRA, 2013; ROCHE, 2021).

O mercado apresenta variados tipos de nanossistemas já comercializados, (Quadro 1). De acordo com Brochado (2013) estas estruturas são aplicadas de acordo com os casos específicos de modo que garanta vantagem, custo-benefício e segurança.

**Quadro 1** - Nanoformulações comerciais aplicadas à terapia clínica.

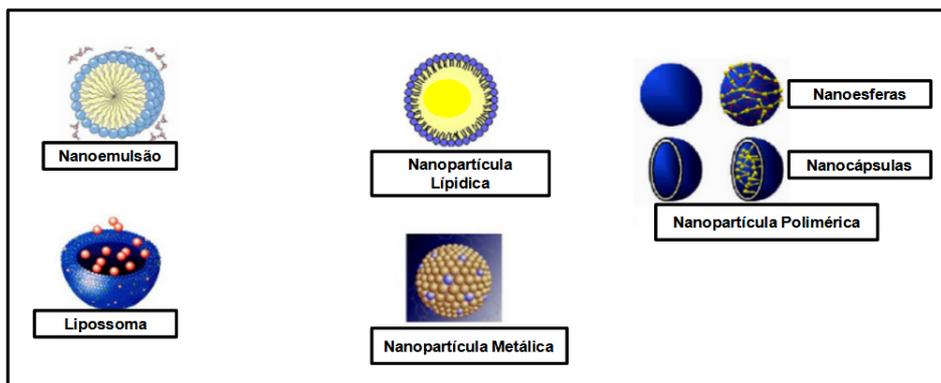
Nome	Fármaco	Formulação	Aplicação Terapêutica	Referência
Abraxane®	Paclitaxel	NP-albumina	Câncer de mama; Câncer de pulmão de células não pequenas); Câncer de pâncreas.	[A]; [B]
Ambisome®	Anfotericina B	Lipossoma	Micoses profundas e/ou sistêmicas severas; Terapia primária da leishmaniose visceral; Tratamento de infecções fúngicas sistêmicas em pacientes imunocomprometidos e outras infecções.	[A]; [C]
Doxil®	Doxorrubicina	Lipossoma	Sarcoma de Kaposi relacionado à AIDS; Câncer de mama; Câncer de ovário e outros tumores sólidos.	[A]; [B]; [C]
Genexol-PM®	Paclitaxel	Micela Polimérica	Câncer de mama; Câncer de pulmão de células não pequenas; Câncer de ovário.	[B]; [C]
Marqibo®	Vincristina	Lipossoma	Linfoma não-Hodgkin agressivo.	[B]
Visudyne®	Verteporfina	Lipossoma	Degeneração macular relacionada à idade.	[A]; [C]

Fonte: [A] Farjadian *et al.* (2019); [B] Machado (2013); [C] Svenson (2014).

### 1.2.2 Tipos de nanoformulações

As nanoformulações são caracterizadas de acordo com suas propriedades físico-químicas, porém todas possuem como objetivo transportar o fármaco até o órgão doente de forma específica, melhorando o efeito farmacológico e diminuindo o efeito tóxico (BROCHADO, 2013). Na literatura os principais sistemas de nanopartículas descritos são: lipossomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas, nanoemulsões e nanopartículas metálicas, demonstrado na Figura 1.

**Figura 1-** Exemplo de nanoformulações.



Fonte: Figura adaptada de Brochado (2013).

As nanopartículas (NPs) podem ser definidas como pequenas partículas sólidas coloidais desenvolvidas a partir de polímeros biodegradáveis, lipídios ou materiais inorgânicos (KHAN; SAEED; KHAN, 2017; LUIZ, 2018). Diversos benefícios são empregados as NPs, dentre eles pode-se destacar a facilidade de modificação da superfície da partícula com conjugação de outras moléculas, o aumento da biodisponibilidade e solubilidade de muitos agentes terapêuticos, capacidade de carrear tanto moléculas hidrofílicas quanto hidrofóbicas, aumento de meia-vida plasmática, maior tempo de circulação sistêmica e maior proteção contra opsonização de proteínas do sistema imune. Ademais, estas nanoformulações têm atraído atenção, graças às suas potencialidades terapêuticas, à maior estabilidade nos fluidos biológicos e tempo de armazenamento em prateleira. No mercado clínico já se encontram formulações baseadas em NPs como é o caso do Abraxane<sup>®</sup>, representado no Quadro 1 (SANEJA *et al.*, 2018; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

### 1.2.3 Nanopartículas Poliméricas

As nanopartículas poliméricas (NPPs) são partículas coloidais de estrutura esférica que possuem uma variação de tamanho entre 10 a 1000 nm e possuem a capacidade de veicular moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas (VENTOLA, 2017). Estas partículas podem ser sintetizadas a partir de polímeros biodegradáveis, que são materiais de fácil decomposição em meio fisiológico, que podem ser sintéticos ou naturais (OLIVEIRA, 2014). Elas são capazes de carrear diversos ativos como, fármacos, proteínas, ácidos nucleicos, dentre outros, e por isso são utilizados para

inúmeras aplicações médicas (APOLINÁRIO *et al.*, 2020; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

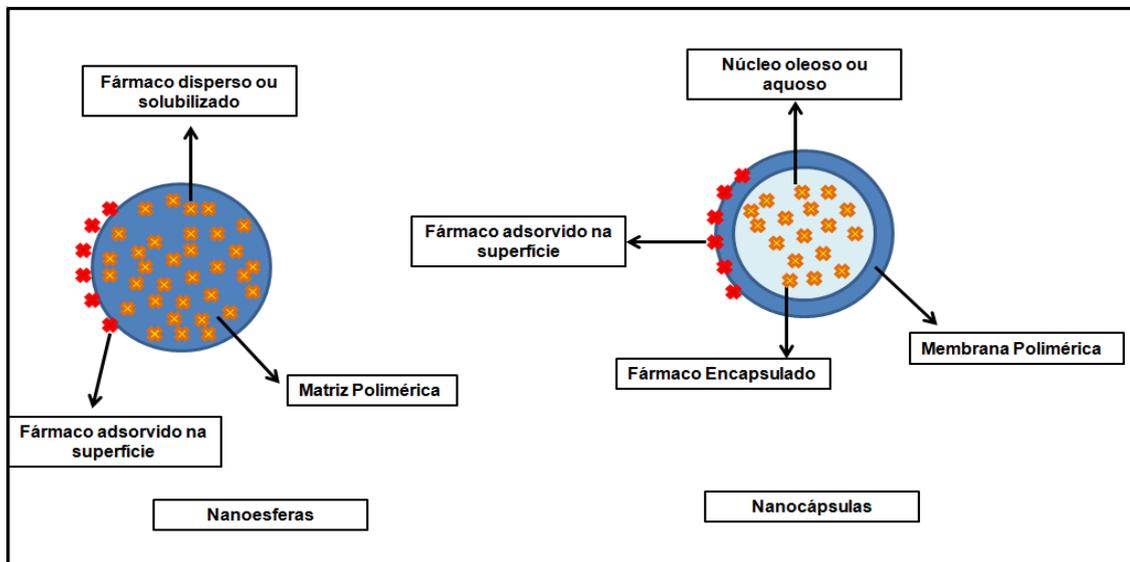
Estes sistemas têm sido desenvolvidos visando variadas aplicações terapêuticas, como a administração parenteral, oral, oftálmica ou nasal (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Além disto, uma das áreas mais promissoras na utilização das NPPs é a vetorização ativa da superfície, almejando uma distribuição mais seletiva do fármaco e, assim, um aumento do índice terapêutico (MACHADO, 2018; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O controle da liberação das moléculas ativas em sítios de ação específicos, pode ser dado através da utilização de vetores e do regime de dosagem das substâncias. Estes nanossistemas também apresentam vantagens como: liberação controlada do ativo, reduzindo toxicidade e aumentando eficácia terapêutica; maior proteção do IFA frente ao sistema biológico; maior estabilidade do composto encapsulado nas NPPs; e maior biodisponibilidade em relação ao fármaco livre (MACHADO, 2018; RIZZO *et al.*, 2013; TRACZYNSKI, 2016). Além disso, os agentes encapsulados podem ser liberados de forma controlada e prolongada baseado na difusão das moléculas terapêuticas através da matriz polimérica ou a partir da erosão ou degradação da superfície do polímero (AGRAHARI *et al.*, 2019; BAMRUNGSAP *et al.*, 2012; KAMALY *et al.*, 2012).

De uma forma geral, para produção de nanopartículas poliméricas são utilizados, preferencialmente, polímeros biodegradáveis, ou seja, capazes de serem degradado pelo organismo formando compostos compatíveis com o mesmo e que sejam naturalmente expelidos por ele, com baixa toxicidade e imunogenicidade, assim se houver produto de degradação, eles também devem ser atóxicos e não imunogênicos (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009). Os polímeros com essas características podem ser sintéticos ou naturais. Os primeiros mais comumente utilizados na literatura são poli (ácido D, L-lático-co glicólico) (PLGA), poli (ácido lático) (PLA), poli (ácido glutâmico) (PGA), poli (p-dioxanona) (PPD), poli (caprolactona) (PCL); copolímeros de N-(2- hidroxipropil)-metacrilato (HPMA). Já como exemplo dos polímeros naturais biodegradáveis mais empregados são celulose, albumina, gelatina e quitosana (CS) (BROCHADO, 2013; SANEJA *et al.*, 2018; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009). Franchetti e Marconato (2006) descrevem em seu trabalho que os polímeros alifáticos PLA, PGA e PLGA têm sido muito empregados em uso biomédicos, pois apresentam uma biodegradabilidade simples, através de uma hidrólise na cadeia éster em meio aquoso, ou seja, podendo ocorrer em locais

como os fluidos corporais. Além disso, os produtos de degradação são metabolizados em dióxido de carbono e água, sendo facilmente excretados pela urina (CHANDRA, R; RUSTGI, RENU, 1998).

As NPPs podem ser classificadas de duas maneiras dependendo de sua estrutura final, podendo ser nanoesferas ou nanocápsulas (Figura 2). As primeiras são formadas a partir de uma rede polimérica denominada de matriz polimérica, esta estrutura não possui um núcleo e as moléculas do fármaco são encontradas dispersas ou solubilizadas na matriz ou adsorvidas na superfície destas partículas, nestas estruturas ocorre a vinculação de fármacos hidrofóbicos. Já as nanocápsulas são sistemas vesiculares que apresentam um núcleo oleoso ou aquoso envolvidos por uma membrana polimérica, nestas nanoestruturas os fármacos podem ser encontrados encapsulados no núcleo ou adsorvido na membrana polimérica, contando com a vantagem da possibilidade de vincular mais de um fármaco com polaridades distintas, ou seja, um hidrofílico e outro hidrofóbico (APOLINÁRIO *et al.*, 2020; GOTO, 2011; LUIZ, 2018; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

**Figura 2** - Estrutura das nanopartículas poliméricas.

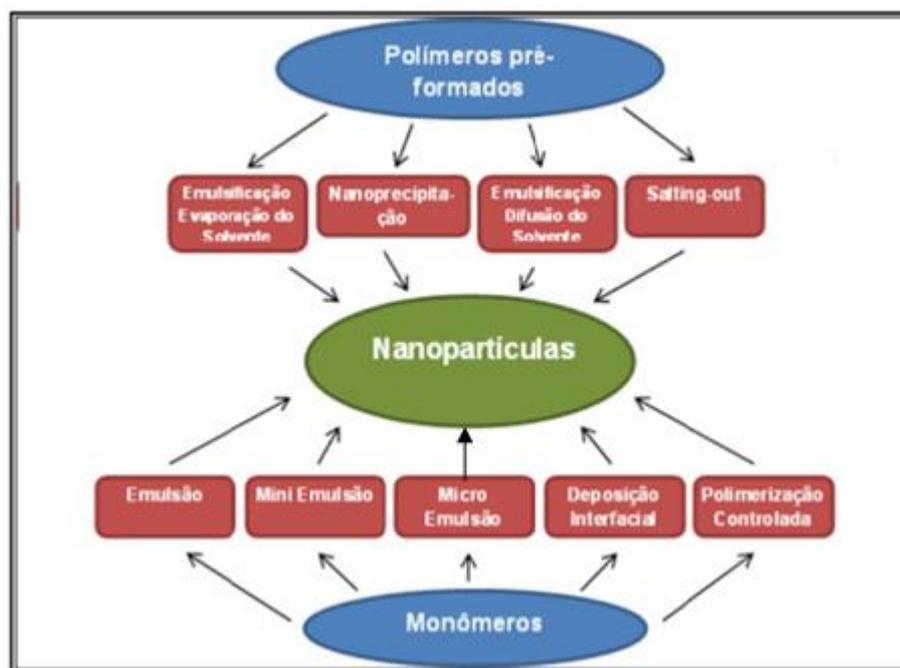


Fonte: Autor (2021).

As metodologias de produção de nanopartículas poliméricas podem ser divididas em dois grandes grupos: polimerização *in situ* e a polimerização a partir de polímeros pré-formados (Figura 3). A primeira, consiste na utilização de monômeros para síntese do polímero ao mesmo tempo em que encapsula o ativo (VAUTHIER;

BOUCHEMAL, 2009). Essa metodologia apresenta algumas desvantagens como: presença de monômeros (moléculas simples que dão origem à unidade de repetição do polímero) e oligômeros (estrutura em cadeia com peso molecular considerado baixo, sendo algumas vezes empregados como sinônimo de pré-polímeros) misturados; apresentar monômeros e oligômeros residuais, ou seja, não há uma formação da estrutura do polímero como um todo; ocorrer ligação covalente entre os monômeros e o fármaco e conseqüentemente alterar propriedades do ativo (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

**Figura 3** - Diferentes metodologias para produção de nanopartículas poliméricas.



Fonte: Adaptado de Carraro (2013).

O método de preparo comumente usado para as NPPs se dá a partir de polímeros pré-formados, pois é mais facilmente controlado e possui maior rendimento (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009). A partir desse método diferentes técnicas são descritas na literatura (Figura 3): deslocamento do solvente ou nanoprecipitação; *salting-out*; emulsificação seguida por difusão do solvente; e emulsificação seguida por evaporação do solvente (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SOPPIMATH *et al.*, 2001; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

## 1.2.4 Métodos de preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados

### 1.2.4.1 Nanoprecipitação

O método de nanoprecipitação consiste na precipitação ou deposição interfacial do polímero pré-formado, podendo obter nanoesferas e nanocápsulas de acordo com a preparação (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; RAO; GECKELER, 2011; MARTÍNEZ RIVAS *et al.*, 2017). De maneira geral, a técnica consiste em dissolver o polímero em solvente orgânico polar, como acetonitrila ou acetona, junto ao princípio ativo, formando uma fase orgânica. Nesta mesma fase pode-se utilizar um tensoativo a fim de evitar processos como a coalescência (GIORDANI, 2012; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

Já a fase aquosa é composta por uma solução contendo tensoativo hidrofílico e água. O modo de preparo se baseia em formar uma emulsão entre as fases orgânica e aquosa, através de um gotejamento constante e uma agitação branda, que em seguida segue para remoção do solvente através de pressão reduzida, obtendo-se as nanopartículas (Figura 4) (RAO; GECKELER, 2011; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). Na descrição metodológica acima obtém-se nanoesferas, onde o princípio ativo encontra-se disperso em uma matriz polimérica. Para obter nanocápsulas o princípio ativo é inicialmente dissolvido em óleo ou água e, em seguida, emulsificado na fase orgânica antes que a mesma seja dispersa na fase aquosa (FONSECA, 2012; GIORDANI, 2012; RAO; GECKELER, 2011; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

**Figura 4 - Método de preparo de nanoprecipitação.**



Fonte: Imagem adaptada de Schaffazick *et al.* (2003).

#### 1.2.4.2 *Salting-Out*

Este método é uma técnica fundamentada no efeito *salting-out* que leva à formação de nanoesferas (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012; HOLKEM *et al.*, 2015). O polímero e o agente terapêutico são dissolvidos num solvente orgânico polar, formando a fase interna. A fase externa é dada pelo uso de um tensoativo junto a uma solução aquosa saturada com agente de *salting out*, que podem ser agentes eletrólito como, cloreto de magnésio, cloreto de cálcio, acetato de magnésio; ou não eletrólitos como a sacarose. As fases são dispersas sob agitação vigorosa e temperatura ambiente formando uma emulsão O/A, esta emulsão é então diluída um volume suficiente de água, permitindo a difusão do solvente orgânico para a fase externa, impulsionando a formação de nanoesferas, que é separada do agente *salting-out* e do tensoativo a partir de uma ultracentrifugação (FONSECA, 2012; OLIVEIRA, 2014; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

#### 1.2.4.3 Emulsificação seguida por difusão do solvente

Essa técnica é uma adaptação no método de *salting-out*. Nesta metodologia a fase interna é composta por um solvente orgânico miscível em água, por um polímero dissolvido na solução de solvente saturada e pelo agente terapêutico. Já a fase externa por sua vez é composta por uma solução aquosa contendo um tensoativo, as fases são emulsificadas perante vigorosa agitação (FONSECA, 2012; GOTO, 2011; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

Em seguida a adição de água ao sistema acarreta em uma difusão entre as fases, a posterior evaporação do solvente garante a formação de NPPs dispersas em água. Em casos em que o agente terapêutico é lipofílico e insolúvel no solvente orgânico ele deve ser previamente dissolvido em um óleo e depois adicionado à fase interna, formando assim nanocápsulas (FONSECA, 2012; GOTO, 2011; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

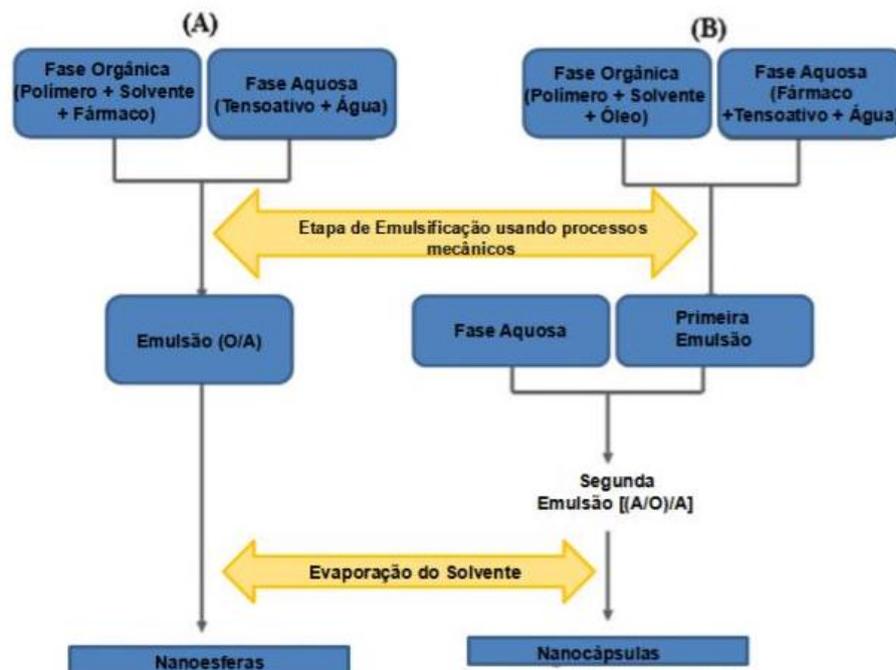
#### 1.2.4.4 Emulsificação seguida de evaporação do solvente

Essa técnica permite obter nanocápsulas e nanoesferas (RAO; GECKELER, 2011; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). Ela apresenta vantagens frente as outras em alcançar emulsões estáveis, controle do tamanho de partícula e incorporação de fármacos lipofílicos e hidrofílicos (RAO; GECKELER, 2011; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

Na emulsão simples, a fase orgânica é formada a partir da mistura entre o polímero dissolvido num solvente orgânico pouco solúvel em água, na maioria das vezes utilizam-se solventes clorados, pois eles apresentam baixa hidrossolubilidade, baixo ponto de ebulição e boa solubilização de inúmeros princípios ativos. Em seguida, o fármaco é dissolvido ou disperso nesta solução orgânica (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

A fase aquosa é formada através de um tensoativo solubilizado em água formando uma solução aquosa. Por meio de uma energia elevada, ambas as fases são agitadas com auxílio de equipamentos, como o sonificador de ponta, formando uma emulsão (figura 5A). A emulsão formada é submetida à evaporação sob baixa pressão para eliminação do solvente orgânico, permitindo assim a precipitação do polímero que pode ser coletado através da ultracentrifugação. Os precipitados coletados são lavados com água destilada para remover possíveis aditivos restantes, ao fim de toda produção descrita obtém-se, nanoesferas (MOREIRA, DIAS; CORREIA, 2016; MOREIRA, 2015; RAO; GECKELER, 2011; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

**Figura 5** - Exemplo emulsão simples (A) e dupla emulsão (B).



Fonte: Imagem adaptada de Vauthier; Bouchemal (2009).

O método de emulsificação dupla segue basicamente o mesmo método de produção, o que diferencia esta técnica é a formação de um sistema duplo (Figura 5). Forma-se sistemas de nanocápsulas para administração de fármacos hidrofílicos e/ou hidrofóbicos dependendo de qual fase o fármaco está disperso (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

As emulsões duplas do tipo A/O/A são compostas por uma fase orgânica e uma fase aquosa que formam uma primeira emulsão do tipo A/O, esta emulsão então é vertida a outra fase aquosa e sob processos mecânicos gera uma segunda emulsão A/O/A que segue para etapa de evaporação do solvente e ao fim obtém-se nanocápsulas (Figura 5B), para casos de fármacos hidrofóbicos, os mesmos são dissolvidos em óleo na fase orgânica (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009).

Conforme descrito, as nanopartículas poliméricas possuem diferentes maneiras de serem produzidas. Além disso, uma vez escolhido o método de produção pode-se ainda variar na composição do polímero, do tensoativo e do solvente orgânico; da concentração de fármaco e nos parâmetros de fabricação como,

agitação/sonicação, amplitude e centrifugação. À vista disso, são geradas partículas de diferentes características físico-químicas que podem ser empregadas para diversos fins de acordo com o objetivo final da pesquisa (RAO; GECKELER, 2011; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). Sabe-se que alteração em alguns parâmetros tecnológicos, por exemplo, a concentração e tipo do polímero utilizado influenciam no tamanho obtido pelas partículas, isto porque polímeros que apresentam massa molar e concentração mais elevadas tendem a formar soluções com uma maior viscosidade, logo diminuem a força de cisalhamento e conseqüentemente podem induzir a formação de partículas maiores (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012; ARAÚJO, J. *et al.*, 2009; LEGRAND, P. *et al.*, 2007).

A escolha dos tensoativos é outro ponto de extrema relevância para as características das NPPs, a depender da partícula que está sendo produzida, ou seja, nanoesferas ou nanocápsulas, deve-se empregar o tensoativo na fase correta da emulsão. Tensoativos como álcool polivinílico (PVA) são muito empregado em literatura para produção de NPPs, eles localizam-se na superfície das moléculas emulsificadas e quanto maior for sua concentração, menor será o tamanho das nanopartículas obtidas. Porém sua quantidade no meio não deve ultrapassar a concentração micelar crítica (CMC), pois acima desta as dimensões das partículas não são mais afetadas (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012).

Um dos parâmetros de produção externos mais pontuados e importantes é o processo de sonicação. Ele é devidamente empregado na produção de NPP a fim de aumentar a superfície de contato entre as fases, reduzir o tamanho das gotículas e, conseqüentemente, proporcionar menores diâmetros de nanopartículas (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012). No trabalho de Gryparis e seus colaboradores (2008) foram produzidas nanopartículas de PLGA-mPEG de cisplatina e o tamanho médio e índice de polidispersividade (PDI) dessas foram reduzidos graças ao aumento do tempo de sonicação pois garantiu uma entrada maior de energia de cisalhamento na preparação.

Dessa forma, a metodologia de desenhos experimentais (DoE) vem sendo cada vez mais empregados em literatura, exemplificam-se os trabalhos de Soni e colaboradores (2020), Diwan e colaboradores (2020), Troiano e colaboradores (2016) e Deepak e colaboradores (2010), nos quais cada um deles aborda de maneiras distintas que a aplicação dessa metodologia ajuda a compreender como os

parâmetros de produção afetam as características das nanopartículas obtidas. Essa metodologia guiada pela abordagem de Qualidade por Design (QbD) são muito empregados na indústria farmacêutica em busca de produzir produtos alvo de alta qualidade, sem que haja excesso de custo, de trabalho e atingindo os objetivos de segurança e eficácia (TROIANO *et al.*, 2016; SONI *et al.*, 2020). Desta maneira, estes planejamentos permitem otimizar esses processos e obter resultados com parâmetros satisfatórios (TROIANO *et al.*, 2016). Assim, essa metodologia por DoE pode ser interessante no estudo de nanopartículas poliméricas, uma vez que essas dispõe de inúmeras maneiras de produção, desde métodos de preparo até sua composição podendo gerar estruturas finais com distintas características.

### **1.2.5 Caracterização de nanopartículas poliméricas**

Embora haja diferentes maneiras na qual se pode obter nanopartículas poliméricas, a caracterização físico-química é comum e de extrema importância. Dentre as avaliações que são realizadas na caracterização destaca-se a avaliação morfológica, distribuição de tamanho, índice de polidispersividade (PDI), potencial zeta e pH (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

#### **1.2.5.1 Distribuição de Tamanho**

A distribuição de tamanho de partículas pode ser realizada por inúmeras técnicas, como por exemplo, as microscópicas, porém a técnica mais empregada é a partir do espalhamento dinâmico de luz (DLS), principalmente por possuir rápida execução e liberação dos resultados para análise. Como limitações dessa técnica está que a mesma considera todas as nanoestruturas como esferas e que as amostras precisam estar em suspensão, não dissolver no meio e pouco concentradas (GAUMET *et al.*, 2008; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O DLS baseia-se na variação da intensidade de luz que é espalhada pelas partículas em movimento e assim, determina o raio hidrodinâmico através da medida do movimento browniano das partículas, por isso a necessidade delas estarem em suspensão e na diluição apropriada (GAUMET *et al.*, 2008; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

No movimento browniano as nanopartículas têm uma movimentação mais rápida, logo a flutuação da intensidade de luz varia de maneira mais rápida, enquanto

em partículas maiores o movimento é mais lento e conseqüentemente a flutuação da intensidade de luz também é lenta. Com fundamento nessa teoria, o equipamento calcula por meio de uma autocorrelação, o diâmetro médio das partículas (GAUMET *et al.*, 2008; PANALYTICAL, Malvern, 2021; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Nessa mesma técnica é feita a medida de PDI. Ele é calculado a partir de uma análise da função de autocorrelação da intensidade de dispersão de luz, ele fornece informações a respeito do grau de homogeneidade de uma amostra, desta maneira quanto menor for o seu valor (mais próximo de zero), maior homogeneidade na distribuição (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Vale ressaltar a importância de partículas com populações com baixa polidispersão e pequenos tamanhos, pois isto influencia na estabilidade das NPPs e no efeito EPR, visto que influencia o reconhecimento das mesmas a sistemas como retículo endotelial (RES), como fígado, rins e baço onde podem acumular-se e se tornarem tóxicas (HONARY; ZAHIR, 2013; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

#### 1.2.5.2 Carga Superficial

Outra característica físico-química comumente avaliada é o potencial zeta (PZ), definido como o potencial de superfície das partículas que pode ser alterado por mudanças decorrentes de dissociação de grupos funcionais ou adsorção de espécies iônicas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Ele é mensurado através da mobilidade eletroforética, que é medida a partir da velocidade das moléculas em movimento uma vez aplicado um campo elétrico, no qual as partículas irão migrar em direção a um dos eletrodos. O equipamento mensura a movimentação das partículas que geram mudanças na intensidade de luz espalhada que é captada e calculada segundo uma equação apropriada, gerando ao fim o valor do potencial zeta (MATUSIAK, JAKUB; GRZĄDKA, ELŻBIETA, 2017).

Os componentes que constituem as nanoformulações influenciam no valor do potencial zeta, isto é visto, por exemplo, em poliésteres como o PLA que apresentam um potencial negativo (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Valores altos de potencial zeta, entre 25 a 30 mV, sendo eles negativos ou positivos, são importantes para uma boa estabilidade físico-química, pois grandes forças repulsivas evitam a agregação das nanopartículas (HONARY; ZAHIR, 2013; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

O controle da carga superficial da partícula é de suma importância para entrega e distribuição da substância que está sendo carregada, isto porque partículas que possuam cargas muito negativas, por exemplo, tendem a serem reconhecidas pelo RES, principalmente fígado e baço, e, desta maneira, são removidas da circulação sistêmica para eliminação, não gerando o efeito terapêutico desejado e ainda podendo ter o risco de se acumular nesses locais e se tornarem potencialmente tóxicas. Outro ponto está relacionado a captação e fixação das NPPs nas membranas celulares, a variação da carga superficial pode controlar a ligação ao tecido e desta maneira direcionar as nanopartículas para o espaço intersticial (HONARY; ZAHIR, 2013).

#### 1.2.5.3 Monitoramento de pH

O monitoramento do pH através do tempo fornece informações a respeito da estabilidade das nanopartículas, a diminuição de valores de pH em curtos períodos de tempo pode significar que houve ionização de grupos carboxílicos e/ou hidrólise, o que sugere que houve degradação do polímero (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006). Alterações no pH podem alterar o potencial zeta e, com isso, o grau de agregação das partículas (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006; GAUMET *et al.*, 2008; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

#### 1.2.5.4 Avaliação Morfológica

Através da avaliação morfológica obtêm-se informações a respeito do tamanho e das formas das nanopartículas. Entre as técnicas empregadas para tal avaliação exemplifica-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET), neste último método é possível a diferenciação entre nanoesferas e nanocápsulas. Além dessas microscopias, a microscopia de força atômica (AFM) e a técnica de criofatura também têm sido empregadas para análise morfológica dos sistemas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Com o estudo da morfologia é possível identificar o estado de aglomeração das partículas, distribuição de tamanho, forma e até medir a funcionalização da superfície. A importância de se obter nanoestruturas no formato desejado impacta, por exemplo, no reconhecimento celular, no processo de englobamento destas partículas e também

no processo de passagem das partículas pelo efeito EPR (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SANTOS, CÁSSIO, 2015; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

### 1.3 OBJETIVOS

#### 1.3.1 Objetivo Geral

Esse projeto visa estudar se alterações nos parâmetros de produção de nanoesferas poliméricas impactam no tamanho médio, distribuição de tamanho e carga de superfície das mesmas.

#### 1.3.2 Objetivos Específicos

- Avaliação do impacto das variáveis tipo tensoativo, tempo e amplitude de sonicação na produção de nanoesferas poliméricas de PLA;
- Avaliação dos parâmetros físico-químicos das nanopartículas poliméricas formadas: tamanho de partícula, PDI e potencial zeta;
- Avaliação dos modelos matemáticos obtidos para as variáveis estudadas.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 METODOLOGIA

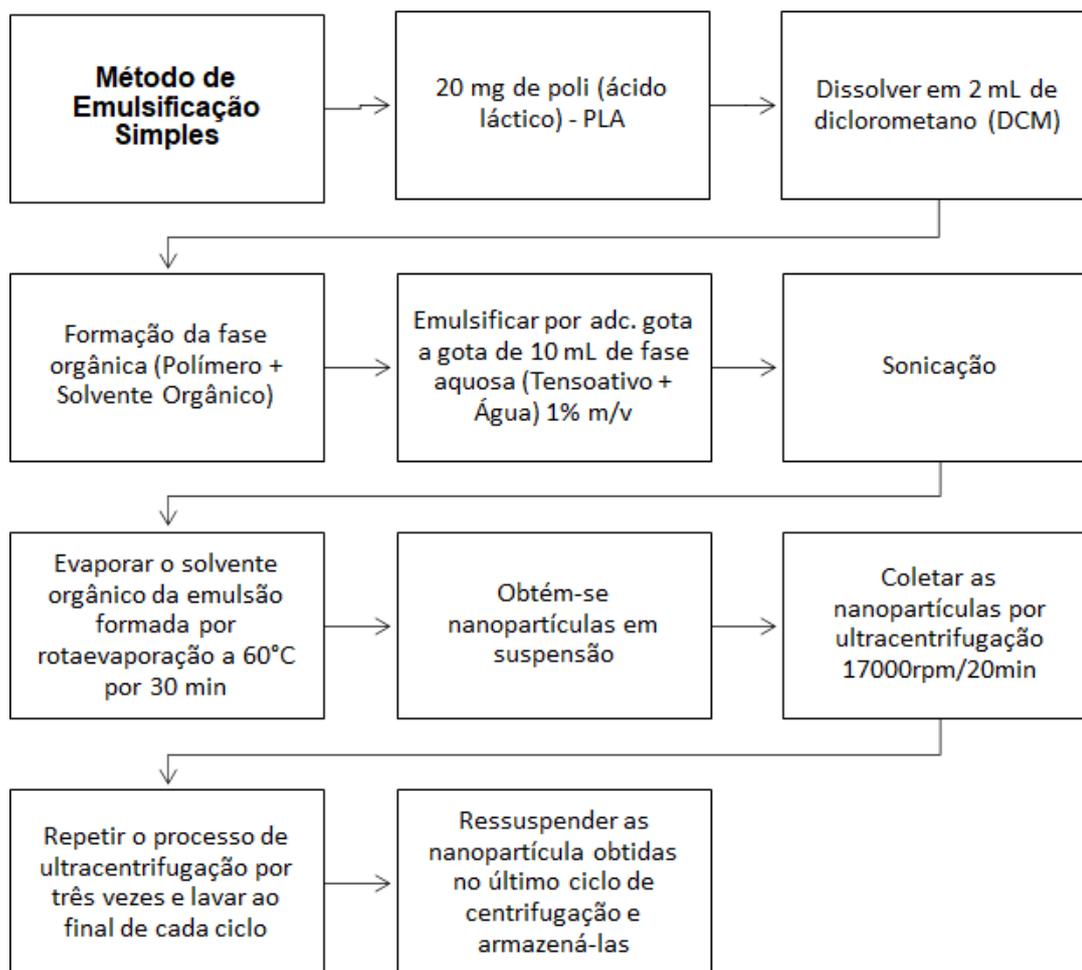
#### 2.1.1 Metodologia Experimental

O preparo das nanopartículas poliméricas vazias, ou seja, sem conter IFA, ocorreu através do método de polímeros pré-formados pela técnica de emulsificação simples seguida de evaporação do solvente com a obtenção de nanoesferas.

### 2.1.1.1 Preparo das nanopartículas poliméricas

Para preparação das nanopartículas, demonstrado na Figura 6, são dissolvidos 20 mg do PLA (massa molar média 40000, Sigma-Aldrich) em 2 mL de diclorometano (DCM; Merck), adicionados a um becker de 25 mL, formando a fase orgânica da preparação. Posteriormente, 10 mL de uma solução de 1% m/v de tensoativo formaram a fase aquosa. Essa foi incorporada a fase orgânica gota a gota em branda agitação magnética (RT15 power, IKA). Essa mistura foi levada ao sonicador (Q 700, Q Sonica), no qual a formulação foi sonicada em banho de gelo. Após o fim do processo, a emulsão O/A formada seguiu para a etapa de evaporação do solvente em rotaevaporador (RV8, IKA) com pressão aproximada de 200 a 300 mBar por trinta minutos a 60°C. Ao fim deste processo, a nanossuspensão formada foi transferida para tubos de ultracentrifugação e o balanceamento do peso desses foi feito com água tipo ultrapura. A ultracentrifugação (Sorvall Wx+80, ThermoFischer Scientific) ocorreu a 17000 rpm por 20 min a 25°C. Ao fim do processo, o sobrenadante foi descartado e as NPP foram ressuspensas em água ultrapura para lavagem, esse procedimento foi repetido três vezes. Por fim, as nanopartículas lavadas são armazenadas para subsequente análise físico-química.

**Figura 6** - Ilustração esquemática do processo de preparação de NPPs.



Fonte: Autor (2021).

### 2.1.1.2 Análise Estatística

Utilizando a metodologia de desenho experimental por análise fatorial ( $2^3$ ), com ponto central, foram estudados os impactos das seguintes variáveis (independentes): tipo de tensoativo: PVA (massa molar 89000-98000, Sigma-Aldrich) ou Pluronic F68 (Sigma-Aldrich); tempo de sonicação: 2 min (mínimo), 6 min (ponto central) e 10 min (máximo); e amplitude de sonicação: 10% (mínimo), 30% (ponto central) e 50% (máximo). Esses valores foram codificados conforme o Quadro 2. Como resposta do desenho foram avaliados os seguintes parâmetros da nanoformulação (variáveis dependentes): tamanho de partícula, PDI e potencial zeta. Os experimentos foram feitos conforme metodologia descrita acima, de forma aleatória, conforme explicitado no Quadro 3.

**Quadro 2** - Valores codificados das variáveis independentes.

<b>Fator</b>	<b>Nome</b>	<b>Ponto Baixo</b>	<b>Ponto Alto</b>	<b>Ponto Central</b>	<b>Valor codificado (Baixo)</b>	<b>Valor codificado (Alto)</b>	<b>Valor codificado (Central)</b>
A	Tensoativo	Pluronic	PVA	Pluronic/ PVA	-1	1	0
B	Tempo de sonicação	2	10	6	-1	1	0
C	Amplitude	10	50	30	-1	1	0

Fonte: Autor (2021).

Para fazer os cálculos do desenho foi utilizado o *software* Design-Expert® versão 7. Para análise estatística dos dados foi feita análise de variância (ANOVA) para regressão dos dados e para estimar os parâmetros estatísticos, foram considerados para avaliação final os modelos significativos, ou seja, com P-valor menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

**Quadro 3** - Desenho Experimental - Variação dos fatores: Tensoativo (A); Tempo de sonicação (B); Amplitude (C).

	Fator 1	Fator 2	Fator 3
Corrida	A: Tensoativo	B: Tempo de sonicação (min)	C: Amplitude (%)
1	Pluronic	10	50
2	Pluronic	2	50
3	Pluronic	6	30
4	Pluronic	6	30
5	PVA	10	50
6	PVA	6	30
7	PVA	6	30
8	PVA	2	50
9	PVA	6	30
10	PVA	2	10
11	PVA	10	10
12	Pluronic	2	10
13	PVA	6	30
14	Pluronic	6	30
15	Pluronic	10	10
16	PVA	6	30
17	Pluronic	6	30
18	Pluronic	6	30

Fonte: Autor (2021).

## 2.1.2 Caracterização das nanopartículas poliméricas

### 2.1.2.1 Tamanho de partícula e índice de polidispersão

A distribuição de tamanho e o PDI foram mensurados através da técnica de espalhamento de luz dinâmico pelo equipamento Zetasizer Nano ZS (Nano ZS90, Malvern). As amostras foram diluídas em balão volumétrico de 10mL a uma proporção de 1:10 (v/v) em água ultrapura para evitar quaisquer resquícios de impureza, as diluições foram colocadas em cubeta para seguida análise no equipamento. As medidas foram realizadas em modo automático em triplicata e os resultados médios de tamanho médio e PDI foram coletados e registrados para futura análise estatística.

### 2.1.2.2 Potencial zeta

A análise do potencial zeta foi realizada no equipamento (Nano ZS90, Malvern) pela técnica de mobilidade eletroforética. As mesmas diluições (proporção 1:10) utilizadas para mensuração do tamanho médio e PDI foram empregadas. As medidas foram realizadas em modo automático em triplicata e os resultados médios foram coletados e registrados para futura análise estatística.

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Usando desenho experimental fatorial  $2^3$ , o efeito das variáveis independentes sobre as variáveis dependentes foram analisados em 18 experimentos de acordo com o planejamento experimental e o resultado está apresentado na Tabela 1, destaca-se que a diferença dos valores nas corridas em duplicata pode estar associados a variação no lote de produção.

**Tabela 1** - Desenho Experimental - Variáveis independentes: Tensoativo (A); Tempo de sonicação (B); Amplitude (C) e variáveis dependentes: Potencial Zeta (PZ); Índice de polidispersividade (PDI); Tamanho médio.

	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Resultado 1	Resultado 2	Resultado 3
Corrida	A:Tensoativo	B:Tempo de sonicação	C:Amplitude	PZ	PDI	Tamanho nm
1	Pluronic F68	10	50	-33,7	0,99	2197
2	Pluronic F68	2	50	-35,8	0,497	459,6
3	Pluronic F68	6	30	-35,7	0,525	1155
4	Pluronic F68	6	30	-37,5	0,469	505,4
5	PVA	10	50	-16	0,218	383,3
6	PVA	6	30	-19	0,224	409,9
7	PVA	6	30	-14,9	0,112	350,1
8	PVA	2	50	-22,9	0,123	303,6
9	PVA	6	30	-24,3	0,131	285,1
10	PVA	2	10	-20,4	0,132	191,6
11	PVA	10	10	-20,7	0,075	247
12	Pluronic F68	2	10	-30,6	0,231	356,9
13	PVA	6	30	-20	0,133	297,9
14	Pluronic F68	6	30	-27,3	0,678	675,5
15	Pluronic F68	10	10	-33,5	0,685	769,2
16	PVA	6	30	-25,1	0,137	318,2
17	Pluronic F68	6	30	-35,1	0,985	1327
18	Pluronic F68	6	30	-35,7	0,678	818,5

Fonte: Autor (2021).

Os efeitos e as interações foram calculados para cada uma das variáveis dependentes (Tamanho, PDI, Potencial Zeta) através de uma equação polinomial final que será demonstrada mais a frente para cada uma das variáveis dependentes.

### 2.2.1 Tamanho médio

No desenho, o tamanho da partícula variou entre 191,6 nm a 2197 nm (Tabela 1). Na Tabela 2 estão os dados da análise fatorial do modelo para tamanho de partícula. Observa-se que para esse parâmetro, todas as variáveis independentes foram significativas ( $p < 0,05$ ), ou seja, todas elas impactam no tamanho de partícula. No entanto, na faixa estudada, não foram observados impactos na interação entre esses fatores.

O modelo apresenta um valor de coeficiente de determinação ( $R^2$ ), coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$  Adj) e predito ( $R^2$  Pred) satisfatórios (PORTAL ACTION, 2021). O  $R^2$  é uma medida da variabilidade na resposta que é explicada pelo modelo,

seu valor foi de 0,9305, ou seja, significa que 93,05% das variações são bem explicadas e que o modelo ajusta seus dados. Além disso, o valor do  $R^2$  Pred em aproximadamente 86,0% (0,8600) determina a capacidade preditiva do modelo (Tabela 2).

Dado que um dos fatores analisados é categórico e não quantitativo (o tensoativo poderia ser PVA ou Pluronic F68), um modelo para cada um deles foi gerado. A equação 1 corresponde ao modelo do Pluronic F68 e a equação 2 ao modelo para o PVA. Ressalta-se que a equação encontrada para o tamanho é uma exponencial. A Figura 7 compara os valores experimentais com os valores do modelo gerado pelo *software* sobre a influência do tensoativo Pluronic F68 (Figura 7A) e PVA (Figura 7B) para o tamanho médio das nanopartículas.

**Tabela 2** - Tabela Análise de variância - Tamanho Médio.

Fonte	Tamanho médio				
	Valor F	P-valor	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Ajustado	R <sup>2</sup> Predito
Modelo	26,79712212	< 0.0001	0,9305486	0,895822923	0,860029173
A-Tensoativo	50,25307599	< 0.0001			
B-Tempo de sonicção	18,20167021	0.0016			
C-Amplitude	16,50845594	0.0023			
AB	1,319022343	0.2775			
AC	2,532324092	0.1426			

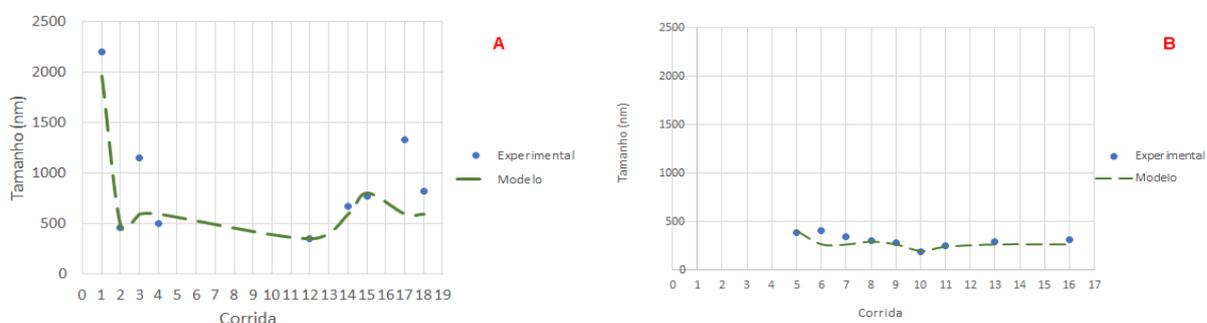
Estatisticamente significativo para valor  $p < 0,05$

Fonte: Autor (2021).

$$(\text{Tamanho}^{-1}) = 0,003443286 - 0,000201406 \times B - 1,83873\text{E-}05 \times C \quad (1)$$

$$(\text{Tamanho}^{-1}) = 0,005750343 - 0,000115969 \times B - 4,20632\text{E-}05 \times C \quad (2)$$

**Figura 7** - Gráfico de dispersão baseado nos valores obtidos experimentalmente e calculado pelo modelo para a variável dependente tamanho de partícula, considerando os tensoativos. Pluronic F68(A); PVA (B).



Fonte: Autor (2021).

De acordo com o intervalo estudado no desenho, os modelos preveem adequadamente os valores para o tamanho médio das partículas inferiores a 500 nm, visto que os valores previstos se mostram mais próximos, em sua maioria, com os resultados obtidos em experimento (Figura 7). Tal fato é interessante, uma vez que partículas menores são vantajosas em aspectos físicos, químicos e biológicos garantindo, por exemplo, uma entrega específica, menor chance de reconhecimento celular escapando de processos de opsonização, dentre outros benefícios (MACHADO, 2018; RIZZO *et al.*, 2013; TRACZYNSKI, 2016). Assim, apesar do

modelo não explicar todas as partículas, ele explica com mais detalhe o tamanho de partícula que se busca nessas formulações poliméricas, ou seja, menores que 500 nm.

Ainda observando a Figura 7, pode-se perceber que as nanopartículas poliméricas produzidas com o tensoativo PVA exibiram tamanhos menores do que aquelas produzidas com Pluronic F68. Dessa forma, pode-se afirmar que o tamanho das partículas é afetado pela presença dos tensoativos, o PVA assim como o Pluronic F68 são empregados como emulsificantes não iônicos que se encontram adsorvidos superfície das partículas, este tipo de excipientes são adicionados com a finalidade de reduzir tensão superficial entre as fases, estabilizando a emulsão formada e evitando a coalescência das gotículas, facilitando, dessa forma, a redução do tamanho (ROCHA, 2018; SONI et al., 2020; SRINIVAS *et al.*, 2016; TAGLIARI *et al.*, 2015).

Acredita-se que como o Pluronic F68 possui uma estrutura composta por um tribloco difuncional de blocos hidrofílicos de óxido de etileno (EO) e blocos hidrofóbicos de óxido de propileno (PO) formando (PEO-PPO-PEO), onde o poloxamer em estudo apresenta 76 monômeros de PEO e 30 monômeros de PPO, isso pode levar a um tamanho de partícula aumentado (SALMASO; CALICETI, 2013; TAGLIARI *et al.*, 2015). Desta forma, quanto maior for sua concentração mais de suas moléculas irão se encontrar adsorvidas em distribuição perpendicular à superfície aumentando a espessura de revestimento, conseqüentemente aumentando o tamanho da partícula (ROCHA, 2018; SALMASO; CALICETI, 2013; TAGLIARI *et al.*, 2015). Em contrapartida as partículas produzidas com PVA demonstraram menores tamanhos, o que vai de acordo com a literatura onde são apresentadas menores valores graças ao seu comportamento estabilizador de gotículas localizado na superfície da interface entre a fase dispersa e a fase contínua, contribuindo para redução de tamanho (ELSAYED *et al.*, 2014; SRINIVAS *et al.*, 2017; TAGLIARI *et al.*, 2015).

Entretanto vale pontuar que concentrações altas do PVA também podem resultar em tamanhos elevados de nanopartículas (Guinebretière *et al.*, 2002; Granada *et al.*, 2013). Guinebretière e seus colaboradores apontaram através de uma análise por meio MET que o excesso deste tensoativo tende a formar um filme em torno das nanocápsulas produzidas formando uma segunda camada sobre a partícula. Esse resultado não foi observado nas concentrações analisadas neste trabalho.

Ressalta-se ainda que a etapa de homogeneização é amplamente empregada para redução do tamanho de partícula, devido a alta energia gerada no procedimento,

as partículas são quebradas em partículas menores resultando nesta redução (GRYPARIS *et al.*, 2008; SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012; SONI *et al.*, 2020).

Ainda que estes sejam os dados encontrados na literatura, neste trabalho esse fato não ocorreu com veracidade para o Pluronic F68, exemplifica-se a corrida 1 (Tabela 1) onde o maior tempo de sonicação junto a um maior tempo de amplitude levaram a formação da maior partícula dentre os experimentos, enquanto que para o PVA a menor partícula gerada foi alcançada a partir de uma menor amplitude e menor tempo (corrida 10; Tabela 1), sugerindo que há um ponto considerado ótimo de equilíbrio para este processo.

### 2.2.2 Índice de Polidispersividade (PDI)

Os valores de PDI apresentados no desenho ficaram dentro de um valor mínimo próximo a 0,0 e valor máximo próximo a 1,0 (Tabela 1). A avaliação estatística entre variáveis independentes e as interações entre as mesmas está exibido na Tabela 3, de acordo com o critério de significância ( $p < 0,05$ ), os fatores tensoativo, tempo de sonicação, amplitude e a interação tensoativo/tempo de sonicação mostraram-se significativos ( $p < 0,05$ ). O modelo apresentado para o PDI está apresentado como equação codificada, uma vez que a mesma não é hierárquica, assim, para usar o modelo (equação 3), utiliza-se os valores codificados descritos no Quadro 2.

**Tabela 3** - Tabela Análise de variância - PDI.

Fonte	PDI				
	Valor F	P-valor	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Ajustado	R <sup>2</sup> Predito
Modelo	33,62661928	< 0.0001	0,943862201	0,915793301	0,828939667
A-Tensoativo	59,7840548	< 0.0001			
B-Tempo de sonicação	5,889368315	0.0356			
C-Amplitude	8,410384918	0.0158			
AB	5,797292005	0.0368			
ABC	4,367337153	0.0631			

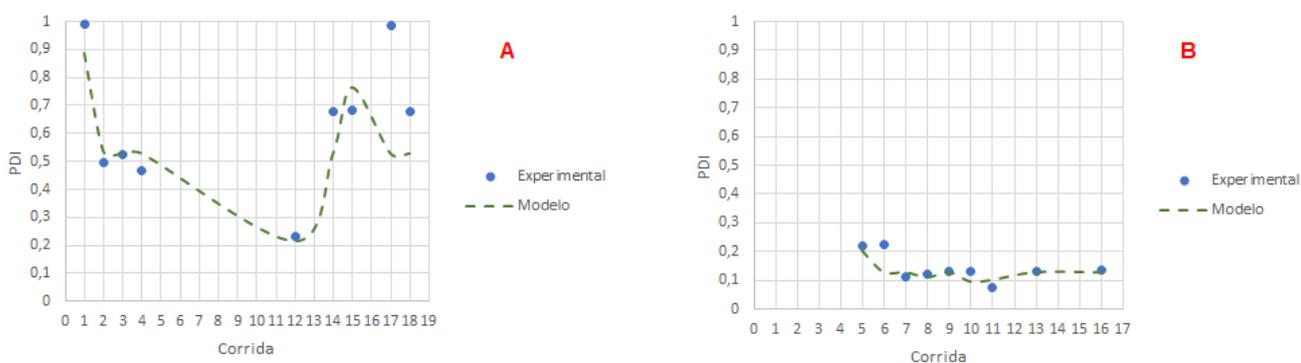
Estatisticamente significativo para valor  $p < 0,05$

Fonte: Autor (2021).

$$\text{Log}_{10}(\text{PDI}) = -0,585588633 - 0,308412167 \times A + 0,096799514 \times B + 0,11567693 \times C - 0,096039835 \times A \times B + 0,083357979 \times A \times B \times C \quad (3)$$

Através da equação logarítmica codificada o índice de polidispersividade tem influência significativa pelos três fatores independentes, assim como, pela interação entre tensoativo e tempo de sonicação, a Figura 8 apresenta a influência que os tensoativos Pluronic F68 (Figura 8A) e PVA (Figura 8B) exerce sobre o PDI, relacionando os valores experimentais com os valores previstos pelo modelo. Observa-se que o modelo é adequado, prevendo os valores de acordo com os obtidos experimentalmente, R<sup>2</sup> de 0,9438 e valor de predição R<sup>2</sup> Pred de 0,8289 (Tabela 3).

**Figura 8** - Gráfico de dispersão baseado nos valores obtidos experimentalmente e calculado pelo modelo para a variável dependente PDI, considerando os tensoativos: Pluronic F68 (A); PVA (B).



Fonte: Autor (2021).

Assim como no tamanho a aplicação de diferentes tensoativos implica na maior dispersibilidade no tamanho das partículas, é possível constatar que os valores de PDI mais baixos foram referentes ao PVA, por exemplo a corrida 11 (Tabela 1), ao passo que os maiores valores de PDI são relativos ao Pluronic F68, exemplifica-se a corrida 1 (Tabela 1). O índice de polidispersividade exprime o quão homogêneo é a dispersão de tamanho das partículas, ressaltando que a homogeneidade influencia na estabilidade das NPPs, no reconhecimento celular e também no efeito EPR (HONARY; ZAHIR, 2013; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SOPPIMATH *et al.*, 2001). É válido relacionar que as maiores partículas se apresentam com maior dispersibilidade, desta maneira, é esperado que as nanopartículas contendo Pluronic F68 apresentassem estes altos valores, enquanto as com PVA valores mais próximos a zero. O efeito entre as variações do modelo em comparação com os obtidos experimentalmente (Figura 8A e 8B), previu adequadamente os valores abaixo de 0,5, ou seja, partindo de bons índices, isto é, valores entre 0,3 a 0,1, refletem baixa homogeneidade da amostra (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). E deste modo, o modelo é eficiente prevendo estes valores.

### 2.2.3 Potencial Zeta (PZ)

A Tabela 4 apresenta os dados provenientes da análise fatorial do modelo para o PZ. A partir da análise nota-se que somente a variável independente tensoativo foi significativa ( $p < 0,05$ ). Em virtude do fator tensoativo ser categórico e não quantitativo, dois modelos de equação são gerados, equação 4 (Pluronic) e equação 5 (PVA).

**Tabela 4 - Tabela Análise de variância - PZ.**

Fonte	PZ				
	Valor F	P-valor	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Ajustado	R <sup>2</sup> Predito
Modelo	11,55921175	0.0003	0,86310792	0,788439515	0,79971658
A-Tensoativo	66,2769128	< 0.0001			
B-Tempo de sonicação	0,339260756	0.5720			
C-Amplitude	0,103270813	0.7540			
AB	0,552256808	0.4730			
AC	0,582511929	0.4614			
BC	1,501057401	0.2461			

Estaticamente significativo para valor  $p < 0,05$

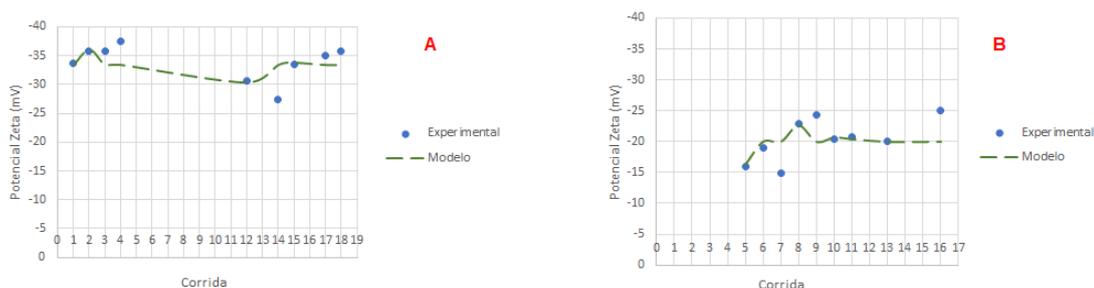
Fonte: Autor (2021).

$$PZ = -27,64375 - 0,621875 \times B - 0,181875 \times C + 0,0190625 \times B \times C \quad (4)$$

$$PZ = -19,86875 - 0,159375 \times B - 0,086875 \times C + 0,0190625 \times B \times C \quad (5)$$

Dada as equações baseadas entre a significância dos fatores e suas interações, a Figura 9 contrasta os valores do PZ experimentais e os gerados pelo *software* a partir dos diferentes tensoativos empregados, Pluronic F68 (Figura 9A) e PVA (Figura 9B). Dentro da região pesquisada, ambos os modelos previram apropriadamente os valores, mostrando respostas harmônicas entre eles. Por fim, o modelo também apresenta um valor de R<sup>2</sup> de 86,31% (0,8631) e R<sup>2</sup> Pred de 79,97% (0,7997) demonstrando adequado valor de ajuste e de predição.

**Figura 9 -** Gráfico de dispersão baseado nos valores obtidos experimentalmente e calculado pelo modelo para a variável dependente PZ, considerando os tensoativos.



Fonte: Autor (2021).

Todos os resultados obtidos para PZ foram negativos, ficando entre -14,9 mV a -37,5 mV, observa-se que os menores valores, em módulo, de PZ são originárias das NPPs produzidas com o tensoativo PVA enquanto os de maior valor, a partir de -27,3 mV (corrida 14; Tabela 1) são oriundas do Pluronic F68. A carga superficial é de suma notoriedade visto que com base nela discute-se a estabilização física das partículas a longo prazo. Esta estabilidade é devido ao efeito de repulsão, estéricos e eletrostáticos evitando a agregação gerada pelas colisões (ARAÚJO *et al.*, 2009; DIWAN; KHAN; RAVI, 2020; TAGLIARI *et al.*, 2015). Em virtude de que os tensoativos empregados tem característica não iônica, a carga negativa está provavelmente relacionada ao polímero PLA. Inúmeros trabalhos discorrem que poliésteres alifáticos como o utilizado neste trabalho apresentam um potencial negativo, dado que estes estão susceptíveis a hidrólise do seu grupo funcional éster que ionizam e atribuem carga negativa as partículas (ARAÚJO *et al.*, 2009; DIWAN; KHAN; RAVI, 2020; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; TAGLIARI *et al.*, 2015; VILLANOVA; ORÉFICE, 2010).

Os valores de PZ considerados baixos, como os do PVA indicam uma menor estabilidade a longo prazo, enquanto os valores considerados mais altos como os mostrados pelo Pluronic F68 indicam maior estabilidade a longo prazo. Segundo dados em literatura valores de PZ a partir de 25 mV, em módulo, são considerados ótimos para estabilização eletrostática, porém potenciais acima de 15 mV também já são considerados eletrostaticamente estáveis possuindo menor risco de floculação (HEURTAULT *et al.*, 2003; HONARY; ZAHIR, 2013; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As maiores cargas negativas nas partículas recobertas pelo Pluronic F68 possivelmente podem ser explicadas pela adsorção perpendicular que este tensoativo apresenta sobre a superfície da partícula, à vista disso recobre menos as nanopartículas exibindo então as cargas negativas.

Ademais, os resultados alcançados demonstram estabilidade e o modelo antevê satisfatoriamente os potenciais para ambos tensoativos.

## 2.2.4 Otimização

A partir dos modelos obtidos experimentalmente foi realizada uma otimização dos mesmos para se obter partículas com o menor tamanho possível entre a faixa 191,6 nm a 1000 nm; com menor PDI, na faixa de 0,075 até 0,99; e menor PZ entre -14,9 a -37,5. Com isso foram propostas 5 diferentes formulações (Tabela 5). Dentre elas, a primeira relatada foi testada, experimentalmente, e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 6.

**Tabela 5 - Formulações Otimizadas.**

Formulação	Tensoativo	Tempo de sonicação	Amplitude	PZ	PDI	Tamanho Médio
1	PVA	2	10	-21,0417	0,118283	196,1643
2	PVA	2,41	10	-21,0288	0,115981	198,0262
3	PVA	7,69	10	-20,8638	0,090242	225,3364
4	Pluronic	2	10	-30,8028	0,214264	350,0665
5	Pluronic	2,05	10	-30,8261	0,216113	351,4054

Fonte: Autor (2021).

**Tabela 6 - Resultado Experimental da Formulação Otimizada.**

Formulação 1	Tensoativo	Tempo de sonicação	Amplitude
	PVA	2	10
Resultados	Tamanho médio (nm)	PDI	PZ
	302,4	0,183	-15

Fonte: Autor (2021).

O tamanho médio das partículas ficou maior do que o esperado, mas ainda é considerado um bom tamanho para a literatura (MACHADO, 2018; RIZZO *et al.*, 2013; TRACZYNSKI, 2016; VENTOLA, 2017). Já o PZ ficou maior, mas suficiente para evitar a instabilidade da formulação, como dito anteriormente, potenciais acima de  $\pm 15$  mV também já são considerados eletrostaticamente estáveis, possuindo menor risco de floculação. Por fim, o PDI mostrou que a distribuição do tamanho das partículas pode ser considerada homogênea. Assim, pode-se afirmar que apesar dos valores obtidos

não serem iguais aos previstos pelo modelo, estão dentro de uma faixa de erro, afirmando que os mesmos podem sim ser utilizados para apresentar o melhor protótipo de formulação.

### 3 CONCLUSÃO

As nanoesferas vazias foram produzidas pela técnica de emulsificação simples seguida de evaporação do solvente, variando três fatores de produção: tensoativo, tempo de sonicação e amplitude. Por meio do planejamento experimental e suas respectivas análises pode-se concluir a significância das variáveis independentes sobre as dependentes, ressaltando o impacto do tensoativo nessas formulações. Além disso, foi possível criar modelos para cada uma das variáveis dependentes, que apresentaram coeficiente de determinação e de predição satisfatórios.

Isto posto, foram geradas formulações otimizadas baseadas no desenho experimental (Quadro 3; Tabela 1; Tabela 6), os resultados das partículas obtidas estavam na faixa determinada variando entre tamanhos de 191,6 nm a 2197 nm, com valores de polidispersão entre 0,075 a 0,99 e PZ de -14,9 a -37,5 mV. Dentre as formulações propostas pelo *software* a primeira formulação foi testada (Formulação 1; Tabela 6). Os valores foram encontrados de acordo com a faixa de erro do modelo, o tamanho da partícula encontrado foi de 302,4 nm, sendo considerado um bom tamanho, o PZ achado também estava dentro do esperado, sendo seu valor de -15 mV, logo considerado eletrostaticamente estável e o PDI foi de 0,183 demonstrando homogeneidade das partículas, concluindo-se que a produção das nanoesferas com PVA como tensoativo obtém-se nanopartículas poliméricas satisfatórias, diferentemente do que é esperado pelas NPPs com Pluronic F68.

Desta forma, foi possível otimizar o processo de produção, exibindo a melhor formulação a ser realizada de acordo com o alvo final do estudo, ou seja, nanopartículas com pequeno tamanho, baixa polidispersão e boa estabilidade, reduzindo a variabilidade produção, os custos e endossando uma melhor segurança e qualidade da formulação.

## REFERÊNCIAS

- AGRAHARI, Vibhuti *et al.* Nanof ormulation properties, characterization, and behavior in complex biological matrices: Challenges and opportunities for brain-targeted drug delivery applications and enhanced translational potential. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 148, p. 146-180, ago. 2019.
- ALEXIS, Frank *et al.* Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 505 - 515, ago. 2008.
- APOLINÁRIO, Alexsandra Conceição *et al.* Abrindo a caixa de pandora dos nanomedicamentos: há realmente muito mais 'espaço lá embaixo'. **Química Nova**, v. 43, p. 212 - 225, fev. 2020.
- ARAÚJO, J. *et al.* Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 72, n.1, p. 48-56, abr. 2009.
- BAMRUNGSAP, Suwussa *et al.* Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. **Nanomedicine**, v. 7, n. 8, p. 1253-1271, ago. 2012.
- BROCHADO, Patrícia Maria Domingos de Sousa Carneira. **Nanotecnologia e a sua aplicação à terapêutica oncológica**. 2013. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.
- CARRARO, Talita Cristina Moreira Moraes. **Desenvolvimento, Caracterização Físico-química E Biológica De Nanopartículas Poliméricas Contendo Anfotericina B**. 2013. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava, 2013.
- CHANDRA, R.; RENU, Rustgi. Biodegradable polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 23, n. 7, p. 1273-1335, nov. 1998.
- CHO, Kwangjae *et al.* Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1310-1316, mar. 2008.
- DEEPAK, Venkataraman *et al.* Medium optimization and immobilization of purified fibrinolytic URAK from Bacillus cereus NK1 on PHB nanoparticles. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, p. 297-304, jul. 2010.
- DIMER, Frantiescoli A. *et al.* Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, out. 2013.
- DIWAN, Rimpay; KHAN, Shareef; RAVI, Punna Rao. Comparative study of cilnidipine loaded PLGA nanoparticles: process optimization by DoE, physico-chemical characterization and in vivo evaluation. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, p. 1442–1458, abr. 2020
- DUNCAN, Ruth; GASPAR, Rogerio. Nanomedicine(s) under the Microscope. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 6, p. 210–214, out. 2011.

ELSAYED, I; ABDELBAR, A; ELSHAFFEEY A. Nanosizing of a poorly soluble drug: technique optimization, factorial analysis, and pharmacokinetic study in healthy human volunteers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 2943–2953, jun. 2017.

FANG, Jun; NAKAMURA, Hideaki; MAEDA, Hiroshi. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 3, p. 136-151, mar. 2011.

FARJADIAN, F. *et al.* Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: challenges and opportunities. **Nanomedicine**, v.14, n. 1, p. 93-126, jan. 2019

FECZKÓ, T. *et al.* Influence of process conditions on the mean size of PLGA nanoparticles, **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 50, p. 846-853, maio, 2011.

FEYNMAN, R. There is plenty of room at the bottom In: American Physical Society, 1960, Caltech. Engineering and Science. Disponível em: <<http://calteches.library.caltech.edu/1976/1/1960Bottom.pdf>>. Acesso em: 28 abr. 2021.

FONSECA, Laís Bastos da. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo praziquantel para o tratamento da esquistossomose**. 2012. 233 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

FRANCHETTI, Sandra Mara Martins; MARCONATO, José Carlos. Polímeros biodegradáveis: uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, mar. 2006.

GAUMET, Marie *et al.* Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 01- 09, maio 2008.

GIORDANI, Camila Ferrazza Alves. **Nanocápsulas e nanoesferas de disseleneto de difenila: síntese e distribuição biológica**. 2012. 127 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

GOTO, Patrícia Leme. **Desenvolvimento nanopartículas poliméricas por polimerização in situ a partir de nanoemulsões produzidas por invasão de fases**. 2011. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

GRYPARIS, G. EC *et al.* Effect of Conditions of Preparation on the Size and Encapsulation Properties of PLGA-mPEG Nanoparticles of Cisplatin. **Drug Delivery**, v. 14, n. 6, p.371-380, out. 2008.

GUINEBRETIERE, S. *et al.* Study of the emulsion-diffusion of solvent: preparation and characterization of nanocapsules. **Drug Development Research**, v. 57, n. 1, p. 18-33, maio 2012.

GRANADA, A *et al.* Nifedipine-Loaded Polymeric Nanocapsules: Validation of a Stability-Indicating HPLC Method to Evaluate the Drug Entrapment Efficiency and In Vitro Release Profiles. **Journal of AOAC International**, v. 96, n. 2, p. 276-281, mar. 2013.

GUPTA, Sanjeev *et al.* Nanocarriers and nanoparticles for skin care and dermatological treatments. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 4, n. 4, p. 267-272, mar. 2013.

GUTERRES, Sílvia S.; ALVES, Marta P.; POHLMANN, Adriana R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, jul. 2007.

HE, Hua *et al.* Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-13, set. 2013.

HEURTAULT, Béatrice *et al.* Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, n. 23, p. 4283-4300, abr. 2003.

HOBBS, Susan K. *et al.* Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 8, p. 4607-4612, abr. 1998.

HOLKEM, Augusto Tasch *et al.* Técnicas de preparação de sistemas nanotecnológicos aplicados a alimentos. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 5, p. 87-96, out. 2015.

HONARY, Soheyla; ZAHIR, Foruhe. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems: A Review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 255-264, abr. 2013.

KAMALY, N. *et al.* Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2971–3010, mar. 2012.

KHAN, Ibrahim; SAEED, Khalid; KHAN, Idrees. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908-931, maio 2017.

KIM, Betty Y.S. *et al.* Nanomedicine. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 25, p. 2434-2443, dez. 2010.

KUNZMANN, Andrea *et al.* Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1810, n. 3, p. 361-373, mar. 2011.

KUMAR, Raj; SIRIL, Prem Felix. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol stabilized griseofulvin nanoparticles. **Materials Today: Proceeding**, v. 3, n. 6, p. 2261–2267, jun. 2016.

LUIZ, Marcela Tavares. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de PLGA funcionalizadas com folato contendo paclitaxel para otimização da terapia do câncer de ovário**. 2018. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

LEGRAND, P. *et al.* Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, p. 33-43, nov. 2007.

MATUSIAK, Jakub; GRZADKA, Elżbieta. Stability of colloidal systems-a review of the stability measurements methods. **Annales - Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Sectio AA**, v. LXXII, p. 33-45, dez. 2017.

MACHADO, Sara Cristina Menicha. **Nanotecnologia e sua aplicação em terapêutica oncológica**. 2018. 79 p. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas) – Instituto Universitário Egas Moniz, Almada, 2018.

MAINARDES, Rubiana Mara; KHALIL, Najeh Maissar; GREMIÃO, Maria Palmira Daflon. Intranasal delivery of zidovudine by PLA and PLA–PEG blend nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, p. 266-271, ago. 2010.

MARTÍNEZ RIVAS, Claudia Janeth *et al.* Nanoprecipitation Process: From Encapsulation to Drug Delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 532, n. 1, p. 66-81, ago. 2017.

MARQUES, Raquel Patrícia. **Nanopartículas de ouro no tratamento do cancro da mama**. 2017. 52 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Algarve, Faro, 2017.

MAZZEO, Angela; SANTOS, Enrico Jardim Clemente. Nanotecnologia e as células progenitoras adultas multipotentes na Medicina Reparativa: perspectivas terapêuticas. **Einstein (São Paulo)**, v. 16, n. 4, p. 1- 6, nov. 2018.

MORA-HUERTAS, Claudia Elizabeth; FESSI, Hatem; ELAISSARI, Abdelhamid. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, jan. 2010.

MOREIRA, André F.; DIAS, Diana R.; CORREIA, Ilídio J. Stimuli-responsive mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy: A review. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 236, p. 141-157, ago. 2016.

MOREIRA, Tailane Sant'Anna. **Síntese de nanopartículas poliméricas por polimerização radicalar (raft) para vetorização biodirigida de tamoxifeno**. 2015. 226 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química.) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

NICHOLS, Joseph W.; BAE, You Han. EPR: Evidence and fallacy. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 451-464, set. 2014.

OLIVEIRA, Anderson Marques de. **Produção de Nanopartículas Poliméricas com Tamanho Controlado com Potencial Aplicação na Liberação Controlada de Agentes Antitumorais**. 2014. 59 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do ABC, São Paulo, 2014.

PANALYTICAL, Malvern. **Espalhamento de luz dinâmico (DLS)**. 2021. Disponível em: <https://www.malvernpanalytical.com/br/products>. Acesso em: 03 maio 2021.

PORTAL ACTION. **Coeficiente de Determinação**. 2021. Disponível em: <http://www.portalaction.com.br/analise-de-regressao/16-coeficiente-de-determinacao>. Acesso em 03 maio 2021.

PORTAL ACTION. **Experimentos Fatoriais 2<sup>3</sup>**. 2021. Disponível em: <http://www.portalaction.com.br/planejamento-de-experimento/32-experimentos-fatoriais-23>. Acesso em 03 maio 2021.

PIKTEL, Ewelina *et al.* Recent insights in nanotechnology-based drugs and formulations designed for effective anti-cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 14, n. 39, p. 1-23, maio 2016.

PRIDGEN, Eric M.; ALEXIS, Frank; FAROKHZAD, Omid C. Polymeric Nanoparticle Drug Delivery Technologies for Oral Delivery Applications. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 12, n. 9, p. 1459-1473, mar. 2015.

QUINTANAR-GUERRERO, David *et.al.* Preparation and Characterization of Nanocapsules from Preformed Polymers by a New Process Based on Emulsification-Diffusion Technique. **Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 1056- 1062, jul. 1998.

RADAIC, Allan *et al.* Como estudar interações entre Nanopartículas e Sistemas Biológicos. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1236-1244, ago. 2016.

RAO, J. Prasad; GECKELER, Kurt E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887-913, jul. 2011.

RIZZO, Larissa Y. *et al.* Recent Progress in Nanomedicine: Therapeutic, Diagnostic and Theranostic Applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 1159-1166, dez. 2013.

ROCHA, LIZANDRA VIANA MAURAT. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas carreadoras de curcuminoides: um potencial teranóstico para Alzheimer**. 2018. 110 p. Dissertação (Mestre em Ciências, em Ciência e Tecnologia de Polímeros) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

KADCYLA®: pó liofilizado para solução injetável. Tatiana Tsiomis Díaz. Rio de Janeiro: **Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S.A.**, 2020. Bula de medicamento.

SALMASO, Stefano; CALICETI, Paolo. Stealth Properties to Improve Therapeutic Efficacy of Drug Nanocarriers. **Journal of Drug Delivery**, v. 2013, p. 01-19, mar. 2013.

SANEJA, Ankit *et al.* REVIEW Therapeutic applications of betulinic acid nanoformulations. **New York: New York Academy Of Sciences**, v. 1421, n. 1, p.1-14, jun. 2018.

SANTOS, Cassio Eraclito Alves dos. **Síntese e Caracterização de Nanopartículas metálicas e suas Aplicações em Biologia**. 2015. 81 f. Tese (Doutorado em Materiais) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2015.

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, fev. 2003.

SCHULZ, Peter A. Há mais história lá embaixo - um convite para rever uma palestra: *There is plenty of history at the bottom – an invitation to revisit a talk*. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 40, n. 4, p. 4210-1 - 4210-5, fev. 2018.

SOPPIMATH, Kumares S. *et al.* Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1-2 p. 1-20, jan. 2001.

SOUTO, Eliana B.; SEVERINO, Patrícia; SANTANA, Maria Helena A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de Polímeros Pré-formados: Parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101-106, jan. 2012.

SONI, Govind *et al.* Abordagem de qualidade por projeto (QbD) no processamento de nanopartículas poliméricas carregando drogas anticâncer por homogeneizador de alta pressão. **Heliyon**, v. 6, n. 4, p. 02-10, abr. 2020.

SRIVINAS, Navya Sree Kola *et al.* A quality by design approach on polymeric nanocarrier delivery of gefitinib: formulation, in vitro, and in vivo characterization. **International Journal of Nanomedicine**, v.12, p. 15-28, dez. 2016.

SVENSON, S. What nanomedicine in the clinic right now really forms nanoparticles? **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 6, n. 2, p. 125–135, abri. 2014.

TAGLIARI, Monika P *et al.* Development of Oral Nifedipine-loaded Polymeric Nanocapsules: Physicochemical Characterisation, Photostability Studies, In Vitro And In Vivo Evaluation. **Química Nova**, v. 38, n. 6, p. 781-786, jul. 2015.

THORLEY, Andrew J.; TETLEY, Teresa D. New perspectives in nanomedicine. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 140, n. 2, p. 176-185, nov. 2013.

TRACZYNSKI, Marcos Rodrigo. **Desenvolvimento e avaliação de nanopartículas poliméricas de poli (metil metacrilato) (PMMA) como um sistema de liberação modificada**. 2016. 92 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2016.

TROIANO, Greg *et al.* A Quality by Design Approach to Developing and Manufacturing Polymeric Nanoparticle Drug Products. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 18, p. 1354-1365, set. 2016.

VAUTHIER, Christine; BOUCHEMAL, Kawthar. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p. 1025-1058, maio 2009.

VENTOLA, C. Lee. Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs. **P & T : A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management**, v. 42, n. 12, p. 742-755, dez. 2017.

VILLANOVA, Janaina C.O; Oréfice, Rodrigo L. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 51-64, mar. 2010.