

Fernanda Regina Steinmacher

ENCAPSULAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS HIDROFÍLICOS E HIDROFÓBICOS EM MICROPARTÍCULAS MULTICOMPARTIMENTADAS DE PLLA E AMIDO RETICULADO

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

Orientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo

Co-orientadoras: Prof^a Dr^a Claudia Sayer

Florianópolis
2014

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

Steinmacher, Fernanda Regina
ENCAPSULAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS HIDROFÍLICOS E HI-
DROFÓBICOS EM MICROPARTÍCULAS MULTICOMPARTIMENTADAS DE PLLA
E AMIDO RETICULADO / Fernanda Regina Steinmacher ;
orientador, Pedro Henrique Hermes Araujo ; coorientadora,
Claudia Sayer. - Florianópolis, SC, 2014.
170 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Polimerização em miniemulsão
inversa. 3. Membrana porosa SPG. 4. Tuberculose. 5.
Degradação enzimática. I. Araujo, Pedro Henrique Hermes.
II. Sayer, Claudia. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
IV. Título.

Fernanda Regina Steinmacher

ENCAPSULAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS HIDROFÍLICOS E HIDROFÓBICOS EM MICROPARTÍCULAS MULTICOMPARTIMENTADAS DE PLLA E AMIDO RETICULADO

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Pedro Henrique Hermes de Araújo
Orientador

Profa. Dra. Claudia Sayer
Co-orientadora

Prof. Dr. Ricardo A. F. Machado
Coordenador do CPGENQ

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Ana Paula Serafini
Immich Boemo

Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar
Carciofi

Profa. Dra. Sandra Regina Salvador
Ferreira

Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves

Prof. Dr. Cesar Liberato Petzhold

Florianópolis, 14 de Abril de 2014.

Aos meus pais e meus irmãos,
Minhas maiores referências.

AGRADECIMENTOS

Análogo a construção de uma casa, gostaria de agradecer a todos que participaram ao longo destes quatro últimos anos no desenvolvimento deste trabalho, que se tornou meu lar. Primeiramente, agradeço a Deus por ter me cedido o terreno, onde em cima com a base e suporte da minha família pude edificar esta morada. Aos Profs. Dr. Pedro e Dra. Claudia pela colaboração, elaboração e desenvolvimento deste projeto e, ao CNPQ e CAPES pelo apoio financeiro. Ao Laboratório de Controle de Processos – LCP - UFSC, que me proporcionou todos os recursos necessário para erguer as paredes e estruturar esta edificação. À Prof. Dra. Katharina Landfester e à Dra. Anna Musyanovych que, juntamente com os Profs. Dr. Pedro e Dra. Claudia, abriram as portas e as janelas. Somente com eles e com a oportunidade de pesquisar junto ao Instituto Max-Planck para Pesquisa em Polímeros – MPIP – Mainz, Alemanha, pude ver além do horizonte e enriquecer o trabalho aqui apresentado. Agradeço em especial aos técnicos do MPIP, Sabrina Brandt, Gunnar Glasser e Anke Kaltbeitzel por me auxiliarem na adaptação ao laboratório, introdução a microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal de varredura a laser, respectivamente. Com o auxílio destes, juntamente com os Laboratórios Multiusuário de Estudos em Biologia II e Central de Microscopia Eletrônica, ambos situados na UFSC, obtive os resultados e pude fazer as discussões com segurança, simbolizando o telhado da casa. Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram no desenvolvimento deste trabalho, mobiliando esta casa ao meu lado, especialmente ao Vitor A. F. Deichmann, que trouxe muitas alegrias, ajudou a pintar as paredes, colocou flores na mesa e enfeitou os cômodos, auxiliando com as análises de $^1\text{H-NMR}$ e microscopia de fluorescência. Além de todo o seu apoio, amor e carinho, que foram muito importante para mim nesta etapa. Agradeço a comissão da banca por aceitar o convite e no julgamento deste projeto. E a todos meus amigos que de certa forma também colaboraram me tirando de casa, me convidando para passear. Ao final desta etapa, posso afirmar que estou satisfeita e feliz, não apenas com os resultados obtidos, mas com o meu crescimento pessoal e profissional. Com ajuda de toda a equipe mencionada, consegui ir além do que eu havia inicialmente proposto. Olhando um pouco distante, vejo que não construí uma casa, mas sim um prédio, onde todos que me acompanharam tem uma morada em meu coração. Obrigada!

“A única maneira de evitar erros é não tentando novas ideias”
Atribuído a Albert Einstein

RESUMO

Partículas compartimentadas têm recebido considerável esforços para a sua elaboração, síntese e aplicação como sistemas carreadores de fármacos. Uma estrutura multicompartmentada apresenta diversas vantagens sobre particular de um único compartimento, como por exemplo, encapsulação de uma grande variedade de compostos, tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos, em uma única partícula. Neste trabalho, um sistema contendo múltiplos compartimentos para encapsulação e liberação modificada de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos foi proposto. Micropartículas multicompartmentadas foram obtidas a partir da encapsulação de nanocápsulas em micropartículas, permitindo a encapsulação simultânea de fármacos não-compatíveis em uma única estrutura. Nanocápsulas (NCs) de amido reticulado com núcleo aquoso e tamanho em torno de 200 nm foram preparadas a partir da polimerização interfacial com 2,4- tolueno diisocianato (TDI) usando a técnica de miniemulsão inversa. A estrutura casca-núcleo foi confirmada por microscopia eletrônica de varredura (SEM). Os resultados revelaram que as NCs apresentaram alta eficiência de encapsulação de componentes hidrofílicos. As NCs foram encapsuladas em micropartículas (MPs) de poli(ácido láctico) PLLA. MPs monodispersas de PLLA com tamanho em torno de 5 μm foram preparadas a partir da técnica de membrana porosa SPG seguida de evaporação de solvente. A investigação de eficiência de encapsulação (EE) das NCs em micropartículas (em torno de 85 %) foi possível com o uso de um marcador hidrofílico, sulforodamina 101, pre-encapsulado nas NCs de amido reticulado. Espectroscopia de fluorescência, SEM e microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) foram essenciais na caracterização das micropartículas multicompartmentadas. Modificações na superfície das NCs foram realizadas, resultando em um aumento da EE, em torno de 90 %. Isoniazida e rifampicina foram os fármacos modelos coencapsulados. A biodegradabilidade do sistema multicompartmentado foi avaliada na presença de α -amilase e proteínase K. A escolha dos dois polímeros (amido e PLLA) para o desenvolvimento da partícula multicompartmentada proporcionou uma degradação enzimática seletiva. O sistema desenvolvido se apresentou versátil e potencial na coencapsulação e liberação combinada de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos e/ou nanocápsulas desencadeada por degradação enzimática.

Palavras chaves: polimerização em miniemulsão inversa, membrana porosa SPG, tuberculose.

ABSTRACT

Compartment particle have received considerable efforts for its elaboration, synthesis and application as drug carriers systems. A multicompartiment structure offer several advantages compared to single compartment particles, such as, encapsulation of a wide range of compounds, including hydrophilic and hydrophobic in the same particle. In the present work, a modified drug delivery system for administration of hydrophilic and hydrophobic drugs in the same device was proposed. Multicompartimentalized microparticles were achieved encapsulating nanocapsules into microparticles, allowing the simultaneous encapsulation of non-compatible compounds in the same structure. 200 nm aqueous-core nanocapsules (NCs) composed of cross-linked starch, were prepared by inverse miniemulsion polymerization using 2,4-toluene diisocyanate (TDI). The core-shell structure was confirmed by scanning electron microscopy (SEM). The results revealed that the obtained NCs achieved high encapsulation efficiency of hydrophilic compound. The NCs were entrapped into poly(lactic acid) PLLA microparticles (MPs). Monodisperse PLLA MPs were prepared using SPG membrane approach followed by solvent evaporation technique. The evaluation of encapsulation efficiency (EE) of NCs into the MPs (around 85 %) was possible using a fluorescence dye, sulforhodamine 101, which was previously encapsulated into the NCs. Fluorescence spectroscopy, SEM and confocal laser scanning microscopy (CLSM) were essential for the characterization of multiple compartments particles. Surface modification of NCs were performed and increased the EE of NCs into PLLA MPs to around 90 %. Isoniazid and rifampicin were the model drugs coencapsulated. The biodegradability of the multiple compartment system was investigated in the presence of α -amylase and proteinase K. The choice of the polymers (starch and PLLA) for the development of the multicompartiment particle provided a selective enzymatic degradation. The developed system showed potencial for coencapsulation and combined delivery of hydrophilic and hydrophobic drugs and/or nanocapsules triggered by enzymatic degradation.

Keywords: inverse miniemulsion polymerization, SPG membrane, tuberculosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Ilustração esquemática e comparativa entre uma célula biológica (direita) e uma partícula multicompartmentada (esquerda). (i) Cápsulas de hidrogel polimérica formada pela técnica camada-por-camada. (ii) Subunidades mimetizando organelas celulares. (iii) Lipossomas incorporados na casca interior.	33
Figura 2.1 Estrutura química de (a) PLLA e (b) PLGA.	40
Figura 2.2 Distribuição das partículas no sistema respiratório.....	41
Figura 2.3 Imagem obtida por SEM da superfície polida da membrana SPG com tamanho de poro médio 15 μm	42
Figura 2.4 (a) Esquema ilustrativo do princípio da emulsificação por membrana SPG e (b) imagens obtidas por SEM de micropartículas de PLGA.	43
Figura 2.5 Apresentação da dinâmica de formação de uma miniemulsão até atingir o estado estacionário obtida pela aplicação de ultrassom (US)	45
Figura 2.6 Representação esquemática de miniemulsão a) direta e b) inversa.	46
Figura 3.1 a) Estrutura molecular geral do polirricinoleato de poliglicerol (PGPR) com $n=3$, e R1, R2 e R3 podem ser hidrogênicos ou polímero linear apresentados em b), onde m assume valor entre 5 e 8.	55
Figura 3.2 Esquema do processo de polimerização interfacial em miniemulsão inversa.	57
Figura 3.3 Diâmetro médio das nanogotas em função da concentração de surfatante (a) 0,1 g e (c) 0,2 g de amido. Análise feita em triplicata para cálculo do desvio padrão. Evolução do diâmetro médio das nanogotas ao longo de tempo de reação a 60 $^{\circ}\text{C}$ (b) 0,1 g e (d) 0,2 g de amido. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com método de Tukey de comparações múltiplas ($p < 0,05$).	60
Figura 3.4 Polimerização interfacial por etapas via miniemulsão inversa para síntese de nanopartículas de amido reticulado com TDI.	62
Figura 3.5 Resultados obtidos em análise de espectroscopia de FT-IR em ATR (a) espectro geral e (b) espectro na faixa que evidencia a obtenção de nanopartículas de amido reticulado.	63
Figura 3.6 Composição da casca polimérica. Razão entre áreas dos picos característicos de poliuretano e poliuréia.	64
Figura 3.7 Resultados obtidos em análise de espectroscopia de FT-IR em ATR (a) espectro geral e (b) espectro na faixa que evidencia a	

obtenção de nanopartículas de amido reticulado segundo a formulação S 1.	65
Figura 3.8 Micrografias obtidas por TEM das nanopartículas sintetizadas a partir da reação S_1 dispersas em (a) ciclohexano e (b) em solução aquosa de SLS.	65
Figura 3.9 Efeito da concentração do surfatante sobre as propriedades das nanopartículas sintetizadas com (a) 0,1 g e (b) 0,2 g de amido. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com método de Tukey de comparações das médias ($p < 0,05$).	67
Figura 3.10 Esquema da orientação de duas moléculas de PGPR in uma miniemulsão inversa absorvida na interface ciclohexano e gota aquosa.	68
Figura 3.11 Imagens obtidas a partir de microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas obtidas a partir de reações com (a) 0,1 g e (b) 0,2 g de amido.	69
Figura 3.12 Resultados obtidos em análise em espectroscopia FT-IR em ATR (a) espectro na região de interesse e (b) composição da casca polimérica. Razão entre áreas dos picos característicos de poliuretano e poliuréia.	70
Figura 3.13 Efeito da (a) concentração de sal sobre nanopartículas de amido reticuladas com 80 mg de TDI e (b) tipo de co-estabilizador. (■) NaCl e () NaCl e CuSO_4 na composição de nanopartículas sintetizadas com 0,1 g de amido dispersas em ciclohexano e, (□) NaCl e () NaCl e CuSO_4 sobre a identidade das nanopartículas dispersas em solução aquosa.	71
Figura 3.14 Resultados obtidos em análise em espectroscopia FT-IR em ATR (a) espectro na região de interesse e (b) composição da casca polimérica: razões entre áreas dos picos característica de poliuretano, poliuréia e isocianato residual.	73
Figura 3.15 Efeito da concentração de TDI sobre nanopartículas de amido reticuladas com 0,1g de amido dispersas em (■) ciclohexano e () solução aquosa.	75
Figura 3.16 Imagens obtidas nanopartículas TDI_3 a partir de microscopia eletrônica de (a) transmissão, TEM e de (b) varredura, SEM.	75
Figura 3.17 Resultados obtidos em análise em espectroscopia FT-IR (a) espectro na região de interesse e (b) composição da casca polimérica: razões entre áreas dos picos característica de poliuretano, poliuréia e isocianato residual.	76
Figura 3.18 Resultados obtidos em análise em espectroscopia FT-IR de nanocápsulas preparadas com 160 mg de TDI em diferentes	

temperaturas (a) 60 °C e (b) 25 °C. Ambas com amido previamente gelatinizado.....	77
Figura 3.19 Efeito da etapa de gelatinização do amido na composição da casca polimérica das NCs. (a) espectros na região de interesse obtidos em análise FT-IR (b) razões entre áreas dos picos característica de poliuretano e poliuréia.	78
Figura 3.20 Efeito da temperatura de reação com amido disperso na fase dispersa (a) espectros na região de interesse obtidos em análise FT-IR (b) razões entre áreas dos picos característica de poliuretano e poliuréia.....	79
Figura 3.21 Efeito da (a) condição de solubilização do amido em água e (b) temperatura de reação sobre nanopartículas de amido reticuladas dispersas em (■) ciclohexano e () solução aquosa. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com método de Tukey de comparações das médias ($p < 0,05$).....	80
Figura 3.22 Imagem obtida por microscópio óptico dos grânulos de amido solúvel de batata dispersos em água por 20 minutos a temperatura ambiente.....	82
Figura 3.23 Índice de solubilidade do amido de batata solúvel em função da temperatura e concentração constante.....	83
Figura 3.24 Efeito do tempo de ultrassonificação sobre o diâmetro inicial e índice de polidispersão (IPd) das nanogotas aquosas de amido. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com método de Tukey ($p < 0,05$).....	84
Figura 3.25 Efeito do tempo de alimentação da solução de TDI sobre o diâmetro final das nanopartículas de amido reticulado após 2 horas de reação a 60 °C. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com método de Tukey de comparações ($p < 0,05$).	86
Figura 4.1 Estrutura molecular (a) amilose, cadeia linear (Glu-Glu α -1,4) e (b) amilopectina, cadeia ramificada (Glu-Glu α -1,4 e α -1,6).	90
Figura 4.2 Esquema de encapsulação de compostos hidrofílicos (SR 101) a partir de polimerização interfacial em miniemulsão inversa.	92
Figura 4.3 Esquema do procedimento adotado para determinação de eficiência de encapsulação (EE %) e permeabilidade da casca polimérica a partir da migração de SR 101 para a fase contínua.....	94
Figura 4.4 Esquema do procedimento adotado para investigação da cinética de liberação de marcador hidrofílico desencadeada a partir de degradação enzimática do amido pela amilase.	95
Figura 4.5 Imagem de microscopia de nanocápsulas de amido reticulado com 160 mg de TDI.....	96

Figura 4.6 Eficiência de encapsulação do SR 101 em nanocápsulas preparadas com diferentes quantidades de TDI. (b) Migração cumulativa de corante hidrofílico das cápsulas para a fase aquosa contínua a 37 °C.....	96
Figura 4.7 Cinética de liberação de SR 101 desencadeada por degradação enzimática das nanocápsulas sintetizadas com 160 mg de TDI com diferentes concentrações de amilase.	97
Figura 4.8 Estabilidade do SR 101. (a) Espectros após cada etapa realizada para síntese das nanocápsulas. (b) Sinal de Fluorescência no comprimento de onda 610 nm 1) inicial, após 2)30 min em 90 °C, 3) 1 hora em 25 °C, 4) ultrasonicação e 5) 2 horas a 60 °C.	99
Figura 4.9 Perfil de intensidade de fluorescência com relação a concentração de SR 101. Curva de calibração de SR 101.	99
Figura 4.10 Espectro de absorvância do SR 101 na região do visível.	100
Figura 4.11 Perfil de (a) intensidade de absorção (b) moles de amido remanescente com o tempo de reação enzimática.	100
Figura 5.1 Esquema do sistema experimental utilizado para a preparação das microgotas de emulsão (a) módulo da membrana SPG, (b) alimentação de nitrogênio, (c) reservatório da fase dispersa, (d) reservatório da fase aquosa contínua, (e) agitador magnético, (f) fase dispersa e (g) fase contínua.	104
Figura 5.2 Imagens obtida a partir de análise em SEM das micropartículas (a) UT 16, (b) UT 1, (c) UT 13 e (d) UT 4-1 obtidas usando um ultratúrax a 18.000 rpm por 4 min.	105
Figura 5.3 Micropartículas de PLLA obtidas a partir da técnica de membrana (a) 2 µm (MT 2-1) e (b) 5 µm (MT 5-1) de tamanho dos poros da membrana.....	107
Figura 5.4 Efeito da concentração de PLLA sobre a distribuição do diâmetro das partículas.	109
Figura 5.5 Efeito da concentração de surfatante na fase contínua sobre a distribuição do diâmetro das partículas.	110
Figura 5.6 Efeito da concentração de surfatante. Comparação entre micropartículas de PLLA (a) MT 5-4 e (b) MT 5-11 (com uma maior quantidade de SLS), obtida pela técnica de membrana (5 µm de tamanho de poro da membrana).	110
Figura 6.1 Exemplos de carreadores (circulo interno) e suas subunidade (circulo médio) utilizados na elaboração de partículas multicompartimentadas (circulo externo). Em sentido horário, começando do topo, os carreadores são cápsulas poliméricas, lipossomas, partículas coloidais e polimerossomos. Cápsula	

polimérica subcompartmentalizada com (a) cubossomos ou (b) lipossomos (capsossomos). (c) Lipossomos em lipossomos (vesossomos), (d) coloidossomos multicompartmentados, (e) polimerossomos em polimerossomos, Cápsulas poliméricas subcompartmentalizadas com (f) polimerossomos ou (g) cápsulas poliméricas).	114
Figura 6.2 Esquema do processo de microencapsulação de NCs em micropartículas de PLLA.	117
Figura 6.3 Esquema do processo de enxertia de oligômeros de PLLA-NCO-terminado em NCs de amido sintetizadas em uma fase contínua composta por ciclohexano:clorofórmio 2:1.	118
Figura 6.4 Determinação de eficiência de encapsulação das NCs.....	120
Figura 6.5 Imagem de SEM das NCs (a) dispersas em ciclohexano (b) redispersas em clorofórmio.....	122
Figura 6.6 Estudo comparativo de morfologia de micropartículas de PLLA. Amostra UT-15 (a) sem nanocápsulas e (b) com nanocápsulas (20 mg).....	122
Figura 6.7 Estudo comparativo de morfologia de micropartículas de PLLA. Amostra UT 4-2 (a) sem nanocápsulas e (b) com nanocápsulas (70 mg).....	123
Figura 6.8 Imagem de SEM das NCs aprisionadas em micropartículas MT 2-2 obtida pela técnica de membrana (tamanho de poro igual a 2 μ m).	124
Figura 6.9 Imagens de SEM de micropartículas MT 5-8 obtidas pela técnica de membrana SPG com NCs de amido adicionadas a fase dispersa (a) dispersas em ciclohexano e (b) redispersas em clorofórmio.	125
Figura 6.10 Imagens de SEM das micropartículas de PLLA (MT 5-8), depois de centrifugação durante 20 min a 1000 rpm.	126
Figura 6.11 Nanocápsulas aprisionadas em micropartículas MT 5-8. a) Microscopia de luz comum e b) Microscopia confocal de varredura a laser da amostra.	127
Figura 6.12 Nanocápsulas aprisionadas em micropartículas MT 5-8. a) Microscopia de luz comum e b) Microscopia confocal de varredura a laser da amostra.	128
Figura 6.13 Nanocápsulas aprisionadas em micropartículas MT 5-16. a) Microscopia de luz comum e b) Microscopia confocal de varredura a laser da amostra.	128
Figura 6.14 Síntese de oligômeros de PLLA. Esquema da reação de polimerização e espectro de $^1\text{H-NMR}$ obtido em clorofórmio- d_1 . .	129

Figura 6.15 Síntese de PLLA-NCO-terminado a partir de polimerização de adição de TDI com PLLA oligomérico em solvente.....	130
Figura 6.16 Espectro obtido a partir de análise de FT-IR líquido de PLLA e PLLA-NCO-terminado (a) característico (b) em detalhe.	131
Figura 6.17 Espectra de ¹ H-NMR obtido em clorofórmio-d ₁ de (a) PLLA-NCO-terminado e (b) PLLA.	133
Figura 6.18 Espectros obtidos a partir de análise de FT-IR das nanocápsulas após síntese em (a) ciclohexano e (b) 2:1 de ciclohexano:clorofórmio, ambas a 25 °C por 24 h.	134
Figura 6.19 Espectros de FT-IR de nanocápsulas sintetizadas com (a) 100 mg de TDI e 20 mg de PLLA-NCO-terminado e (b) 160 mg de TDI. .	135
Figura 6.20 Nanocápsulas aprisionadas em micropartículas MT 5-14. a) Microscopia de luz comum e b) Microscopia confocal de varredura a laser da amostra.	136
Figura 6.21 Imagem de SEM das micropartículas das amostras (a) MT 5-8 e (b) MT 5-16, ambas com NCs sintetizadas com 160 mg de TDI e (c) MT 5-14 com NCs sintetizadas com 100 mg de TDI e 20 mg de PLLA-NCO-terminado.....	136
Figura 6.22 Perfil de intensidade de fluorescência com relação a concentração de NCs de amido marcadas com SR 101. Curva de calibração de NCs.....	138
Figura 7.1 Estrutura molecular do surfatante pulmonar, 2,3-dipalmitoil-sn-glicerol-1-fosfocolina.....	143
Figura 7.2 Espectros de fluorescência (intensidade normalizada) dos marcadores PMI (solução em tolueno) e SR 101 (solução em etanol). Região dos filtros verde e vermelho.	144
Figura 7.3 Co-encapsulação de NCs de amido reticulado carregadas com SR 101 (vermelho) e de marcador fluorescente hidrofóbico PMI (verde). (a) Micropartículas MT 5-8. Estruturas moleculares de (b) PMI e (c) SR 101. (d) Micropartículas MT 5-14. Análise realizada por CSLM.....	146
Figura 7.4 Degradação ácida de micropartículas multicompartmentadas MT 5-8 de PLLA com subunidade de amido reticulado após 3 dias em solução de HCl 0,1 M.....	147
Figura 7.5 Degradação enzimática de micropartículas multicompartmentadas MT 5-8 de PLLA com subunidade de amido reticulado (a) sem degradação (b) após 1 dia e (c) após 5 dias de reação enzimática com 9 mg/ml de amilase.	148
Figura 7.6 Micropartículas multicompartmentadas MT 5-8 de PLLA co-encapsulando PMI e nanocápsulas de amido reticulado SR 101.	

Imagem de microscopia de fluorescência utilizando filtro na região do verde.....	148
Figura 7.7 Degradação enzimática de micropartículas multicompartmentadas MT 5-8 de PLLA com subunidade de amido reticulado co-encapsulando SR 101 e PMI a partir de proteinase K 9 mg/ml. Imagem de microscopia de fluorescência (a) e (c) luz comum e (b) e (d) filtro na região do vermelho.....	149
Figura 7.8 (a) Cinética de liberação da isoniazida, apresentada em (b), a partir de nanocápsulas de amido reticulado com 160 mg de TDI..	150
Figura 7.9 Imagem obtida a partir de SEM de micropartículas MT 5-8 preparadas com (a) PLLA e (b) PLGA, ambas com NCs e rifampicina após lavagem por centrifugação.....	151
Figura 7.10 (a) Imagem obtida a partir de SEM de micropartículas de PLLA com NCs e rifampicina sem lavagem por centrifugação. (b) Estrutura molecular de rifampicina.....	152
Figura 7.11 (a) Cinética de liberação da rifampicina a partir de degradação enzimática do PLLA por proteinase K. (b) Comparação entre a liberação desencadeada por degradação enzimática e estabilidade da rifampicina em solução enzimática com 2,0 mg/ml de proteinase K.....	152
Figura 7.12 Perfil de absorvância com relação a concentração de isoniazida. Curva de calibração.	154
Figura 7.13 Perfil de absorvância com relação a concentração de rifampicina. Curva de calibração.	154

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 3.1	Formulação das miniemulsões inversa de amido gelatinizado para avaliação da estabilidade a 60 °C.	57
Tabela 3.2	Formulação das miniemulsão inversa do amido posteriormente polimerizadas com 120 mg de TDI.	63
Tabela 3.3	Características das nanopartículas de amido reticulado obtidos com diferentes concentrações de surfatante e 120 mg de TDI.	66
Tabela 3.4	Formulação das miniemulsões inversa de amido obtidas com 7.5 g de ciclohexano e posteriormente polimerizadas a 60 °C por 2 horas.	70
Tabela 3.5	Características das nanopartículas de amido reticulado obtidos com diferentes tipos de co-estabilizador.	71
Tabela 3.6	Formulação das miniemulsões inversa de amido obtidas com 7,5 g de ciclohexano e posteriormente polimerizadas a 60 °C por 2 horas.	74
Tabela 3.7	Características das nanopartículas de amido reticulado obtidos com diferentes concentrações de surfatante.	74
Tabela 3.8	Formulação das reações de polimerização do amido com TDI em miniemulsão inversa em diferentes temperaturas.	77
Tabela 3.9	Características das nanopartículas de amido reticulado obtidos com diferentes concentrações de surfatante.	79
Tabela 3.10	Formulação das miniemulsão para avaliação do efeito do ultrassom sobre a identidade das nanogotas.	84
Tabela 3.11	Influencia do tipo e concentração de co-estabilizador sobre a tensão interfacial entre gota de solução salina e ciclohexano com surfatante.	87
Tabela 5.1	Formulação das micropartículas obtidas a partir de emulsificação com ultraturrax a 18.000 rpm por 4 min, seguida de evaporação do solvente a 40 °C.	105
Tabela 5.2	Formulação de micropartículas obtidas pela técnica de membrana SPG, seguida de evaporação do solvente.	107
Tabela 6.1	Formulação de micropartículas contendo as nanocápsulas de amido reticulado.	121
Tabela 6.2	Formulação de micropartículas contendo as nanocápsulas de amido reticulado.	124
Tabela 6.3	Propriedades do PLLA oligomérico sintetizado com 1,4-BD.	130
Tabela 6.4	Propriedades do PLLA-NCO-terminado oligomérico sintetizado com TDI em solvente.	131

Tabela 6.5 Comparação entre as eficiências de encapsulação de micropartículas preparadas por diferentes métodos.	136
Tabela 7.1 Eficiência de co-encapsulação de rifampicina e NCs de amido em micropartículas poliméricas de PLLA ou de PLGA 85:15, segundo formulação MT 5-8.....	151

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{H-NMR}$	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
ATR	Módulo de refletância total atenuada
BD	1,4-butanodiol
CLSM	Microscopia confocal de varredura a laser
$\text{Cu.SO}_4.\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de cobre II pentahidratado
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
EE	Eficiência de encapsulação (%)
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GPC	Cromatografia de permeação em gel
IPd	Índice de polidispersão
LCP	Laboratório de Controle de Processos
M_n	Massa molar média numérica
M_w	Massa molar ponderal média
MPIP	Instituto Max-Planck para Pesquisa em Polímeros
MPs	Micropartículas
NaCl	Cloreto de sódio
NCO	Isocianato
NCs	Nanocápsulas
OH	Hidroxilas
PBS	Solução tampão de fosfato
PGPR	Polirricinoleato de poliglicerol
PLGA	Poli(lático-co-glicólico)
PLLA	Poli(ácido lático)
PMI	N-(2,6-diisopropilfenil) Perileno-3,4-dicarboximida
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
SLS	Lauril sulfato de sódio
$\text{Sn}(\text{Oct})_2$	$\text{Sn}(\text{II})$ 2-etilhexanoato
SPG	Fibra de vidro Shirasu
SR 101	Sulforodamina 101
T	Temperatura de reação ($^{\circ}\text{C}$)
TDI	2,4-tolueno diisocianato
TS	Teor de sólidos (%)
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	31
1.1 <i>Objetivos Gerais</i>	35
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	37
2.1 <i>Tuberculose</i>	37
2.2 <i>Aplicação Pulmonar de Sistemas de Liberação Modificada</i>	38
2.3 <i>Micropartículas Biodegradáveis e Monodispersas</i>	40
2.3.1 <i>Emulsificação por Membrana Shirasu Porosa de Fibra de Vidro</i>	41
2.4 <i>Preparação de Nanopartículas</i>	44
2.4.1 <i>Polimerização em Miniemulsão Inversa</i>	44
2.4.2 <i>Estabilidade das Nanogotas</i>	47
2.4.3 <i>Nucleação das Nanogotas</i>	48
2.4.4 <i>Mecanismos de Polimerização</i>	50
2.5 <i>Síntese de Nanocápsulas via Polimerização em Miniemulsão Inversa</i>	51
SÍNTESE DE NANOCÁPSULAS BIODEGRADÁVEIS CONTENDO NÚCLEO AQUOSO A PARTIR DE POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO INVERSA	53
3.1 <i>Introdução</i>	53
3.2 <i>Procedimentos Experimentais</i>	55
3.2.1 <i>Materiais</i>	55
3.2.2 <i>Procedimentos Experimentais</i>	55
3.2.2.1 <i>Estabilidade das Miniemulsões Inversas</i>	56
3.2.2.2 <i>Redispersão das Nanocápsulas Sintetizadas em Água</i>	57
3.2.3 <i>Caracterização</i>	58
3.2.3.1 <i>Tamanho Médio</i>	58
3.2.3.2 <i>Composição da Casca Polimérica</i>	58
3.2.3.3 <i>Morfologia das Partículas</i>	58
3.2.4 <i>Procedimento Estatístico</i>	59

3.3	<i>Resultados e Discussão</i>	59
3.4	<i>Síntese de Nanopartículas de Amido Reticulado</i>	61
3.4.1	Efeito da Concentração de Surfatante	62
3.4.2	Efeito da Concentração de Amido	68
3.4.3	Efeito do Tipo e Concentração de Co-estabilizador	69
3.4.4	Efeito da Concentração de TDI	73
3.4.5	Avaliação Temperatura de Reação	76
3.5	<i>Conclusões</i>	80
3.6	<i>Informações de Suporte</i>	81
3.6.1	Caracterização do Amido	81
3.6.1.1	Morfologia do Grânulo de Amido	81
3.6.1.2	Índice de Solubilidade do Amido	81
3.6.2	Gelatinização do Amido	81
3.6.3	Obtenção de Miniemulsões Estáveis	83
3.6.3.1	Tempo de Ultrasonicação	83
3.6.4	Polimerização em Miniemulsão Inversa	85
3.6.4.1	Influência do Tempo de Gotejamento do TDI	85
3.6.4.2	Efeito do Tipo e Concentração de Co-estabilizador	86

ENCAPSULAÇÃO E LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS HIDROFÍLICOS EM NANOCÁPSULAS BIODEGRADÁVEIS

4.1	<i>Introdução</i>	89
4.2	<i>Procedimentos Experimentais</i>	92
4.2.1	Materiais	92
4.2.2	Procedimentos Experimentais	92
4.2.3	Caracterização	93
4.2.3.1	Tamanho Médio das Partículas	93
4.2.3.2	Eficiência de Encapsulação e Permeabilidade da Casca Polimérica	93
4.2.3.3	Liberação de Compostos Hidrofílicos	94
4.3	<i>Resultados e Discussão</i>	95
4.4	<i>Conclusões</i>	98
4.5	<i>Informações de Suporte</i>	99

OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS BIODEGRADÁVEIS E MONODISPERSAS	101
5.1 <i>Introdução</i>	101
5.2 <i>Procedimentos Experimentais</i>	102
5.2.1 Materiais	102
5.2.2 Procedimentos Experimentais	102
5.2.3 Caracterização das Micropartículas	103
5.3 <i>Resultados e Discussão</i>	104
5.4 <i>Conclusões</i>	110

MICROPARTÍCULAS BIODEGRADÁVEIS E MULTICOMPARTIMENTADAS	113
6.1 <i>Introdução</i>	113
6.2 <i>Procedimentos Experimentais</i>	115
6.2.1 Materiais	115
6.2.2 Procedimentos Experimentais	116
6.2.2.1 Síntese de Nanocápsulas de Amido Reticulado	116
6.2.2.2 Microencapsulação de NCs de Amido em Micropartículas de PLLA	116
6.2.2.3 Compatibilização das NCs de Amido com Micropartículas de PLLA	117
6.2.3 Caracterização	118
6.2.3.1 Tamanho e Morfologia de Partícula	118
6.2.3.2 Composição da Casca Polimérica	119
6.2.3.3 Eficiência de Aprisionamento de NCs em Micropartículas	119
6.2.3.4 Propriedades dos Oligômeros Sintetizados.	120
6.3 <i>Resultados e Discussão</i>	121
6.3.1 Compatibilização de NCs de amido reticulado com Micropartículas de PLLA	128
6.3.1.1 Síntese de Oligômeros	129
6.3.1.2 Síntese de Nanocápsulas	132
6.3.1.3 Preparação das Micropartículas	134
6.4 <i>Conclusões</i>	137
6.5 <i>Informações de Suporte</i>	137

CO-ENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS HIDROFÍLICOS E HIDROFÓBICOS EM MICROPARTÍCULAS MULTICOMPARTIMENTADAS E LIBERAÇÃO CONTROLADA	139
7.1 <i>Introdução</i>	139
7.2 <i>Procedimentos Experimentais</i>	140
7.2.1 <i>Materiais</i>	140
7.2.2 <i>Procedimentos Experimentais</i>	141
7.2.3 <i>Caracterização</i>	141
7.2.3.1 <i>Tamanho e Morfologia de Partícula</i>	141
7.2.3.2 <i>Eficiência de Encapsulação e Liberação de Fármaco Hidrofilico em Nanocápsulas de Amido</i>	142
7.2.3.3 <i>Eficiência de Encapsulação e Liberação do Fármaco Hidrofóbico em Micropartículas</i>	142
7.2.3.4 <i>Degradação Ácida das Micropartículas Multicompartmentadas</i>	143
7.2.3.5 <i>Degradação Enzimática das Micropartículas Multicompartmentadas e Liberação de Fármacos</i>	144
7.3 <i>Resultados e Discussão</i>	145
7.4 <i>Conclusões</i>	153
7.5 <i>Informações de Suporte</i>	153
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	155
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	159

INTRODUÇÃO

Sistemas de liberação controlada representam uma alternativa promissora na administração de fármacos, devido as diversas vantagens já estabelecidas na literatura sobre a administração convencional. Primeiramente, a aplicação de sistemas de liberação de fármacos foi proposta com a finalidade de não apenas liberar o composto ativo de maneira controlada, *e.g.* velocidade de liberação e período de tempo, mas também de manter a concentração do fármaco dentro da faixa terapêutica indicada (COELHO *et al.*, 2010). Contudo, foi observado que estes sistemas também são capazes de promover a vetorização de fármacos a tecidos e células alvos (PANDEY *et al.*, 2003; PANDEY & KHULLER, 2006), além de proporcionarem uma proteção ao fármaco, diminuírem a dose administrada, o número de ingestões para manutenção da concentração terapêutica e, conseqüentemente, os efeitos adversos associados, uma vez que permitem modificar as propriedades cinéticas e dinâmicas do fármaco (CHELLAT *et al.*, 2005). Quando uma formulação de fármaco é elaborada de forma que a sua cinética e alvo de liberação sejam alterados, esta é denominada de sistema de liberação modificada. Contudo, outros termos alternativos para este tipo de liberação podem ser encontrados na literatura, tais como, controlada, sustentada, pulsátil, lenta, estendida, prolongada e etc (PANDEY & AHMAD, 2011).

Os procedimentos de encapsulação e vetorização de fármacos hidrofóbicos foram amplamente estudados e estão bem estabelecidos na literatura. Contudo, fármacos hidrossolúveis necessitam de uma estratégia de encapsulação diferenciada dos demais fármacos de natureza hidrofóbica. A administração de fármacos hidrofílicos representa um desafio inclusive em sua forma convencional, atribuído a sua fragilidade, fácil degradação e oxidação *in vivo*, a baixa absorção celular de macromoléculas e a rápida excreção renal (VRIGNAUD; BENOIT; SAULNIER, 2011). Consideráveis esforços têm sido feitos com a finalidade de identificar estratégias para evitar a degradação e a oxidação destes compostos até que estes agentes ativos possam atingir o alvo de ação, *e.g.* o tecido doente. Altas eficiências de encapsulação de compostos hidrofílicos foram relatadas utilizando a técnica de miniemulsão inversa para a preparação de nanopartículas poliméricas de núcleo aquoso (CRESPY *et al.*, 2007; BAIER *et al.*, 2010). Encapsulação destes compostos representa uma alternativa de proteção e de entrega eficiente de fármacos hidrofílicos ao tecido específico (VRIGNAUD; BENOIT; SAULNIER, 2011; BHARALI *et al.*, 2003). Além de outras vantagens já citadas, tais como, redução de efeitos colaterais decorrentes de admin-

istração direta, maior conforto do paciente com a diminuição de doses e melhora da farmacocinética, processo que abrange absorção, distribuição, biotransformação e excreção dos fármacos após a sua administração.

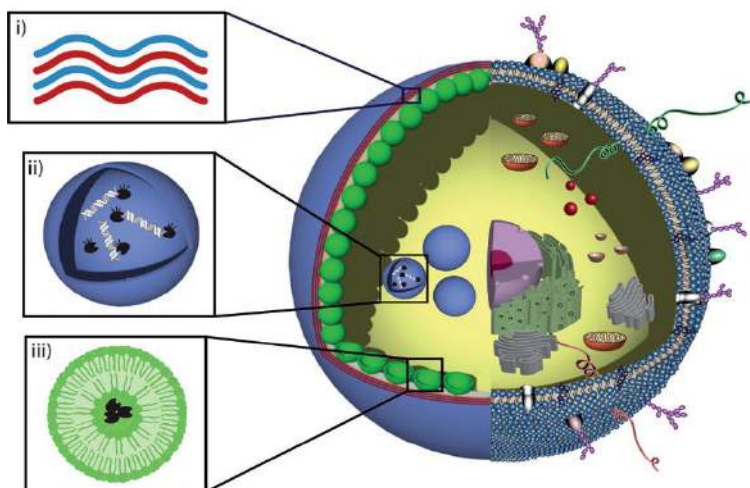
A importância de nanopartículas poliméricas aplicadas como sistemas de liberação controlada de fármacos já está reconhecido na literatura e, exemplos bem sucedidos de nanopartículas contendo um núcleo aquoso ou oleoso são facilmente encontrados (LIECHTY *et al.*, 2010). Uma questão importante a ser respondida é quais os benefícios que os esforços adicionais na obtenção de estruturas multicompartmentadas proporcionam com relação a terapias realizadas com os sistemas de liberação controlada já existentes, de um único compartimento.

Partículas multicompartmentadas, inspiradas pela natureza, têm recebido considerável esforços para a sua elaboração e síntese. Células biológicas apresentam uma estrutura multicompartmentada particular, a qual possibilita a separação espacial de uma variedade de compostos, regula precisamente uma série de reações enzimáticas, síntese de proteínas e permite o transporte de numerosos compostos (CHANDRAWATI *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2013). A Figura 1.1 apresenta uma comparação entre partículas compartmentadas e uma célula biológica. Contudo, a característica mais atrativa de sistemas compartmentados não necessariamente envolve a sua habilidade em mimetizar as reações intracelulares, tais como reações enzimáticas entre as partições (COSTA *et al.*, 2013). O desenvolvimento de tal estrutura com morfologia inspirada na natureza deve idealizar que, os diversos compartimentos exibam funções distintas, as quais não se combinariam naturalmente (COSTA *et al.*, 2013). Por exemplo, a possibilidade de encapsulação de uma grande variedade de compostos, tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos, em uma única partícula (CHANDRAWATI *et al.*, 2011), devido a sua facilidade em combinar propriedades físico-químicas (COSTA *et al.*, 2013).

Usualmente, partículas multicompartmentadas de tamanho acima de 4 μm são preparadas a partir da técnica camada-por-camada (*layer-by-layer*, LbL), a qual se baseia na deposição sequencial de material sobre uma partícula precursora, seguida de sacrifício do núcleo (CHANDRAWATI *et al.*, 2011; CHANDRAWATI *et al.*, 2009; STÄDLER *et al.*, 2009). Devido a habilidade de se organizar espontaneamente, lipossomos e copolímeros de bloco com caráter anfifílico (polimerossomos) representam as matrizes comumente investigadas no desenvolvimento de sistemas multicompartmentados. Arquiteturas multicompartmentadas como vesossomos, obtido a partir da encapsulação de lipossomos por lipossomos (AL-JAMAL & KOSTARELOS, 2007),

polimerossomos (polimerossomos-em-polimerossomos) (CHRISTIAN *et al.*, 2009) e capsossomos (lipossomos-em-cápsulas poliméricas de 3 μm) (CHANDRAWATI *et al.*, 2009) são os exemplos bem sucedidos encontrados na literatura aplicados como carreadores de fármacos. Poucos trabalhos objetivaram o desenvolvimento de sistemas subcompartimentados com nanopartículas poliméricas.

Figura 1.1 Ilustração esquemática e comparativa entre uma célula biológica (direita) e uma partícula multicompartimentada (esquerda). (i) Cápsulas de hidrogel polimérica formada pela técnica camada-por-camada. (ii) Subunidades mimetizando organelas celulares. (iii) Lipossomas incorporados na casca interior.



Fonte: adaptado de Städler *et al.* (2009).

A presença de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos e, a separação espacial de diversos compostos dentro de um mesmo sistema compartimentado ampliam as oportunidades de aplicações, incluindo a possibilidade de encapsulação de um coquetel de fármacos, que usualmente consistem em compostos não compatíveis entre si (PALEOS *et al.*, 2013). Dentre as doenças que necessitam de tratamento com um coquetel de fármacos se encontra a tuberculose, sendo a sua principal forma pulmonar. A quimioterapia eficiente para o tratamento da tuberculose engloba a administração diária de um coquetel de fármacos ao longo de 6 ou mais meses (KIM *et al.*, 2006), composto por rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambupol, sendo todos de caráter hidrofóbico, com exceção da isoniazida, que apresenta caráter hidrofílico. Diversos estu-

dos relataram a dificuldade em atingir a concentração sanguínea do fármaco recomendada para o tratamento da tuberculose, sendo a mínima igual a 8 µg/ml após 2 horas de administração para a rifampicina (DONALD; MARITZ & DIACON, 2011) e 3 µg/ml, para isoniazida (BABALIK et al., 2013).

A quimioterapia pode ser prejudicada devido à degradação dos fármacos antes de atingirem o alvo, baixo nível de permeabilidade celular às drogas ou, resistência primária ao fármaco (DEOL; KHULLER & JOSHI, 1997). De acordo com Angadi, Manjeshwar e Aminabhavi (2010), a isoniazida é caracterizada por ter uma meia-vida curta de duração entre 1 e 4 horas, enquanto que a rifampicina, entre 2 e 5 horas, dependendo do metabolismo (DONALD; MARITZ & DIACON, 2011). Concentração inadequada dos fármacos no local da infecção, falta de penetração dentro dos macrófagos pelos fármacos e curto tempo de meia vida dos fármacos também devem ser considerados como razões para a falência da quimioterapia.

Devido aos fatores descritos acima, muitos esforços foram realizados na encapsulação de isoniazida e rifampicina. Dutt e Khuller (2001) encapsularam rifampicina e isoniazida em uma mesma partícula e compararam a eficiência de encapsulação de ambos os fármacos em lipossomas e em micropartículas. Os autores obtiveram eficiências de encapsulação em lipossomas (0,1 – 0,2 µm) em torno de 47% e 9% para a rifampicina e isoniazida, respectivamente. Enquanto que em micropartículas de PLGA (na faixa de tamanho entre 51 e 75 µm), entre 3,5-4% e 7% de eficiência de encapsulação de rifampicina e isoniazida, respectivamente.

Administração a partir de inalação oral se tornou uma alternativa importante no tratamento de doenças pulmonares (ZENG; MARTIN & MARRIOTT, 1995). Contudo, sistemas particulados para liberação controlada de fármacos administrados a partir de inalação oral devem apresentar tamanhos de partícula específico. Segundo Kleinstreuer, Zhang e Donohue (2008), a baixa eficiência de liberação das formulações de aerossóis se deve a presença de partículas com tamanho aerodinâmico acima de 5 µm, as quais são retidas na boca e esôfago, direcionadas ao sistema digestivo em vez dos pulmões. E devido a presença de partículas muito pequenas (menores de 0,4 µm, tipicamente conhecidas como nanopartículas), as quais apresentam baixa deposição por serem facilmente expiradas ao longo da respiração.

Com objetivo de satisfazer os requisitos com relação ao tamanho médio das partículas para aplicação como sistema de liberação controla-

da administrado via inalação oral, Bharatwaj *et al.* (2010) incorporou nanocápsulas de poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo) de tamanho de aproximadamente 240 nm em micropartículas de caráter polidisperso e tamanho entre 0,5 e 4 μm de um co-polímero quitosana-co-poli(ácido láctico) utilizando uma metodologia modificada de emulsificação seguido de difusão do solvente. A micropartícula resultante proposta pelos autores, apesar de apresentar uma estrutura subdividida, possibilita apenas a encapsulação de fármacos hidrofóbicos. Até o presente momento não há relatos na literatura da preparação de micropartículas multicompartimentadas a partir da encapsulação de nanopartículas de núcleo aquoso em micropartículas.

Explorando a técnica de polimerização interfacial via miniemulsão inversa, nanocápsulas contendo núcleo aquoso são obtidas, otimizando a encapsulação de compostos hidrofílicos. A partir de encapsulação destas nanocápsulas em uma micropartícula composta por uma matriz hidrofóbica, almeja-se a encapsulação simultânea de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, satisfazendo os requisitos para aplicação de sistemas de liberação de fármacos para administração via inalação pulmonar.

1.1 OBJETIVOS GERAIS

A partir do exposto acima, este trabalho tem como objetivo principal preparar micropartículas multicompartimentadas a partir da combinação de diversas técnicas de preparação de partículas e materiais biodegradáveis, visando a aplicação destas como sistema de liberação de um coquetel de fármacos.

Para tanto, são objetivos específicos deste:

1. Preparar nanocápsulas de núcleo aquoso a partir da técnica de polimerização em miniemulsão inversa;
2. Avaliar a eficiência de encapsulação e liberação controlada de compostos hidrofílicos em nanocápsulas de núcleo aquoso;
3. Obtenção de micropartículas biodegradáveis e monodispersas;
4. Desenvolvimento de micropartículas multicompartimentadas;
5. Coencapsulação de fármacos hidrofílico e hidrofóbico em um único sistema multicompartimentado;
6. Avaliação da cinética de liberação de fármacos encapsulados em sistema multicompartimentado.

Para facilitar a compreensão, este trabalho foi dividido em capítulos. Um panorama geral retratando a situação atual da doença e do tratamento da tuberculose está descrito no Capítulo II. Além de uma revisão da literatura com relação a administração e encapsulação de fármacos, partículas multicompartimentadas e as técnicas utilizadas neste trabalho para a obtenção de um sistema de liberação de coquetel de fármacos. A preparação de nanopartículas via polimerização em miniemulsão inversa está descrita no Capítulo III e, a encapsulação de compostos hidrofílicos e a sua liberação desencadeada por degradação enzimática, em Capítulo IV. Um estudo na obtenção de micropartículas monodispersas está apresentado no Capítulo V. A obtenção de micropartículas multicompartimentadas está detalhada no Capítulo VI e, a coencapsulação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos em uma mesma partícula biodegradável e sua cinética de liberação está demonstrada em Capítulo VII. Por fim, são apresentadas as considerações finais e perspectivas futuras.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TUBERCULOSE

Cinco décadas de programas para controle da tuberculose, aplicando-se fármacos efetivos, não obtiveram sucesso na redução dos casos da doença (TYAGI; NANGPAL & SATCHIDANANDAM, 2011) e o controle da tuberculose ainda representa um problema mundial. De acordo com o relatório emitido pela World Health Organization (WHO, 2011), houve 8,8 milhões de incidentes de tuberculose (TB) em 2010 e, dentre estes, 1,1 milhões de mortes de pessoas negativas ao vírus causador da AIDS e 0,35 milhões de mortes relacionadas a pessoas positivas deste vírus. Apesar de o número absoluto de casos de tuberculose diminuir ao longo dos anos, desde 2006, esta doença continua sendo um problema mundial, agravado pela resistência do bacilo da doença aos diversos tratamentos (WHO, 2011).

Tuberculose é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), sendo um dos bacilos mais perigosos para a espécie humana. Entre as várias formas da doença, tuberculose pulmonar é a mais comum (DEOL & KHULLER, 1997). Nesta forma, macrófagos pulmonares apresentam numerosos bacilos tuberculosos. O Mtb é um patógeno intracelular que sobrevive dentro do compartimento fagossomal do macrófago (RAMACHANDRA et al., 2005). Usualmente, após a fagocitose da maioria das bactérias, fagossomos se fundem principalmente a endossomos e eventualmente a lisossomos para formar o fagolisossomos em um processo conhecido como maturação do fagossomos, acidificando o meio interno. Em contraste, Mtb e outras micobactérias, como *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium avium*, modificam o meio interno fagossomal, diminuindo a acidificação e inibindo o processo de maturação do fagossomo. Dessa forma, a sua sobrevivência é assistida pelos macrófagos (RAMACHANDRA et al., 2005).

A necessidade de administrar múltiplos fármacos diariamente é um problema comum relacionado com a falta de comprometimento do paciente (PANDEY & KHULLER, 2006). O uso de apenas um fármaco ou a administração inadequada dos fármacos pode ocasionar a seleção de bacilos mutantes resistentes e, conseqüentemente, a falha do tratamento. Segundo Mohamad, Ibrahim e Sadikun (2004), a era moderna da tuberculose tem sido caracterizada pelo aumento do número de casos de infecções causadas pela espécie Mtb resistente a múltiplos fármacos, especialmente em portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV). De acordo com o relatório emitido por WHO (2011), o diagnós-

tico de *Mtb* multi-resistente é caracterizado pela resistência a dois fármacos amplamente utilizados: isoniazida e rifampicina. Para estes casos, WHO (2011) recomenda um tratamento de, no mínimo, 20 meses, os quais podem ser acompanhados de diversos efeitos colaterais e probabilidade de cura de apenas 60 – 75%.

Adicionalmente, a quimioterapia pode ser prejudicada devido à degradação dos fármacos antes de atingirem o alvo, baixo nível de permeabilidade celular às drogas ou, resistência primária ao fármaco (DEOL; KHULLER & JOSHI, 1997). De acordo com Angadi, Manjeshwar e Aminabhavi (2010), a isoniazida é caracterizada por ter uma meia-vida curta de duração entre 1 e 4 horas, enquanto que a rifampicina, entre 2 e 5 horas, dependendo do metabolismo (DONALD; MARITZ & DIACON, 2011).

Diversos estudos e dentre estes, Donald, Maritz e Diacon (2011) relataram a dificuldade em atingir a concentração sanguínea dos fármacos recomendada para o tratamento da tuberculose. Concentração inadequada dos fármacos no local da infecção, falta de penetração dentro dos macrófagos pelos fármacos e curto tempo de meia vida dos fármacos também devem ser considerados como razões para a falência da quimioterapia. Dessa forma, novas estratégias para tratamento da tuberculose são necessárias com a finalidade de não apenas simplificar o número de dosagens, porém melhorar a eficiência e tolerância do tratamento.

2.2 APLICAÇÃO PULMONAR DE SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA

No caso da micobactéria da tuberculose, os pulmões são, se não os únicos, a principal porta de entrada para o desenvolvimento da doença (MISRA et al., 2011). Administração a partir de inalação oral se tornou uma modalidade de tratamento importante no tratamento de doenças pulmonares (ZENG; MARTIN & MARRIOTT, 1995). Esta rota de administração apresenta vantagens com relação às demais, tais como aumento da concentração de fármaco no local de ação e decréscimo dos possíveis efeitos colaterais (MANCA et al., 2008). Além destas vantagens, apesar de o pulmão e o trato respiratório serem capazes de metabolizar a dose de fármaco liberado, o pulmão apresenta uma grande área superficial absorviva, a qual permite uma grande quantidade de componentes na circulação sanguínea a taxas consideráveis (BYRON, 1990). Dessa forma, a administração por inalação oral não necessariamente se limita a tratamento de doenças pulmonares, podendo ser explorada como porta de entrada para a circulação sanguínea de diversos outros fárma-

cos. Esta rota de administração combinada a sistemas de liberação modificada de fármaco, aumentam as vantagens terapêuticas exponencialmente.

No entanto, elaborar e preparar um novo tratamento administrado por aerossóis é complexo e algumas variáveis devem ser exploradas. Segundo Hureau et al. (2009), os sistemas de inalação devem satisfazer os seguintes requisitos: a) as propriedades do fármaco e de seu carreador devem se manter inalteradas durante o processo de nebulização; b) o aerossol deve ser composto de gotas com tamanho na faixa entre 1 a 5 μm de diâmetro aerodinâmico e um período inferior a 15 minutos para se atingir a dose desejada e, c) a solução inalada deve apresentar pH e osmolaridade característicos precisos.

Enfatiza-se que a baixa eficiência de liberação das formulações mais tradicionais de aerossóis se deve a presença de partículas com tamanho acima de 5 μm , as quais são retidas na boca e esôfago, direcionadas ao sistema digestivo em vez dos pulmões. Por outro lado, partículas muito pequenas (menores de 0,4 μm , tipicamente conhecidas como nanopartículas) também apresentam baixa eficiência de deposição por serem facilmente expiradas ao longo da respiração (KLEINSTREUER; ZHANG & DONOHUE, 2008).

Dentre os sistemas de inalação oral se encontram os nebulizadores e inaladores de pó seco, tradicionalmente os mais estudados. Porém, inaladores pressurizados de dose medida (IPDm) representam um progresso inegável no tratamento de doenças respiratórias (IBIAPINA; CRUZ & CAMARGOS, 2004). Tecnicamente, eles são de grande relevância, uma vez que, entre os inaladores, são os mais baratos, portáteis e de fácil utilização (BHARATWAJ et al., 2010).

Sistemas particulados para liberação controlada de fármacos administrados a partir de IPDm devem apresentar, além do tamanho específico e outros pré-requisitos citados, uma química de superfície que permite tanto uma boa solvatação pelo propelente, quanto evite a agregação das partículas (BHARATWAJ et al., 2010). Usualmente, a superfície externa das partículas deve apresentar duas características importante, a) deve ser insolúvel no propelente, mantendo a integridade do sistema particulado e b) se romper ao entrar em contato com água. Segundo Bharatwaj et al. (2010), a solubilidade da casca polimérica em água é de grande relevância, uma vez que a micropartícula deve se desintegrar, evitando-se o processo de fagocitose na região dos alvéolos pelos macrófagos pulmonares.

O processo de fagocitose e a eliminação das micropartículas são uma preocupação da administração de sistemas de liberação de fármacos

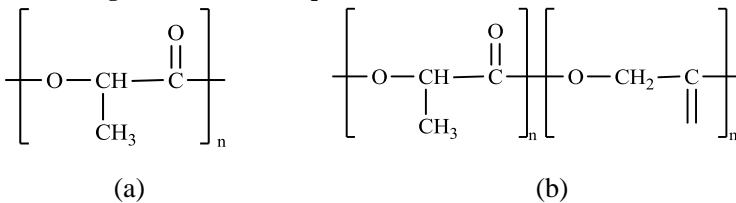
via inalação oral. Mecanismos para diminuir o processo de fagocitose das micropartículas foram avaliados e o recobrimento da superfície externa das partículas com poli(etileno glicol) (PEG) é um exemplo bem sucedido (EVORA et al., 1998). Foi demonstrado que células fagocíticas apresentam menor habilidade de internalizar partículas estericamente estabilizadas com cadeias de PEG, comparada com aquelas estabilizadas com cargas iônicas.

Todavia, o processo de fagocitose das micropartículas é desejado para garantir a eficácia do tratamento para tuberculose. Neste caso, a preparação das micropartículas não se limita a materiais hidrossolúveis e a modificação da superfície externa não é necessária.

2.3 MICROPARTÍCULAS BIODEGRADÁVEIS E MONODISPERSAS

Poli(ácido lático) (PLLA) e poli(D,L-ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), Figura 2.1, são os polímeros sintéticos mais utilizados com amplas aplicações na área biomédica. Seu potencial para aplicação como sistema de liberação controlada e encapsulação de compostos ativos se deve principalmente a sua biodegradabilidade e biocompatibilidade (VERT et al., 1992; GARLOTTA, 2001). A degradação destes polímeros ocorre de forma aleatória principalmente pela quebra de cadeia entre as ligações ésteres por hidrólise (TOMODA & MAKINO, 2007) e não necessariamente na presença de enzimas (GARLOTTA, 2001).

Figura 2.1 Estrutura química de (a) PLLA e (b) PLGA.



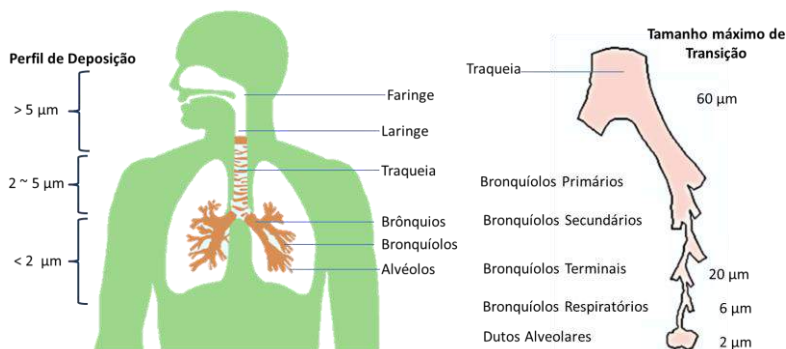
Para tratamentos específicos de doenças com fármacos de alto valor agregado e/ou muito agressivos para as células saudáveis, uma vetorização adequada do composto ativo é necessária, e.g. garantir que o sistema de carreador libere o fármaco no local predeterminado. Deposição, acúmulo e absorção das partículas no corpo humano dependem primeiramente do tamanho médio das partículas. Para vetorização e libe-

ração de fármacos anticânceres, por exemplo, em partículas com perfil de distribuição estreito, observou-se a diminuição dos efeitos colaterais dos agentes ativos, devido a redução do acúmulo indesejado (MA; NAGAI & OMI, 1999). A liberação de fármacos em locais específicos do sistema respiratório depende das características aerodinâmicas das partículas, conseqüentemente do local de deposição (KLEINSTREUER; ZHANG & DONOHUE, 2008). A Figura 2.2 apresenta a distribuição das partículas no sistema respiratório. Além de partículas monodispersas maximizarem a vetorização do fármaco para o local específico, elas também apresentam um único comportamento de liberação de fármacos. Partículas polidispersas apresentam diversas áreas superficiais entre elas e podem apresentar diferentes velocidades de liberação de fármaco dependendo do seu tamanho (ITO & MAKINO, 2004).

2.3.1 Emulsificação por Membrana Shirasu Porosa de Fibra de Vidro

Usualmente, micropartículas de PLLA e PLGA são obtidas utilizando uma técnica de emulsificação seguida da técnica de evaporação de solvente (PARK, 1995; MA; NAGAI & OMI, 1999; LAI et al., 2006; TOMODA & MAKINO, 2007). Para a obtenção de micropartículas com perfil de distribuição estreita, a técnica de emulsificação através de membrana microporosa é amplamente explorada e estabelecida na literatura, sendo a membrana Shirasu porosa de fibra de vidro (SPG) a mais relatada e utilizada na literatura (BAO et al., 2007).

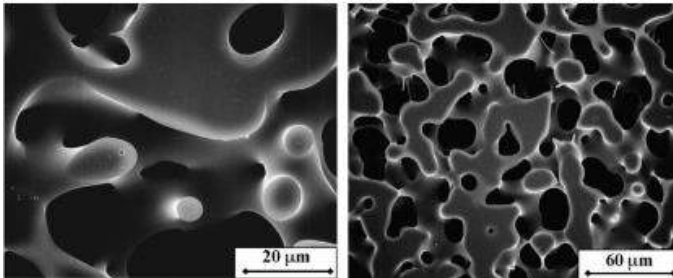
Figura 2.2 Distribuição das partículas no sistema respiratório.



Fonte: adaptado de Tomoda e Makino (2007)

Membrana SPG é produzida a partir de um sistema vítreo $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{MgO}-\text{Al}_2\text{O}_3-\text{B}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ utilizando processo de decomposição espinodal (NAKASHIMA & SHIMIZU, 1986, apud VLADISAVLJEVIĆ; KOBAYASHI & NAKAJIMA, 2012). O sistema vítreo é preparado a partir de carbonato de cálcio, ácido bórico e Shirasu (KUKIZAKI & NAKASHIMA, 2004). Denomina-se de Shirasu, cinzas vulcânicas japonesa, a qual contém 77 % em massa de SiO_2 e 10–15 % de Al_2O_3 e pequenas quantidades de outros óxidos inorgânicos (VLADISAVLJEVIĆ; KOBAYASHI & NAKAJIMA, 2012). Depois que o sistema vítreo é misturado, fundido a 1350 °C e moldado em formato de tubos, este é submetido a um tratamento térmico de resfriamento entre 650 e 750 °C por um período que varia de algumas horas a algumas dezenas de horas. O tratamento térmico causa a separação entre o ácido solúvel $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{MgO}-\text{B}_2\text{O}_3$ e o ácido insolúvel $\text{Al}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$. Este sistema heterogêneo é então imerso em uma solução de ácido hidrocloreto, a qual dissolve o $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{MgO}-\text{B}_2\text{O}_3$, formando uma membrana porosa de $\text{Al}_2\text{O}_3-\text{SiO}_2$ com porosidade de 50 – 60 %. A estrutura porosa de uma membrana SPG foi observada por microscopia eletrônica de varredura (SEM) por Vladislavljević et al. (2007) e está apresentada na Figura 2.3.

Figura 2.3 Imagem obtida por SEM da superfície polida da membrana SPG com tamanho de poro médio 15 μm .



Fonte: adaptado de Vladislavljević et al. (2007).

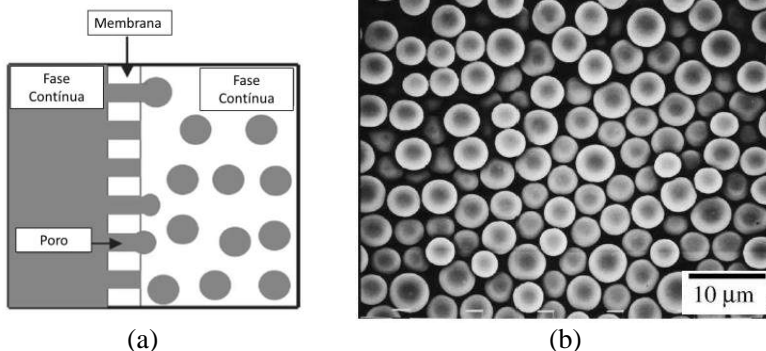
A membrana SPG se encontra comercialmente disponível em tamanhos de poro que variam de 50 nm a 20 μm , e são amplamente utilizadas nos processos de emulsificação de óleo em água e dispersão de gases (KUKIZAKI, 2009).

O processo de emulsificação por membrana se baseia na adição de uma fase dispersa em uma fase contínua pressionando-a contra uma membrana (VLADISAVLJEVIĆ; KOBAYASHI & NAKAJIMA,

2012). Pequenas gotas são formadas na interface entre a membrana e a fase contínua (VLADISAVLJEVIĆ; SHIMIZU & NAKASHIMA, 2006), como apresenta o esquema ilustrativo da Figura 2.4a. Durante o processo de formação da gota, o surfatante livre na fase contínua é absorvido na nova interface hidrofílica-hidrofóbica formada, reduzindo a tensão interfacial e, conseqüentemente, facilitando a formação da gota (OH et al., 2011). Para garantir uma dessorção homogênea das gotas da face externa do poro da membrana, uma força de cisalhamento é necessária na interface entre membrana e fase contínua, promovida a partir de agitação magnética ou recirculação da fase contínua (VLADISAVLJEVIĆ; SHIMIZU & NAKASHIMA, 2006).

As gotas formadas são estabilizadas com um surfatante solúvel na fase contínua. A escolha do surfatante é de fundamental importância na obtenção de micropartículas monodispersas, sendo que surfatantes catiônicos devem ser evitados ao se utilizar membranas hidrofílicas. Os grupos funcionais hidrofílicos do surfatante utilizado não deve apresentar carga oposta à da membrana, que apresenta potencial zeta negativo em pH entre 2 e 8, devido a dissociação de grupo silanol em sua superfície (OH et al., 2011).

Figura 2.4 (a) Esquema ilustrativo do princípio da emulsificação por membrana SPG e (b) imagens obtidas por SEM de micropartículas de PLGA.



Fonte: adaptado de Ito e Makino (2004).

As características da membrana utilizada variam de acordo com a emulsão formada. Para emulsões diretas com fase contínua aquosa, a membrana deve ser igualmente hidrofílica (VLADISAVLJEVIĆ; KOBAYASHI & NAKAJIMA, 2012). Para emulsão de água em óleo, membranas hidrofóbicas são necessárias. Por exemplo, a água que compõe a fase contínua encharca a membrana hidrofílica, garantindo que a fase

dispersa oleosa ultrapasse a membrana apenas pelos poros de tamanho específico. A força motriz que promove a adição da fase dispersa à fase contínua é pressão fornecida por um gás inerte à fase dispersa, usualmente nitrogênio.

A partir de microscopia eletrônica de varredura (SEM), Ito e Makino (2004) comprovaram a obtenção de micropartículas monodispersas de PLGA a partir de emulsificação com membrana SPG. A Figura 2.4b apresenta o resultado obtido pelos autores.

2.4 PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

A síntese de nanocápsulas pode ou não envolver uma etapa onde o núcleo é sacrificado, ou seja, a casca polimérica da nanocápsula é originada a partir de núcleo mineral ou de sílica orgânica, onde a polimerização ocorre sobre a superfície deste núcleo. Após esta etapa, a remoção do núcleo pode ser realizada a partir de procedimentos físicos ou químicos, como por exemplo, processos de calcinação ou dissolução, resultando em nanocápsulas ocas. Dessa forma, procedimentos que não envolvem o sacrifício do núcleo apresentam mais benefícios, uma vez que, além de sintetizar a nanocápsula com menos etapas, resultam no encapsulamento de um material, o qual se encontra no interior da nanopartículas desde o início do processo de formação da nanocápsula.

Dentre os diferentes processos de encapsulação de materiais, a polimerização via miniemulsão é o que mais se destaca, devido à possibilidade de obtenção de nanocápsulas em apenas uma etapa. Adicionalmente, dependendo da escolha do monômero e do tipo de reações químicas envolvidas no processo, permitem a obtenção de nanocápsulas com núcleo hidrofóbico ou hidrofílico, dependendo da hidrofobicidade do monômero escolhido.

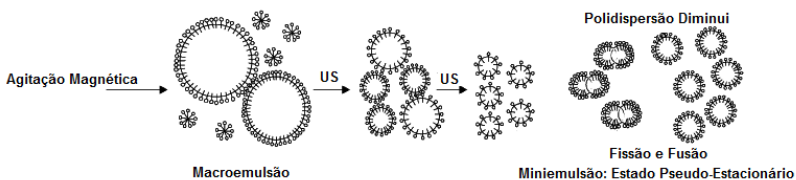
2.4.1 Polimerização em Miniemulsão Inversa

Diversos trabalhos disponíveis na literatura vêm mostrando que as características da polimerização em miniemulsão apresentam vantagens em relação às outras técnicas, tais como suspensão e emulsão, quando utilizada como um método de encapsulação (FONTENOTT & SCHORK, 1993; TIARKS; LANDFESTER & ANTONIETTI, 2001; ANTONIETTI & LANDFESTER, 2002; PARK & KIM, 2005). Tal idealização se deve, principalmente, ao fato de a miniemulsão gerar duas fases imiscíveis, uma delas formada por pequenas gotas estáveis de monômero, as quais são nucleadas e sofrem a polimerização, resultando no

látex final. Classicamente, miniemulsões são definidas como dispersões aquosas de gotículas de óleo relativamente estáveis, dentro de uma faixa de tamanho de 50 - 500 nm, preparadas por um sistema contendo óleo, água, um surfatante e um co-estabilizador (LANDFESTER et al., 1999). Portanto, na primeira etapa do processo de polimerização em miniemulsão, gotas submicrométricas são formadas pela dispersão de uma fase dispersa em uma fase contínua, a qual contém o surfatante. (LANDFESTER, 2006). Para fazer esta dispersão é necessário aplicar um mecanismo de alto cisalhamento para alcançar um equilíbrio entre a taxa de rompimento e coalescência.

Uma vez alcançado um estado de pseudo-equilíbrio, o qual é caracterizado pela taxa de fissão e fusão, como apresentado pela Figura 2.5, após a etapa de sonicação. Devido ao pequeno diâmetro médio das gotas, logo grande área superficial total, a maior parte do surfatante presente se encontra adsorvido na superfície das nanogotas, não havendo surfatante em excesso para a formação de micelas. Dessa forma, a polimerização pode ocorrer predominantemente nas nanogotas monoméricas aquosas, independente do tipo de reação, porém dependendo da estabilidade das gotas. A estabilidade das nanogotas depende principalmente do processo de homogeneização e das atuações do co-estabilizador e surfatante. A partir de um processo de homogeneização eficiente, obtém-se uma distribuição de nanogotas estreita, evitando-se dessa forma a presença de nanogotas de monômero maiores, conseqüentemente, a degradação difusional (HUANG et al., 1997).

Figura 2.5 Apresentação da dinâmica de formação de uma miniemulsão até atingir o estado estacionário obtida pela aplicação de ultrassom (US)



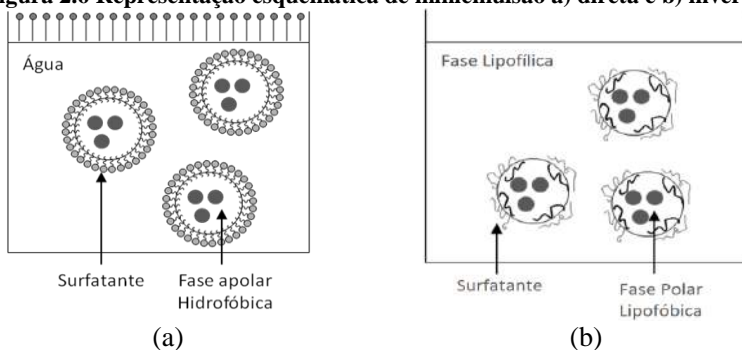
Fonte: adaptado de Antonietti e Landfester (2002).

Dependendo da polaridade do meio contínuo e da fase dispersa, miniemulsões direta ou inversa podem ser obtidas. Dessa forma, as formulações são drasticamente diferentes para ambos os processos, contudo o conceito de estabilidade se aplica da miniemulsão direta a inversa. A Figura 2.6 apresenta uma comparação entre a miniemulsão direta e

inversa, onde se observa que uma miniemulsão inversa apresenta nanogotas aquosas dispersas em uma fase contínua orgânica.

Particularmente, nanocápsulas poliméricas estáveis contendo um núcleo aquoso são de extrema importância para a proteção, estocagem e liberação de compostos hidrofílicos. Com o objetivo de se produzir nanocápsulas com núcleo hidrofílico, a técnica de miniemulsão inversa pode ser aplicada, a qual é gerada a partir da sonicação de uma fase polar, contendo monômero hidrofílico, água e co-estabilizador em uma fase apolar contínua composta de solvente orgânico e surfatante (CAPEK, 2010).

Figura 2.6 Representação esquemática de miniemulsão a) direta e b) inversa.



Todavia, o problema essencial na preparação de miniemulsões inversas é a estabilidade antes e durante a polimerização das nanogotas monoméricas. Tal dificuldade maior encontrada em emulsões inversas quando comparada a diretas se deve ao fato de o surfatante organo-solúvel se encontrar menos agregado na superfície da partícula e o monômero se encontrar dissolvido na fase aquosa.

Os surfatantes usualmente utilizados em miniemulsões inversas são essencialmente hidrofóbicos e apresentam valores de HLB em torno de 4 e 6. Os valores HLB, o qual envolve a proporção entre a parte hidrofílica e lipofílica de um surfatante, foram propostos por Griffin (1949, apud PASQUALI; TAUROZZI & BREGNI, 2008) para obter uma estimativa quantitativa da eficiência emulsificante. Estes valores são atribuídos em uma escala unidimensional, onde o HLB de um surfatante aumenta proporcionalmente ao aumento da polaridade da molécula, ou seja, ao aumento da solubilidade do surfatante no meio aquoso.

Com o objetivo de se aumentar a estabilidade da miniemulsão, um co-estabilizador é aplicado, sendo que na miniemulsão inversa, este

é um agente lipofóbico, o que além de retardar a degradação difusional monomérica das nanogotas, mantém o tamanho das pequenas gotas estáveis presentes e geradas na etapa de homogeneização do sistema. Em miniemulsões inversas, sais hidrofílicos são extensamente aplicados como agentes lipofóbicos para aumentar a estabilidade das gotas, sendo os sais de sódio os predominantemente utilizados (CAO et al., 2010). Devido à presença destes agentes lipofóbicos, ou ainda, agentes osmóticos, os quais não se difundem de uma gota para outra, a energia de Gibbs nas nanogotas é diminuída, dessa forma, diminuiu-se a força motriz que levaria a difusão do monômero para a fase contínua, prevenindo a degradação difusional (CAPEK, 2010).

2.4.2 Estabilidade das Nanogotas

A estabilidade de miniemulsões inversas é de extrema importância devido ao fato de influenciar na nucleação das gotas. Dessa forma, tanto a estabilidade no período entre a formação da miniemulsão e a polimerização, quanto durante o processo de polimerização, devem ser controladas e acompanhadas. A princípio, existem dois mecanismos que podem alterar o número e o tamanho das gotículas: a degradação difusional (Ostwald ripening) e a coalescência entre as gotas.

Com relação aos co-estabilizadores aplicados em miniemulsões inversas, Cao et al. (2010) investigaram o efeito de diferentes tipos de sais metálicos hidrofílicos, incluindo tetrafluoroboratos (BF_4^-) e nitratos (NO_3^-) ligados a diferentes cátions, tais como ferro, cobalto, zinco e cobre, sobre a estabilidade e diâmetro médio das nanogotas na polimerização em miniemulsão inversa do 2-hidroxietil metacrilato (HEMA).

Os autores observaram que tanto para os sais de nitratos quanto para os de tetrafluoroboratos, o diâmetro médio das nanogotas não foi influenciado pelo tipo de cátion que formava o sal, mas sim, pela concentração de sal aplicado e pelo tipo de ânion que continha o sal. Sendo que os autores observaram que para ambos os tipos de ânions, a dependência do tamanho das partículas e a distribuição do tamanho com a concentração do co-estabilizador aplicado, foi semelhante. O tamanho das gotas inicialmente aumentou com o acréscimo da concentração de co-estabilizador até um diâmetro máximo e, posterior, diminuiu para um valor constante. Os autores não justificaram tal fato.

Por outro lado, Cao et al. (2010) observaram que, para se obter um miniemulsão inversa estável é necessário uma concentração maior de sal de nitrato do que de sal de tetrafluoroborato. Os autores afirmam que tal fato se deve a maior habilidade de o ânion BF_4^- estabilizar a pres-

são osmótica dentro das nanogotas, devido a maior habilidade de dissociação do BF_4^- . Medidas de condutividade de eletrólito, para determinar o grau de dissociação, confirmam que, para uma mesma concentração molar e com um mesmo cátion, os sais de tetrafluoroborato apresentam maior capacidade de dissociação, enquanto que a interação entre o grupo NO_3^- e o cátion é mais forte (CAO et al., 2010).

Além de estabilizar a pressão osmótica no interior das nanogotas, os sais hidrofílicos em miniemulsões inversas também influenciam fortemente as propriedades interfaciais entre a fase contínua e a fase dispersa. Dessa forma, uma vez que haja tensões interfaciais no sistema entre polímero e água, ocorre a separação de fases e a formação de nanocápsulas.

2.4.3 Nucleação das Nanogotas

Apesar de a estabilidade ser a principal responsável pelo *locus* da polimerização ser as nanogotas, outros fatores propiciam mecanismos de nucleação não desejáveis. Assim como na polimerização em miniemulsão direta, na miniemulsão inversa almeja-se a nucleação das nanogotas. Para tanto, garante-se que a concentração de surfatante livre na fase contínua se encontre abaixo da concentração micelar crítica, CMC. A CMC é a concentração acima da qual o agente de superfície apresenta a primeira formação de micelas na solução. Exatamente nesta concentração, mudanças abruptas em diversas propriedades da solução são observadas, tais como tensão interfacial, turbidez e condutividade elétrica, caso o surfatante seja iônico. Sendo que para determinar a CMC, medidas de tensão interfacial são usualmente utilizadas, uma vez que a técnica e o procedimento operacional do tensiômetro são bastante simples e os resultados de fácil análise e confiáveis. Para as miniemulsões diretas, as medidas de tensão interfacial entre a água e o ar são utilizadas para estimar a CMC, enquanto que nas miniemulsões inversas, as tensões interfaciais entre a água e solvente orgânico determinam a percentagem de cobertura das gotas pelo surfatante e o ponto da CMC (CAPEK, 2010).

Uma vez que a concentração do surfatante livre na fase contínua se encontra abaixo da CMC, caso o iniciador aplicado seja solúvel na fase contínua, a fração de partículas formadas a partir de nucleação das gotas depende essencialmente dos valores das taxas de entrada dos radicais nas gotas e da velocidade de propagação na fase orgânica, para miniemulsão inversa, enquanto que a fração resultante sofre precipitação na fase orgânica, nucleação homogênea. (ASUA, 2002).

Cao, Ziener e Landfester (2010) investigaram a polimerização em miniemulsão inversa de N-isopropilacrilamida (NIPAM) aplicando-se diferentes tipos de iniciadores, hidrossolúvel e hidrofóbico e, diferentes concentrações do sal hidrofílico tetrafluoroborato de cobalto II hexahidratado ($\text{Co}(\text{BF}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ou ainda, CoTFB). A partir de análise do diâmetro por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM), os autores observaram que o tipo de iniciador altera a fração de nanopartículas formadas a partir de nucleação homogênea.

Devido a presença de um iniciador hidrofóbico na fase contínua, esta se torna o locus de iniciação, resultando em nanopartículas formadas a partir de nucleação homogênea. Asua (2002) estudou a polimerização via radicais livres em miniemulsão direta e concluiu que, quando iniciadores solúveis na fase contínua são usados, a nucleação de partículas envolve uma seqüência de processos paralelos. Primeiramente ocorre a formação do radical a partir da decomposição do iniciador que se encontra na fase contínua, os quais não são capazes de entrar nas gotas monoméricas ou ainda nas micelas. A polimerização dos radicais então ocorre na fase contínua a partir do monômero solúvel na fase contínua, resultando em oligômeros e, no decorrer do crescimento destes radicais, estes vão se tornando insolúveis na fase contínua. A partir do momento em que os oligômeros tornam-se suficientemente desconfortáveis na fase contínua, adquirem a capacidade de entrar nas gotas monoméricas, caracterizando a nucleação das gotas, ou ainda, entrar nas micelas, denominada nucleação micelar. Considerando a ausência de micelas, Coen et al. (2006) descreveram o comprimento crítico de radicais oligoméricos na fase contínua para diversos monômeros e, observou que caso o radical ultrapasse esse comprimento, o mesmo poderá entrar tanto em uma partícula pré-existente, como descrito por Asua (2002), quanto em uma gota submicrométrica. Caso este radical continue crescendo na fase contínua até atingir um segundo tamanho crítico, este precipitará, dando origem a novas partículas, caracterizando a nucleação homogênea.

Sabendo-se que a nucleação das gotas é almejada em polimerização a partir de miniemulsão, a nucleação homogênea pode ser suprimida aumentando-se a estabilidade das gotas, reduzindo a degradação difusional e a concentração de monômero na fase contínua, a partir do aumento da área interfacial total das nanogotas, favorecendo a entrada de radicais nas gotas e também, aplicando-se um iniciador solúvel na fase dispersa, reduzindo a geração de oligômeros na fase contínua.

2.4.4 Mecanismos de Polimerização

Devido a principal característica da polimerização em miniemulsão, tal como, mecanismo de nucleação, uma grande variedade de sistemas coloidais poliméricos pode ser obtida por diferentes tipos de polimerização. Na literatura, síntese de nanopartículas a partir de polimerização em miniemulsão via radicais livres é amplamente estudada. Tal fato se deve a facilidade e altas conversões atingidas a partir deste mecanismo. Em trabalhos anteriores, as polimerizações de metacrilato de metila e do acetato de vinila foram realizadas aplicando-se um iniciador organo-solúvel via miniemulsão direta (STEINMACHER et al., 2010). As etapas envolvidas na inicialização por radicais livres foram bem estabelecidas a partir de estudos em miniemulsão direta. E, apesar deste mecanismo de polimerização ser intensivamente aplicado para síntese de nanopartículas em miniemulsão, esta técnica se destaca pela possibilidade de diversos mecanismos de polimerização.

As polimerizações em etapa em miniemulsão mais comuns na literatura envolvem a síntese de poliuretanos (CRESPY & LANDFESTER, 2010; BAIER et al., 2010; CRESPY et al., 2007; ROSENBAUER; LANDFESTER & MUSYANOVYCH, 2009). Neste caso, a maioria das polimerizações ocorre na interface formada entre as nanogotas aquosa e o solvente orgânico, a partir de um monômero hidrofílico, o qual compõe a gota, e um monômero secundário solúvel no solvente orgânico. Segundo Crespy et al. (2007), devido a tendência de o monômero hidrofílico e o monômero secundário lipofílico formarem um polímero, a separação de fases ocorrerá e o polímero formado se encontrará na interface, responsável pela morfologia de nanocápsulas.

Dentro os monômeros secundários solúvel no solvente orgânico, tolueno 2,4-diisocianato (TDI) é mais aplicado, o qual apresenta alta reatividade com grupos hidroxilas e amins. Dessa forma, TDI foi aplicado na polimerização interfacial de 1,6-diaminohexano (ROSENBAUER; LANDFESTER & MUSYANOVYCH, 2009), amido (BAIER et al., 2010 e CRESPY et al., 2007), dietilenotriamina e dextrina (CRESPY et al., 2007). Uma vez que esta reação envolve monômero altamente reativo, a reação ocorre instantaneamente (WAGH; DHUMAL & SURESH, 2009), impossibilitando a determinação de sua cinética. Contudo, sabe-se que o polímero precipita na interface nas nanogotas, resultando em nanocápsulas. Diversos trabalhos comprovam a formação do polímero a partir de análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, o qual precipita na interface, caracte-

terizando a obtenção de morfologia de nanocápsulas, comprovada a partir de microscopia eletrônica de transmissão.

Segundo Morgen (1965, apud WAGH; DHUMAL & SURESH, 2009), o *locus* da polimerização interfacial ocorre na parte orgânica da interface formada, sem evidências de reação secundária com a fase aquosa. Dessa forma, a formação de uma casca polimérica a partir de polimerização interfacial é governada pela difusão do monômero hidrofílico para a fase orgânica a partir da interface (ZYDOWICZ; CHAUMONT & SOTO-PORTAS, 2001).

2.5 SÍNTESE DE NANOCÁPSULAS VIA POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO INVERSA

Diversos estudos envolvendo a morfologia final das nanopartículas obtidas em polimerização via radical livre em miniemulsão direta são encontrados na literatura (HERRERA et al., 2006; TIARKS; LANDFESTER & ANTONIETTI, 2001).

Cao; Ziener e Landfester (2010) foram os primeiros a analisar a síntese de nanopartículas com núcleo aquoso a partir de polimerização em miniemulsão inversa, baseados em análises de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). A análise foi de extrema importância para avaliação da morfologia das nanopartículas poliméricas de poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAM) obtidas. Nanopartículas compreendem tanto morfologia de nanoesferas, quanto de nanocápsulas, as quais se diferenciam entre si pela presença de um núcleo envolto por uma casca polimérica em nanocápsulas, enquanto que nanoesferas compreendem uma matriz polimérica. Os autores observaram que, a partir da polimerização da acrilamida, a morfologia final resultante é de nanoesferas. Tal fato se deve a hidrossolubilidade do polímero formado na fase dispersa. Segundo Tiarks; Landfester e Antonietti (2001), a imiscibilidade do polímero formado na fase dispersa é o principal fator responsável para a formação de nanocápsulas.

Neste sentido, Cao, Ziener e Landfester (2010) observaram que o aumento na concentração do co-estabilizador salino favoreceu a formação de nanocápsulas no sistema devido ao aumento da tensão interfacial entre a fase contínua e a mistura polar. Dessa forma, as tensões interfaciais entre polímero - solvente orgânico e polímero - solução aquosa salina se tornam menores que a tensão interfacial entre solvente orgânico - solução aquosa salina. Por conseguinte, as moléculas poliméricas se difundem para a interface fase orgânica - solução aquosa salina com o objetivo de diminuir a energia livre de Gibbs do sistema. Nestas condi-

ções, observa-se a formação das interfaces polímero – solvente orgânico e polímero - solução aquosa e, finalmente, o polímero propaga-se continuamente na interface com solvente orgânico, resultando em uma nanocápsula com núcleo hidrofílico.

Por outro lado, Cao, Ziener e Landfester (2010) observaram que o teor de água na miniemulsão inversa também afetou a morfologia final das nanopartículas. Os autores observaram a partir de análise em microscopia eletrônica de transmissão que, ao se diminuir a concentração de água na miniemulsão inversa, nanoesferas de PNIPAM foram obtidas. Os resultados confirmaram a presença de, não apenas partículas pequenas, mas de nanopartículas sólidas sem a morfologia de nanocápsula, o que pode tanto indicar a formação de nanopartículas por nucleação homogênea, quanto a diminuição das tensões interfaciais. Dessa forma, diminuiu-se a força motriz para que os oligômeros e as cadeias poliméricas migrem para a interface fase orgânica - fase aquosa. Enquanto que com o aumento do teor de água, aumentou-se também a estabilidade das nanogotas e reduziu-se a formação de partículas pequenas provenientes de nucleação secundária (CAO; ZIENER & LANDFESTER, 2010).

Já para polimerização interfacial, a separação de fases não é um pré-requisito, sendo a síntese de nanocápsulas governada pela precipitação do polímero na interface das nanogotas. Uma vez que o monômero secundário, tal como o TDI, é preferencialmente solúvel na fase orgânica e altamente reativo com grupos amina e hidroxilas presentes no interior das nanogotas, assume-se que a reação ocorre rapidamente e há precipitação do polímero na interface, formando uma casca polimérica.

SÍNTESE DE NANOCÁPSULAS BIODEGRADÁVEIS CONTENDO NÚCLEO AQUOSO A PARTIR DE POLIMERIZAÇÃO EM MINIEMULSÃO INVERSA

3.1 INTRODUÇÃO

Miniemulsões são obtidas a partir da aplicação de uma força de cisalhamento em um sistema composto por uma fase contínua, uma fase dispersa, um surfatante (prevenindo coalescência entre as gotas) e um co-estabilizador (ou agente osmótico, para retardar a degradação difusional de gotas menores) (CAPEK, 2010), resultando em nanogotas estáveis com tamanho entre 50 – 500 nm (ASUA, 2002), permitindo diferentes mecanismos de polimerização no interior da gota (TIARKS; LANDFESTER & ANTONIETTI, 2001) e/ou na sua interface (BAIER et al., 2010, 2013). Os principais exemplos encontrados na literatura são de polimerização por via de radical livre (ROMIO et al., 2009), aniônica (LIMOZIN et al., 2003), enzimática, poliadição e policondensação (VALÉRIO; ARAÚJO & SAYER, 2013). Conseqüentemente, uma grande variedade de sistemas coloidais poliméricos pode ser obtida.

Em apenas uma única etapa, a polimerização em miniemulsão resulta em altas eficiências de encapsulação em nanopartículas e nanocápsulas contendo núcleo tanto oleoso (STEINMACHER et al., 2010) quanto sólido (STAUDT et al., 2013). Numerosos trabalhos foram realizados no Laboratório de Controle de Processos (LCP), no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da UFSC, objetivando-se a obtenção de nanopartículas poliméricas, a partir da técnica de polimerização em miniemulsão. Romio et al. (2009) e Steinmacher et al. (2010) obtiveram nanocápsulas poliméricas biocompatíveis de poli(metacrilato de metila) (PMMA) e poli(acetato de vinila) (PVA), aptas para aplicação na área biomédica. Bernardy et al. (2010) obtiveram altas eficiência de encapsulação de quercetina, um flavonoide com propriedade antitumoral, antioxidante e anti-inflamatória, em nanocápsulas de PMMA. Cardoso, Araújo e Sayer (2013) encapsularam óleos vegetais, tais como óleos de jojoba e de andiroba, em nanocápsulas de poliestireno, promissoras para o carregamento de compostos ativos hidrofóbicos. Valério, Araújo e Sayer (2013) prepararam nanopartículas de poli(uréia-uretano) contendo óleo de açaí. Leimann et al. (2013) exploraram a técnica de preparação de miniemulsão seguida de evaporação de solvente para a preparação de nanopartículas biodegradáveis de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato). Nanopartículas obtidas por miniemulsão também se apresentaram eficientes na encapsulação de materi-

ais sólidos. Nanopartículas orgânicas-inorgânicas foram preparadas a partir da encapsulação de nanopartículas de níquel em partículas de poli(acrilamida e poli(metacrilato de metila) (ROMIO et al., 2013; STAUDT et al, 2013).

A partir dos resultados encontrados na literatura e obtidos pelo grupo de pesquisa, observa-se o amplo leque de oportunidades na elaboração de sistemas particulados e a infinidade de compostos que podem ser encapsulados e que podem ser escolhidos de acordo com a aplicação desejada. Contudo, os diversos trabalhos acima mencionados investigaram a aplicação de nanopartículas principalmente como sistemas de liberação, prevalecendo no grupo, a encapsulação de compostos hidrofóbicos.

Aplicando-se a polimerização interfacial combinada à técnica de miniemulsão inversa, obtem-se partículas com morfologia casca-núcleo com núcleo composto de água, otimizando-se a encapsulação de compostos hidrofílicos (ROSENBAUER; LANDFESTER & MUSYANOVYCH, 2009). A polimerização interfacial ocorre entre um monômero solúvel na fase contínua orgânica, geralmente, tolueno diisocianato (TDI) e um monômero hidrossolúvel na fase dispersa contendo grupos amina ou hidroxilas, como por exemplo, 1,4-diaminobutano (DAB) (CRESPY et al., 2007) e 1,6-diaminohexano (HMDA) (ROSENBAUER; LANDFESTER & MUSYANOVYCH, 2009), e polímeros hidrofílicos, tais como amido, (BAIER et al., 2010), hidroxietil amido (HES) e ácido hialurônico (BAIER et al., 2013).

O mecanismo destas reações já está estabelecido na literatura. A reação entre os grupos amina e hidroxilas com o grupo isocianato do TDI ocorre rapidamente na interface entre a nanogota e a fase contínua. O polímero é formado simultaneamente a partir de reação de poliadição e precipita na camada interfacial das nanogotas (ROSENBAUER; LANDFESTER & MUSYANOVYCH, 2009). Este procedimento resulta em nanocápsulas com morfologia casca-núcleo (BAIER et al., 2010). Observou-se que a casca polimérica resultante das nanocápsulas consiste de grupos de urea e uretano (BAIER et al., 2010, 2013; CRESPY et al., 2007;) e a espessura da casca polimérica depende das quantidades de monômero (CRESPY et al., 2007) e TDI (BAIER et al., 2010).

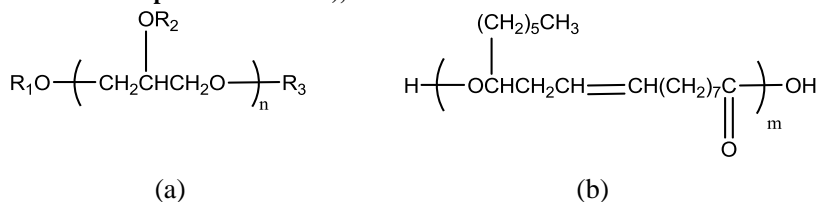
Nesta etapa do trabalho, objetivou-se a síntese de nanopartículas de amido reticulado a partir de polimerização interfacial em miniemulsão inversa, elucidando os procedimentos para preparação de miniemulsões inversas estáveis e morfologia final das nanopartículas. Para tanto, um série de procedimentos e formulações foram avaliadas e a polimerização foi realizada a diferentes temperaturas.

3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Materiais

Para realizar as polymerizações interfaciais em miniemulsão inversa, amido de batata solúvel e 2,4- tolueno diisocianato (TDI) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Polirricinoleato de poliglicerol (PGPR, Dhymers) foi aplicado como surfatante na obtenção de miniemulsões. O surfatante escolhido é amplamente aplicado na indústria alimentícia, principalmente na indústria de chocolates como substituto da lecitina de soja, possui caráter hidrofóbico e oligomérico (WILSON et al., 1998). A Figura 3.1 apresenta a estrutura molecular do surfatante.

Figura 3.1 a) Estrutura molecular geral do polirricinoleato de poliglicerol (PGPR) com n=3, e R1, R2 e R3 podem ser hidrogênios ou polímero linear apresentados em b), onde m assume valor entre 5 e 8.



Lauril sulfato de sódio (SLS, Vetec) foi aplicado como surfatante de caráter hidrofílico na etapa de redispersão das nanopartículas para uma solução aquosa. Cloreto de sódio (NaCl, Vetec) e sulfato de cobre II pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Cromoline) foram utilizados como agentes osmóticos. A fase contínua da miniemulsão inversa foi composta principalmente por ciclohexano (Vetec), enquanto a fase dispersa, água destilada. Todos os reagentes foram utilizados sem nenhum procedimento de purificação.

3.2.2 Procedimentos Experimentais

As nanopartículas de amido reticulado foram sintetizadas a partir de polymerização por etapa, a qual ocorre na interface das nanogotas aquosas formada a partir da técnica de miniemulsão inversa, de acordo com o procedimento proposto por Crespy et al. (2007) e Baier et al. (2010), exceto pelo fato de que neste trabalho, a fase dispersa foi preparada gelatinizando o amido por 30 min a 90 °C em uma mistura de água e sal, como cloreto de sódio ou sulfato de cobre. Estudo sobre a gelatini-

zação do amido em água e efeito do tempo de sonicação sobre o diâmetro médio e distribuição de tamanho das nanogotas se encontram em Informações de Suporte, no final deste capítulo.

Os procedimentos de caracterização do grânulo de amido estão descritos em Informações de Suporte. A fase orgânica, composta por ciclohexano (7,5 g) e PGPR, foi formada a partir da solubilização do surfatante no solvente orgânico por 20 minutos sob agitação magnética e temperatura ambiente. Posterior a esta etapa, a fase orgânica foi adicionada à fase dispersa, também denominada fase aquosa, com auxílio de agitação magnética a 500 rpm (IKA Werke ETS-D5) por 1 hora a temperatura ambiente.

As nanogotas aquosas contendo o amido solúvel de tamanho entre de 50 e 500 nm foram formadas por uma elevada força de cisalhamento do tipo sonicador de ultrassom acoplado a uma ponteira (Fisher-Scientific – Ultrasonic Dismembrator 500) por 3 minutos com amplitude de 70 % em um regime de pulso (20 segundos de sonicação e 10 segundos de pausa). Uma vez obtida as nanogotas aquosas estáveis, 2,4-tolueno diisocianato (TDI), previamente dissolvido em ciclohexano (5 g) e PGPR (30 mg) por 20 minutos em agitação magnética, foi gotejado a miniemulsão durante aproximadamente 1 minuto. A polimerização interfacial ocorreu a 60 °C por 2 horas com agitação magnética de 500 rpm em um frasco de vidro de 40 ml com tampa de rosca, como apresenta na Figura 3.2. Quando utilizados temperatura e tempo de reação diferentes será mencionado no texto.

3.2.2.1 ESTABILIDADE DAS MINIEMULSÕES INVERSAS

O efeito da concentração de amido gelatinizado, de sais e de surfatante PGPR sobre a estabilidade das gotas foi avaliado. As miniemulsões inversas foram formadas aplicando-se 3 minutos de ultrassom com 70 % de amplitude. Para avaliar a estabilidade das miniemulsões nestas condições, diferentes concentrações de surfatante entre 5 e 20 % em massa com relação a fase aquosa e, duas quantidades de amido iguais a 0,1 g e 0,2 g foram utilizadas. Para tanto, a quantidade de fase contínua (7,5 g de ciclohexano) e cloreto de sódio (50 mg) foram mantidas constantes, de acordo com as formulações apresentadas na Tabela 3.1.

Após a etapa de ultrassonicação, a miniemulsão inversa foi mantida a temperatura constante de 60 °C sob agitação magnética de 500 rpm sem ocorrer a reação. Dessa forma, TDI não foi adicionado a miniemulsão. A estabilidade das nanogotas foi avaliada de acordo com a

evolução do tamanho médio das nanogotas ao longo de 3 horas por análise em espalhamento dinâmico de luz.

Figura 3.2 Esquema do processo de polimerização interfacial em miniemulsão inversa.

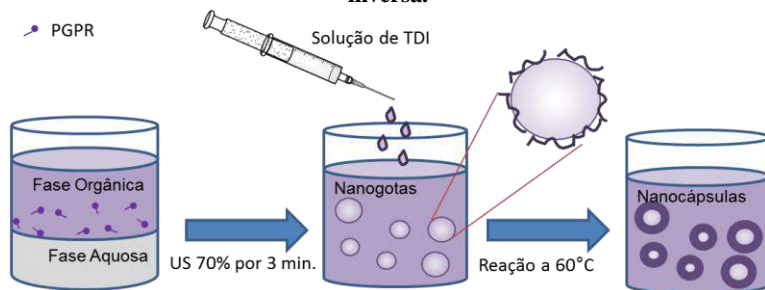


Tabela 3.1 Formulação das miniemulsões inversa de amido gelatinizado para avaliação da estabilidade a 60 °C.

		Referência	PGPR (mg)	PGPR (%) ^a
Amido (g)	0,1	ES_0	75	5
Água (g)	1,3	ES_1	149	10
		ES_2	215	15
		ES_3	286	20
Amido (g)	0,2	EAm_1	149	10
Água (g)	1,2	EAm_2	215	15
		EAm_3	286	20

a) % mássica com relação à fase aquosa

3.2.2.2 REDISPERSÃO DAS NANOCÁPSULAS SINTETIZADAS EM ÁGUA

Com a finalidade de tornar as nanocápsulas viáveis para aplicação na área biomédica, o solvente orgânico foi evaporado a partir da substituição da fase orgânica por uma fase aquosa, segundo o procedimento: 1,0 g de nanocápsulas dispersas em ciclohexano foram adicionados por agitação magnética por 10 minutos em 6 g de uma solução aquosa contendo 15 mg de SLS (lauril sulfato de sódio), seguida de uma etapa de sonicação por 1 minuto com uma amplitude de 70 % em um

regime de pulso (20 segundos sonicando, 10 segundos de pausa). Segue-se com a evaporação do solvente por 3 horas a 60 °C sob agitação magnética de 500 rpm.

3.2.3 Caracterização

3.2.3.1 TAMANHO MÉDIO

O tamanho médio das nanocápsulas de amido foi determinado por espalhamento dinâmico de luz (DSL), utilizando o equipamento Zetasizer, Nano Series – Malvern Instruments, o qual se baseia na taxa de difusão das partículas através do fluido para mensurar o diâmetro médio das partículas. Para realizar esta análise, 0,25 ml das amostras retiradas foram diluídas em 2,5 ml de ciclohexano quando dispersas em solvente orgânico. Quando as nanopartículas se encontram já transferidas para a fase aquosa, 0,25 ml da amostra são diluídos em 2,5 ml de água destilada.

3.2.3.2 COMPOSIÇÃO DA CASCA POLIMÉRICA

Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) foi utilizada para determinar a composição da casca polimérica e avaliar a reação entre o TDI e grupos de hidroxilas durante a polimerização em miniemulsão inversa. A amostra, previamente liofilizada durante 24 horas a -60 °C sob pressão reduzida, foi pressionada com KBr para formar uma pastilha. Espectros entre 4000 e 400 cm^{-1} foram obtidos usando um espectrômetro Bruker IFS 113V alocado no Instituto Max Planck para Pesquisa em Polímeros (MPIP, Mainz – Alemanha).

Quando mencionado a utilização do módulo de refletância total atenuada (ATR), um filme foi obtido a partir de secagem da amostra em uma estufa de convecção forçada a 60 °C. As análises foram conduzidas em espectrômetro Tensor 27 da Bruker alocado no Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis – Brasil). Para a análise foi utilizada uma resolução de 4 cm^{-1} , com 16 varreduras entre a faixa de 4000 a 600 cm^{-1} .

3.2.3.3 MORFOLOGIA DAS PARTÍCULAS

A morfologia das nanocápsulas de amido foi investigada a partir de análises em um microscópio eletrônico de transmissão (TEM - JEOL

JEM 1011) alocado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina e a partir de microscopia eletrônica de varredura (SEM) utilizando um microscópio de emissão de campo (LEO (Zeiss) 1530 Gemini, Oberkochen, Alemanha) a uma voltagem de aceleração de 0,5 kV alocado no MPIP (Mainz, Alemanha).

Para as análises em TEM, 0,5 ml da amostra foi diluído em 5 ml de ciclohexano ou de água destilada, quando as nanopartículas já foram transferidas para fase aquosa. Após esta etapa, uma gota da amostra com volume igual a 5 μ l foi depositada sobre uma grade (grid) de 300 mesh de cobre recoberta com filme de carbono e, seca a temperatura ambiente por um dia. Foram observadas por análise no mínimo 8 (oito) regiões diferentes da grade de forma a certificar que os resultados apresentados são representativos da amostra.

Para as análises em SEM, as amostras foram preparadas diluindo-se as nanocápsulas em ciclohexano e uma gota de amostra foi colocada em placas de sílica e secas sob condições normais de ambientes.

3.2.4 Procedimento Estatístico

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e quando necessário o teste de Tukey para comparação de médias e verificação de diferenças significativas foi aplicado com auxílio de Kaleida Graph v. 4 (Synergy Software, 2005), com nível de confiança em 95 %. Todas os ensaios foram realizados em triplicata.

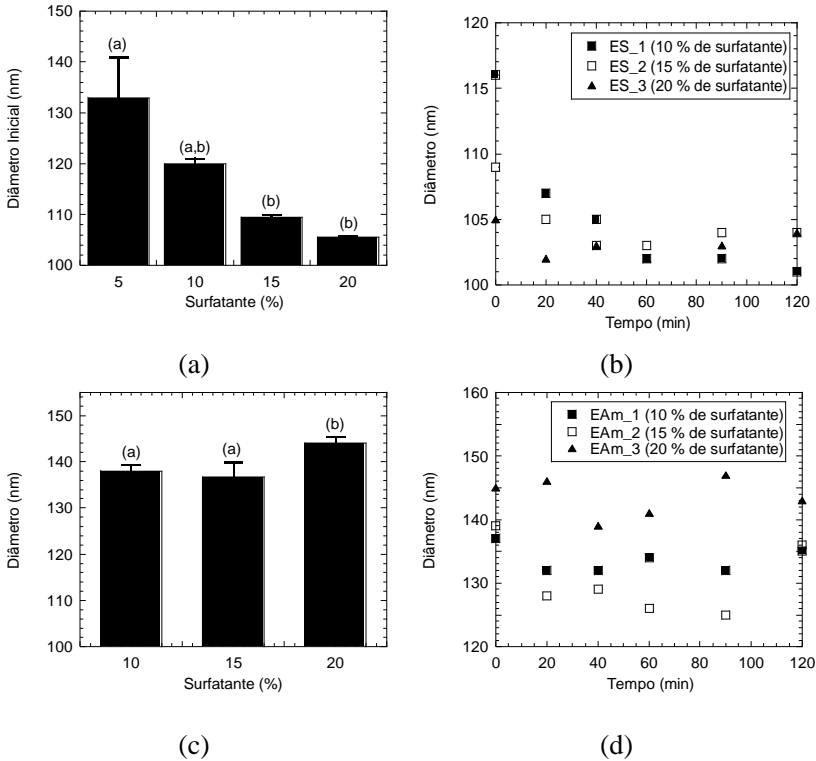
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estabilidade das nanogotas foram avaliadas aplicando cloreto de sódio (NaCl) como co-estabilizador e polirricinoleato de poliglicerol (PGPR) como surfatante, em miniemulsão com fase contínua ciclohexano e fase dispersa composta por amido gelatinizado. Uma vez que a estabilidade do sistema é diretamente afetada pela temperatura (BOHÓRQUEZ & ASUA, 2008), as estabilidades foram avaliadas na temperatura de reação, 60 °C, durante o período equivalente ao de reação, igual a 2 horas.

A Figura 3.3 apresenta os resultados obtidos para diâmetro inicial ('a' e 'c', para as miniemulsões com 0,1 e 0,2 g de amido, respectivamente) e evolução do diâmetro médio ao longo do tempo das nanogotas ('b' e 'd', para as miniemulsões com 0,1 e 0,2 g de amido, respectivamente). Observa-se que o diâmetro médio inicial das nanogotas depende

da concentração de surfatante e quantidade de amido presentes na formulação (Figura 3.3a).

Figura 3.3 Diâmetro médio das nanogotas em função da concentração de surfatante (a) 0,1 g e (c) 0,2 g de amido. Análise feita em triplicata para cálculo do desvio padrão. Evolução do diâmetro médio das nanogotas ao longo de tempo de reação a 60 °C (b) 0,1 g e (d) 0,2 g de amido. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com método de Tukey de comparações múltiplas ($p < 0,05$).



Nanogotas aquosas menores foram obtidas ao se aumentar a concentração de surfatante, quando 0,1 g de amido são aplicados, como apresenta a Figura 3.3a. A diminuição do tamanho de partículas foi pronunciada a baixas concentrações de surfatante e, em seguida, atinge um diâmetro mínimo, com concentração de surfatante em 15 % em massa com relação à fase aquosa, o qual não pode ser significativamente reduzido ($p = 0,89$) com o aumento da concentração de surfatante. Asua (2002) atribui este comportamento ao fato de que o diâmetro não pode

ser reduzido ao tamanho crítico proporcionado pela etapa de homogeneização. Dessa forma, o autor propõe que para diminuir o tamanho das partículas além do atingido é necessário aumentar a energia adicionada ao sistema. A partir disto, acredita-se que com 15 % em massa de surfatante (ES_2), o diâmetro crítico foi atingido.

Ao avaliar a evolução do diâmetro ao longo do tempo (Figura 3.3b), miniemulsão formada com 5 % de surfatante (ES_0) apresentou coalescência e os resultados não foram apresentados. Tal fato se deve a baixa concentração de surfatante, a qual não é suficiente para evitar a degradação da miniemulsão ao longo do tempo. Aumentando-se a concentração de PGPR, observou-se que o diâmetro médio ao longo do tempo apresentou uma queda significativa para as miniemulsões ES_1 e ES_2, e ao final de duas horas, as três miniemulsões resultaram em nanogotas de tamanho em torno de 104 nm.

Por outro lado, quando utilizado uma quantidade maior de amido (0,2 g), o aumento da concentração de surfatante de 10 % para 15 % não apresentou efeito significativo sobre o diâmetro inicial das nanogotas ($p < 0,05$), como pode ser observado na Figura 3.3c. Neste último caso, acredita-se que o diâmetro inicial maior pode ser atribuído a maior viscosidade da fase dispersa, a qual aumenta a resistência de fissura das nanogotas durante a etapa de ultrassonicação, proporcionando um tamanho crítico atingido maior. Dessa forma, é possível afirmar que o aumento da viscosidade resulta em um processo de homogeneização menos eficiente. Adicionalmente, acredita-se que o aumento da concentração de PGPR torna a fase contínua também mais viscosa, sendo a principal fonte de variação observada em EAm_3 e o aumento significativo do diâmetro médio inicial. Ao longo do tempo de avaliação da estabilidade, ambas as três miniemulsões resultaram em nanogotas de tamanhos similares ao inicial, como apresenta a Figura 3.3d, podendo-se afirmar que todas as formulações avaliadas são estáveis.

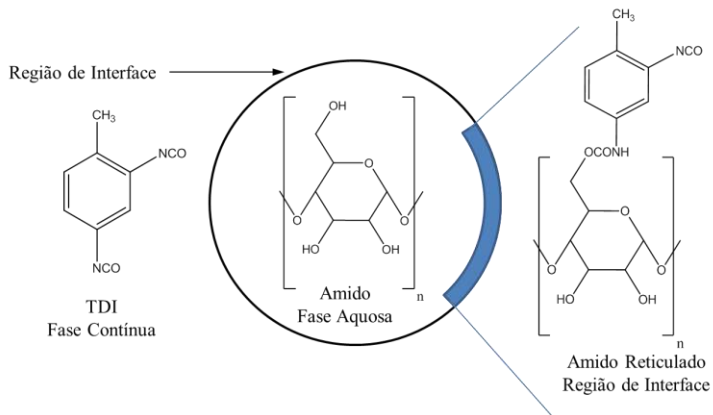
3.4 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE AMIDO RETICULADO

Nanopartículas de amido reticulado foram sintetizadas a partir de polimerização interfacial em etapas, a qual ocorre entre os grupos hidroxilas (OH) presentes no amido e surfatante e os grupos de isocianato (NCO) do reticulante, como apresenta a Figura 3.4.

Uma série de nanocápsulas de amido reticulado foi sintetizada aplicando-se diferentes concentrações de surfatante, reticulante e amido a partir de polimerização por etapas. Para avaliar o efeito da concentra-

ção e tipo de co-estabilizador, cloreto de sódio e sulfato de cobre foram os sais utilizados em diferentes concentrações. O efeito do tempo de adição da solução de TDI à miniemulsão está apresentado em Informações de Suporte.

Figura 3.4 Polimerização interfacial por etapas via miniemulsão inversa para síntese de nanopartículas de amido reticulado com TDI.



3.4.1 Efeito da Concentração de Surfatante

O efeito da concentração de surfatante sobre o diâmetro médio das nanopartículas foi avaliada para duas quantidades de amido, 0,1 e 0,2 g de amido, na fase dispersa composta por água e 50 mg de cloreto de sódio. A quantidade utilizada para a fase contínua da miniemulsão foi igual a 7,5 g de ciclohexano. As reações foram realizadas a partir da adição da solução de reticulante composta de 5,0 g de ciclohexano, 30 mg de PGPR e 120 mg de TDI. A concentração de surfatante variou entre 10 a 20 % em massa com relação à fase aquosa (Tabela 3.2).

Para confirmar a reação entre os grupos OH e NCO, assim como para avaliar a composição da casca polimérica formada, análises em espectroscopia de FT-IR foram realizadas. Como estabelecido na literatura, reações de isocianato e hidroxilas resultam na formação de ligações de poliuretano e poliuréia, dependendo da origem da hidroxila.

Tabela 3.2 Formulação das miniemulsão inversa do amido posteriormente polimerizadas com 120 mg de TDI.

		Referência	PGPR (mg)	PGPR (%) ^a
Amido (g)	0,1	S_1	149	10
Água (g)	1,3	S_2	215	15
		S_3	286	20
Amido (g)	0,2	Am_1	149	10
Água (g)	1,2	Am_2	215	15
		Am_3	286	20

a) % mássica com relação à fase aquosa.

Sabe-se que a banda característica do isocianato se encontra em 2235 cm^{-1} (ZANETTI-RAMOS et al., 2006), como apresenta a Figura 3.5, indicando consumo completo do isocianato ao longo da reação. Todas as amostras apresentaram uma forte banda de vibração em 3260 cm^{-1} , a qual pode ser tanto caracterizada pela vibração de N-H presente na poliuretano e poliuréia, as quais consistem no produto final, quanto de O-H presente no amido desde o início da reação (Figura 3.5a). Além destas, também foram observadas vibrações em 3016 cm^{-1} e 1601 cm^{-1} referente às ligações C-H e C=C presentes no anel aromático, respectivamente. De fato, estes picos característicos não indicam sucesso durante as reações de polimerização na obtenção de produtos finais.

Vibrações devidas os grupos C=O e N-H em 1720 cm^{-1} e em 1539 cm^{-1} , respectivamente, evidenciam a formação de poliuretano e, são detalhadas em Figura 3.5b. Paralelamente, vibrações em 1640 cm^{-1} foram devido à formação de um grupo carbonila presente na poliuréia, consequência de reação secundária do isocianato com água. Dessa forma, estes picos característicos confirmam a reticulação do amido com TDI e, a formação de ligações poliuretano e poliuréia.

A razão entre as áreas dos picos referentes ao poliuretano (1720 cm^{-1}) e a poliuréia (1640 cm^{-1}) indica se as condições do sistema favoreceram as ligações de poliuretano ou de poliuréia. A Figura 3.6 apresenta a razão entre as áreas relativas ao pico do poliuretano e poliuréia das nanopartículas sintetizadas com diferentes concentrações de surfatante.

Figura 3.5 Resultados obtidos em análise de espectroscopia de FT-IR em ATR (a) espectro geral e (b) espectro na faixa que evidencia a obtenção de nanopartículas de amido reticulado.

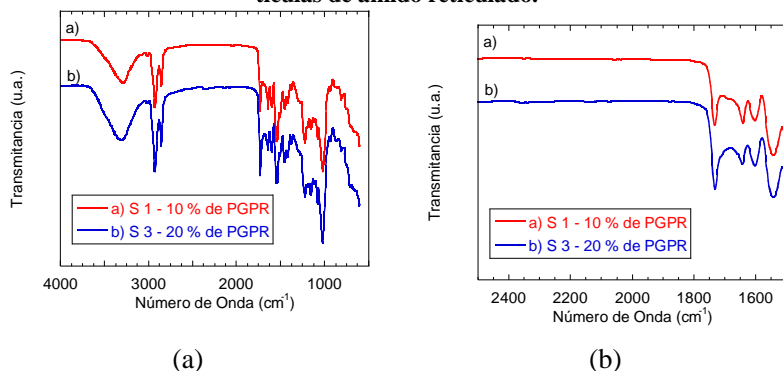
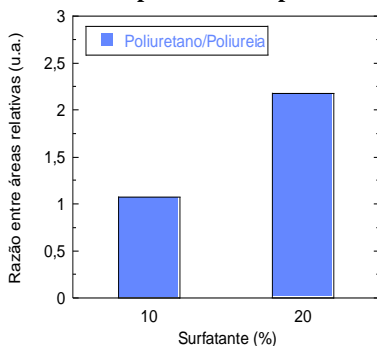


Figura 3.6 Composição da casca polimérica. Razão entre áreas dos picos característicos de poliuretano e poliureia.



Observa-se que a maior concentração de surfatante (S_3, 20 % em massa de PGPR) favorece a formação de poliuretano. Tal fato se deve ao menor diâmetro obtido das nanopartículas. Morgen (1965, apud WAGH et al., 2009) sugeriu que o locus da polimerização interfacial ocorre na parte orgânica da interface formada, sem evidências de reação secundária com a fase aquosa. Dessa forma, quanto menor o diâmetro das nanopartículas, maior a superfície interfacial entre a gota e solvente orgânico para a adsorção do monômero adsorvido na monocamada, favorecendo a formação de poliuretano.

Ao se transferir as nanopartículas para a solução aquosa e evaporação do solvente, a partir de resultados de análise de FT-IR (Figura 3.7) das nanopartículas S_1, observa-se que esta etapa não influencia a com-

posição da casca polimérica e nem a morfologia das nanopartículas. Imagens obtidas a partir de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) da amostra S_1 são apresentadas na Figura 3.8.

Figura 3.7 Resultados obtidos em análise de espectroscopia de FT-IR em ATR (a) espectro geral e (b) espectro na faixa que evidencia a obtenção de nanopartículas de amido reticulado segundo a formulação S 1.

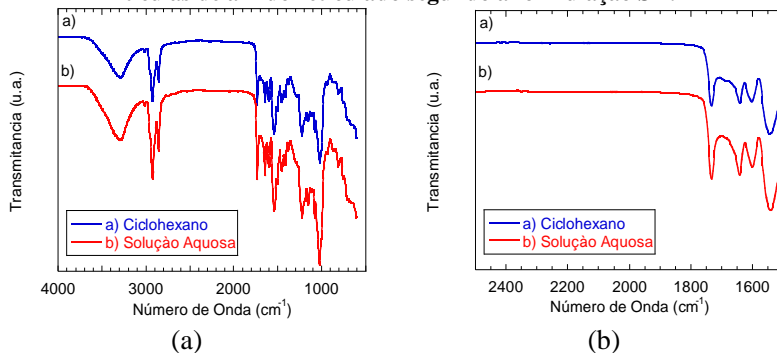
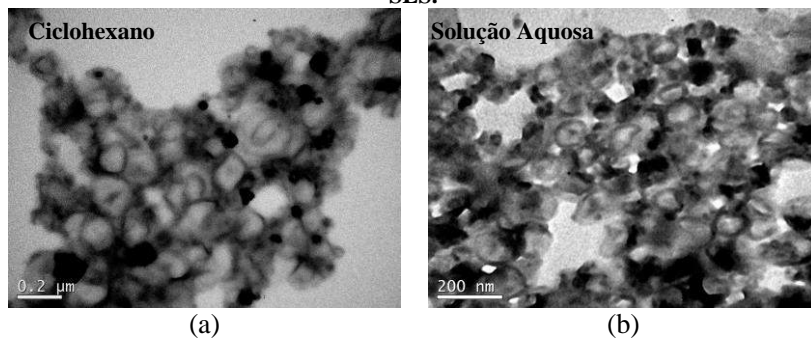


Figura 3.8 Micrografias obtidas por TEM das nanopartículas sintetizadas a partir da reação S_1 dispersas em (a) ciclohexano e (b) em solução aquosa de SLS.



Devido as características da polimerização interfacial, as nanopartículas obtidas apresentam estrutura de nanocápsulas. Tal afirmação é baseada em resultados de microscopia eletrônica de transmissão e como se pode observar, as nanopartículas apresentam em sua composição dois materiais de contraste distinto, sendo a casca polimérica caracterizada pela borda mais escura e o núcleo aquoso, pelo material cinza claro. Nanocápsulas foram observados tanto em amostras dispersas em ciclohexano (Figura 3.8a) quanto em solução aquosa (Figura 3.8b). Os pon-

tos pretos são resultado da cristalização do sal após o período de secagem durante a preparação e análise da amostra.

A Tabela 3.3 apresenta os resultados de diâmetro médio das nanopartículas dispersas em ciclohexano e em água e os seus respectivos índices de polidispersão obtidos a partir de DSL. Observa-se que ao se aumentar a concentração de surfatante, diminui-se o tamanho das nanopartículas dispersas em ciclohexano para 0,1 g de amido (S_1, S_2 e S_3).

Tabela 3.3 Características das nanopartículas de amido reticulado obtidos com diferentes concentrações de surfatante e 120 mg de TDL.

Ref	PGPR (%) [*]	Amido (g)	Diâmetro médio (nm) / (IPd) ^{**}			
			Ciclohexano		Solução aquosa ^{***}	
S_1	10	0,1	200 ± 1	(0,197)	197 ± 2	(0,184)
S_2	15		181 ± 3	(0,125)	194 ± 3	(0,175)
S_3	20		159 ± 2	(0,145)	230 ± 7	(0,221)
Am_1	10	0,2	272 ± 2	(0,194)	177 ± 1	(0,201)
Am_2	15		261 ± 1	(0,144)	179 ± 1	(0,225)
Am_3	20		368 ± 5	(0,215)	193 ± 1	(0,238)

* % mássica com relação a fase aquosa. ** Experimento realizado em triplicata. *** Nanocápsulas redispersas em solução aquosa contendo 0,25 % em massa de SLS em razão de 6:1 de amostra.

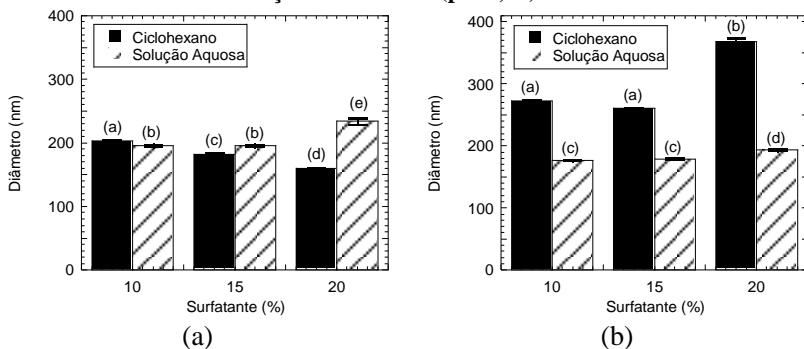
A concentração de surfatante aplicada para a síntese das nanopartículas também influenciou o diâmetro médio das nanopartículas quando redispersas em solução aquosa de SLS (Tabela 3.3). A Figura 3.9 a apresenta os diâmetros médio finais das partículas quando dispersas em ciclohexano e após a etapa de redispersão em água.

Observa-se que, aumentando-se a concentração de surfatante, aumenta-se também o diâmetro das nanopartículas redispersas em solução aquosa, com exceção da amostra S_1, a qual não apresentou variação significativa no diâmetro médio das nanopartículas dispersas em diferentes meios contínuos, partículas das amostras S_2 e S_3 apresentaram um aumento significativo de diâmetro após redispersão em água.

O aumento de tamanho das partículas das reações S_2 e S_3 se deve, possivelmente, ao intumescimento das nanopartículas durante a etapa de transferência para a solução aquosa e evaporação do ciclohexano. Devido a maior área interfacial total, decorrente do menor tamanho médio das nanogotas, uma casca polimérica mais fina pode ser formada e juntamente com a pressão osmótica consequente da concentração de

sal NaCl no interior da partícula, favorecem o intumescimento das nanopartículas, resultando em um aumento significativo de diâmetro após a transferência em solução aquosa.

Figura 3.9 Efeito da concentração do surfatante sobre as propriedades das nanopartículas sintetizadas com (a) 0,1 g e (b) 0,2 g de amido. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com método de Tukey de comparações das médias ($p < 0,05$).



Baier et al. (2010) também sintetizaram nanopartículas de amido reticulado aplicando-se TDI como agente reticulante e diferentes concentrações de surfatante, no entanto, os autores não observaram este intumescimento das nanopartículas. Por outro lado, a partir de análise em microscopia eletrônica de transmissão (TEM), os autores observaram que com maiores concentrações de surfatante, mais fina é a espessura da casca polimérica obtida. Tal efeito obtido pelos autores corrobora com os resultados obtidos nesta etapa deste trabalho.

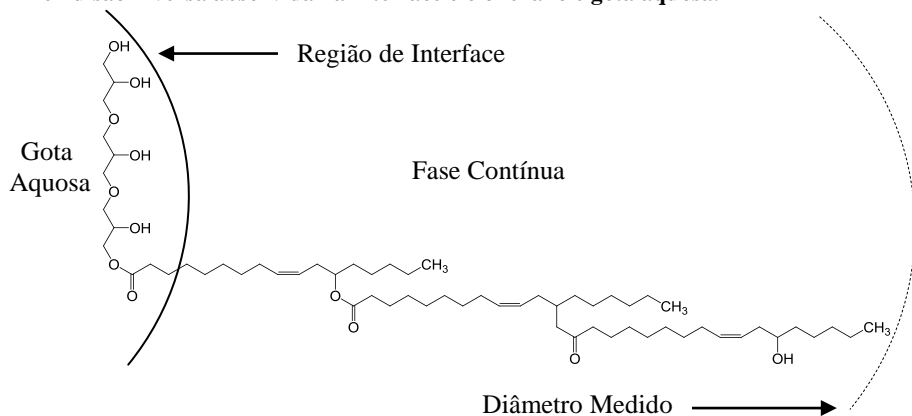
Este mesmo fenômeno de intumescimento, porém, não é observado quando utilizado uma quantidade de amido maior (0,2 g), devido a maior concentração de amido, a qual favorece a reticulação. Em Figura 3.9b observa-se que não há diferença significativa entre os diâmetros finais com diferentes concentrações de surfatante ($p < 0,05$), novamente indicando que a maior viscosidade da fase dispersa é o fator limitante para o diâmetro de partícula médio obtido para a amostra Am_3. Contudo, as nanopartículas sintetizadas com 0,2 g de amido após a etapa de redispersão em água apresentaram uma redução do tamanho (Figura 3.9b) de aproximadamente 100 nm. Tal fato pode ser explicado levando-se em consideração o caráter hidrofóbico predominante do PGPR.

As moléculas do surfatante estão projetadas livremente na fase contínua composta de ciclohexano, aumentando ilusoriamente o diâme-

tro médio dinâmico das partículas, como esquematizado na Figura 3.10. Contudo, ao se transferir as nanopartículas para um meio aquoso, acredita-se que as moléculas de PGPR se reorganizam para o mais próximo da superfície da nanopartículas, conseqüentemente, uma diminuição significativa do diâmetro médio é observada e o valor do diâmetro médio real foi obtido.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3.3, o tamanho médio das partículas foi em torno de 190 nm.

Figura 3.10 Esquema da orientação de duas moléculas de PGPR in uma mini-emulsão inversa absorvida na interface ciclohexano e gota aquosa.

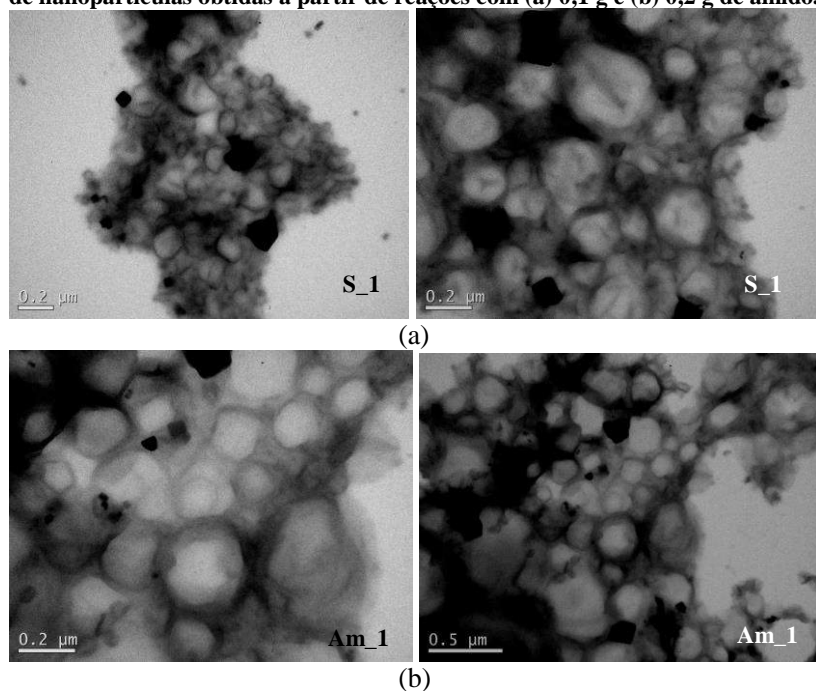


3.4.2 Efeito da Concentração de Amido

A Tabela 3.3 apresentou o efeito da concentração de amido sobre o diâmetro médio das nanopartículas. Para investigar o efeito da concentração de amido sobre a composição da casca polimérica e morfologia da partícula, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foram realizadas, respectivamente.

A Figura 3.11 apresenta um estudo comparativo entre as morfologias das partículas obtidas com 0,1 e 0,2g de amido, reações S_1 e Am_1 (Tabela 3.2)., respectivamente. A concentração de amido não apresentou influência sobre a morfologia obtida, sendo que ambas apresentaram morfologia de nanocápsulas contendo um núcleo aquoso e boa estabilidade.

Figura 3.11 Imagens obtidas a partir de microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas obtidas a partir de reações com (a) 0,1 g e (b) 0,2 g de amido.



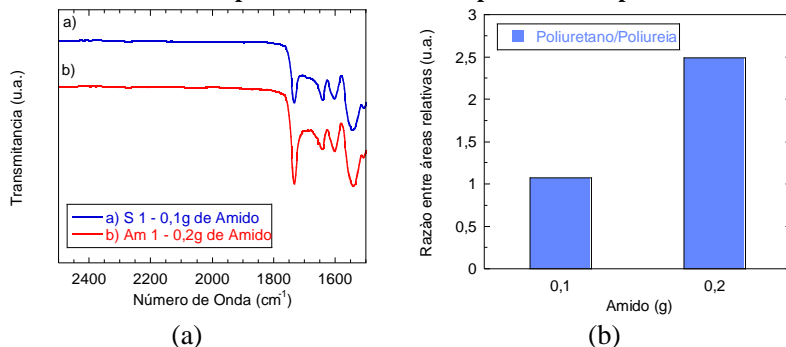
A partir da Figura 3.12 o efeito da concentração de amido sobre a composição da casca polimérica foi investigado. A Figura 3.12a apresenta os espectros em FT-IR na região de interesse, enquanto que a Figura 3.12b apresenta a razão entre as áreas relativas ao pico do poliuretano (1720 cm^{-1}) e poliuréia (1640 cm^{-1}). A razão entre as áreas dos picos referentes ao poliuretano e a poliuréia indica se as condições do sistema favoreceram a formação de poliuretano ou de poliuréia. Os resultados obtidos evidenciam, como esperado, que uma maior concentração de amido beneficia a formação de poliuretano e evita a reação secundária do TDI com água.

3.4.3 Efeito do Tipo e Concentração de Co-estabilizador

Na técnica de miniemulsões inversas, sais são extensivamente utilizados como co-estabilizadores, aumentando a estabilidade das nanogotas. Cloreto de sódio é o sal mais amplamente utilizado na polimerização em miniemulsão inversa. Contudo, sais formados a partir de cá-

tions de metais de transição, tais como Fe^{+2} , Ni^{+2} , Co^{+2} e Cu^{+2} apresentam diversas vantagens sobre os sais de sódio para posterior aplicação (CAO et al., 2010).

Figura 3.12 Resultados obtidos em análise em espectroscopia FT-IR em ATR (a) espectro na região de interesse e (b) composição da casca polimérica. Razão entre áreas dos picos característicos de poliuretano e poliureia.



Na série de síntese de nanopartículas a seguir, cloreto de sódio foi parcialmente substituído por sal de cobre, como apresenta a Tabela 3.4. O efeito do tipo de co-estabilizador foi avaliado variando-se a quantidade mássica de TDI entre 80 mg e 120 mg, mantendo-se a quantidade mássica de surfatante igual a 149 mg de PGPR. Adicionalmente, o efeito da concentração de NaCl foi investigado com duas concentrações iguais a 50 mg e 70 mg (C₁₁ e C₈).

Tabela 3.4 Formulação das miniemulsões inversa de amido obtidas com 7.5 g de ciclohexano e posteriormente polimerizadas a 60 °C por 2 horas.

Reagentes		Referência	NaCl (mg)	CuSO ₄ (mg)	TDI (mg)
Amido (g)	0,1	C ₁₁	70	-	80
Água (g)	1,3	C ₈	50	-	80
PGPR (mg)	149	S ₁	50	-	120
		C ₅	40	7	120
		C ₉	40	7	80

As quantidades de amido e surfatante foram mantidas constantes e iguais a 0,1 g e 149 mg, respectivamente, e as reações foram iniciadas a partir da adição da solução de reticulante composta de 5,0 g de ciclohexano, 30 mg de PGPR e TDI.

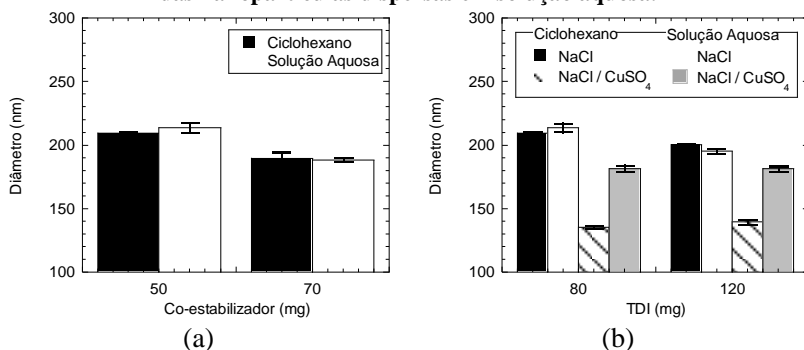
A Tabela 3.5 e a Figura 3.13 apresentam os resultados de tamanho de partículas. Nanopartículas com distribuição de tamanho monomodal foram obtidas com índices de polidispersão em sua maioria próximos de 0,2, os quais confirmam uma distribuição relativamente larga de tamanho de partículas.

Tabela 3.5 Características das nanopartículas de amido reticulado obtidos com diferentes tipos de co-estabilizador.

Ref.	TDI (mg)	Diâmetro médio (nm) / (IPd) [*]			
		Ciclohexano		Solução Aquosa ^{**}	
<u>NaCl (50 mg)</u>					
S_1	120	200±2 ^c	(0,195)	195±2 ^c	(0,186)
C_8	80	209±1 ^d	(0,188)	213±4 ^d	(0,192)
<u>NaCl (70 mg)</u>					
C_11	80	189±5 ^e	(0,163)	188±1 ^e	(0,168)
<u>NaCl / CuSO₄ (40 mg / 7 mg)</u>					
C_5	120	139±2 ^f	(0,086)	181±2 ^g	(0,162)
C_9	80	135±1 ^f	(0,075)	181±2 ^g	(0,158)

* Experimento realizado em triplicata. ** Nanocápsulas redispersas em solução aquosa contendo 0,25% em massa de SLS em razão de 6:1 de látex. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com método de Tukey de comparações das médias ($p < 0,05$).

Figura 3.13 Efeito da (a) concentração de sal sobre nanopartículas de amido reticuladas com 80 mg de TDI e (b) tipo de co-estabilizador. (■) NaCl e (▣) NaCl e CuSO₄ na composição de nanopartículas sintetizadas com 0,1 g de amido dispersas em ciclohexano e, (□) NaCl e (▤) NaCl e CuSO₄ sobre a identidade das nanopartículas dispersas em solução aquosa.



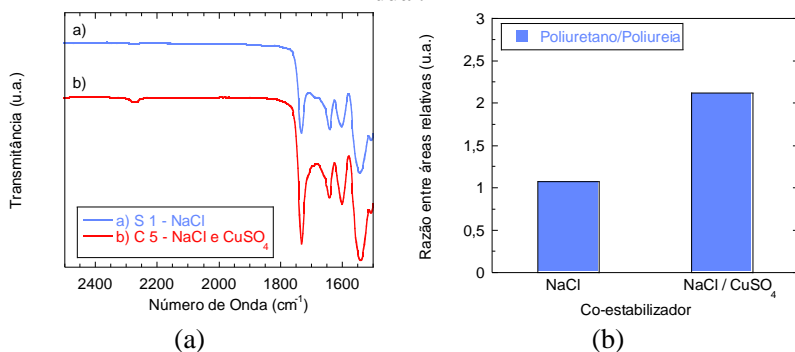
Para um aumento de 40 % em massa de cloreto de sódio, foi observada tanto uma redução de 20 nm no diâmetro médio final, quanto uma distribuição de tamanho de partículas mais estreita (amostras C_8 e C-11). Tal fato se deve ao aumento da estabilidade da miniemulsão, proporcionada pelo aumento de pressão osmótica no interior das nanogotas, neutralizando a pressão de Laplace. Todavia, a diminuição do tamanho de partículas foi ainda mais pronunciada com a substituição parcial do sal de sódio por sulfato de cobre (Figura 3.13b).

Sais hidrofílicos têm habilidade de se dissociar em solução aquosa, a qual pode ser um fator relevante de influência sobre as propriedades das nanopartículas e estabilidade coloidal da miniemulsão. Diferentes habilidades de dissociação de sais proporcionam diferentes pressões osmóticas (CAO et al., 2010).

Sabendo-se que a concentração molar para substituição de 10 mg de NaCl por CuSO₄ foi calculada levando em consideração a igualdade das forças iônicas, a quantidade molar de sal de cobre foi em torno de 72 % menor que a concentração de sal de sódio substituído ($1,71 \times 10^{-4}$ moles de NaCl foram substituídos por $4,82 \times 10^{-5}$ moles de CuSO₄). O fato de uma menor concentração molar de sal de cobre aumentar a estabilidade e resultar em um menor diâmetro médio final de partículas pode ser atribuído tanto a maior habilidade de dissociação iônica do sal de cobre comparada a do sal de sódio, quanto a possibilidade de diminuir a tensão interfacial. Segundo Cao et al. (2010), além de estabelecer a pressão osmótica dentro das gotas aquosas, sais hidrofílicos podem atuar sobre as propriedades interfaciais entre a fase contínua e dispersa. Contudo foi observado que a concentração e tipo de co-estabilizador não influenciam significativamente a tensão interfacial entre as fases. Os resultados estão apresentados em Informações de Suporte. Dessa forma, pode-se assumir que a maior estabilidade dos nanopartículas sintetizadas com a combinação de sal de cobre e sal de sódio se deve ao fato de o primeiro apresentar uma maior habilidade de dissociação iônica, consequentemente, maior pressão osmótica. Contudo, este mesmo acréscimo na pressão osmótica pode ser responsável pelo aumento de diâmetro das nanopartículas ao transferi-las para a solução aquosa (C_5 e C_9, ambas com CuSO₄ como co-estabilizador), favorecendo o processo de osmose, o qual não é impedido pelo aumento de concentração de TDI. Podendo-se afirmar que as cascas poliméricas formadas apresentam permeabilidades semelhantes. Análise estatística corrobora com tais resultados, indicando que não há diferença significativa ($p = 0,92$) entre os diâmetros obtidos em C_5 e C_9.

O efeito do tipo de co-estabilizador sobre a composição da casca polimérica foi verificado a partir de espectroscopia FT-IR. A Figura 3.14a apresenta os espectros na região de interesse. As razões entre as áreas dos picos característicos da poliuretana e poliuréia (Figura 3.14b) indicam que reações sintetizadas com sal de sódio parcialmente substituído pelo sal de cobre favorecem a síntese de poliuretana. Enquanto que a reação S_1 apresentou uma razão entre poliuretana e poliuréia em torno de 1, a reação C_5 apresentou o dobro de poliuretana com relação a poliuréia. Tal fato se deve ao menor diâmetro final da nanopartículas obtidas no final da reação C_5, conseqüentemente, maior área interfacial formada.

Figura 3.14 Resultados obtidos em análise em espectroscopia FT-IR em ATR (a) espectro na região de interesse e (b) composição da casca polimérica: razões entre áreas dos picos característica de poliuretano, poliuréia e isocianato residual.



3.4.4 Efeito da Concentração de TDI

Para satisfazer os pré-requisitos requeridos para aplicação das nanopartículas na área biomédica, é necessário reduzir o diisocianato em excesso. Dessa forma, a menor quantidade de TDI suficiente para estabilizar as nanopartículas foi determinada a partir da série de experimentos realizados segundo as formulações apresentadas em Tabela 3.6. O efeito da concentração de TDI foi avaliado com variação em quantidades mássicas entre 80 a 160 mg, mantendo-se as quantidades de sal de cloreto, amido, água, PGPR e ciclohexano constantes. As reações foram iniciadas a partir da adição da solução de reticulante composta de 5,0 g de ciclohexano, 30 mg de PGPR e TDI.

Tabela 3.6 Formulação das miniemulsões inversa de amido obtidas com 7,5 g de ciclohexano e posteriormente polimerizadas a 60 °C por 2 horas.

Reagentes		Referência	TDI (mg)
Amido (g)	0,1	C_8	80
Água (g)	1,3	TDI_1	100
NaCl (mg)	50	S_1	120
PGPR (mg)	149	TDI_2	140
		TDI_3	160
		TDI_4	200

A Tabela 3.7 apresenta os diâmetros médios finais obtidos, onde é possível observar que concentrações acima de 120 mg de TDI, tem-se um aumento significativo do diâmetro das nanopartículas ($p < 0,05$). Como discutido anteriormente, o excesso de TDI presente na fase orgânica pode reagir com as hidroxilas presentes no surfatante, ocasionando esta variação de diâmetro, como pode ser melhor observado em Figura 3.15.

Tabela 3.7 Características das nanopartículas de amido reticulado obtidos com diferentes concentrações de surfatante.

Ref.	TDI (mg)	Diâmetro médio (nm) / (IPd)*			
		Ciclohexano		Solução aquosa**	
C_8	80	209±1 ^{a,b}	(0,188)	209±1 ^{a,b}	(0,188)
TDI_1	100	215±1 ^b	(0,195)	215±1 ^b	(0,195)
S_1	120	200±1 ^a	(0,195)	200±1 ^a	(0,195)
TDI_2	140	251±4 ^c	(0,205)	202±3 ^a	(0,197)
TDI_3	160	284±3 ^d	(0,220)	184±1 ^e	(0,187)

* Experimento realizado em triplicata. ** Nanocápsulas redispersas em solução aquosa contendo 0,25% em massa de SLS em razão de 6:1 de látex. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com método de Tukey de comparações das médias ($p < 0,05$).

Devido o caráter hidrofóbico predominante do PGPR, as moléculas de surfatante projetam-se livremente na fase contínua composta de ciclohexano. Novamente, o mesmo efeito de contração foi observado ao se transferir as nanopartículas para um meio aquoso, devido a hidrofobicidade das moléculas de PGPR. A partir de imagens obtidas por microscopia eletrônica das amostras TDI_3, Figura 3.16, observa-se que o tamanho das nanocápsulas foi em torno de 200 nm.

Figura 3.15 Efeito da concentração de TDI sobre nanopartículas de amido reticuladas com 0,1g de amido dispersas em (■) ciclohexano e (▨) solução aquosa.

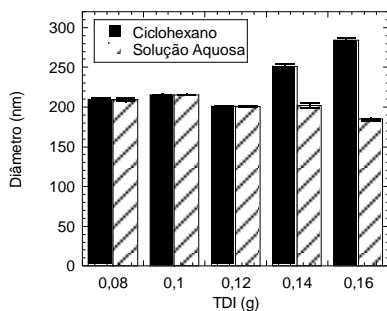
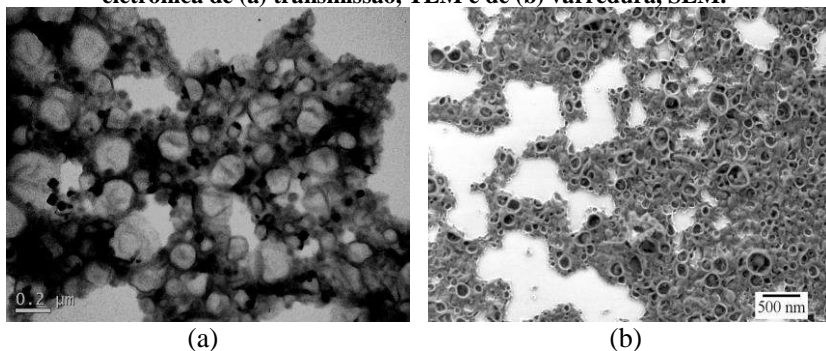
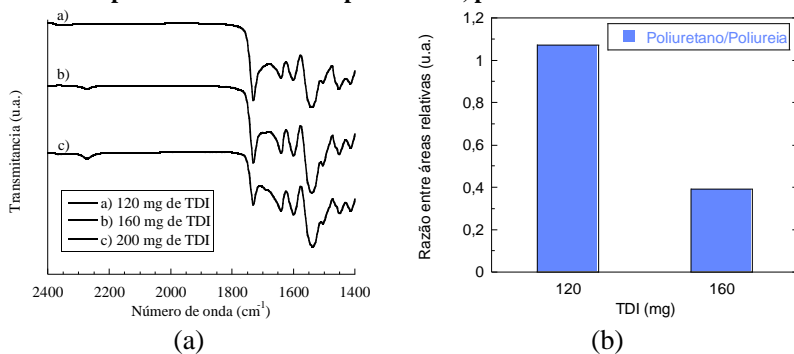


Figura 3.16 Imagens obtidas nanopartículas TDI_3 a partir de microscopia eletrônica de (a) transmissão, TEM e de (b) varredura, SEM.



A Figura 3.17 apresenta o efeito da concentração de TDI sobre a composição da casca polimérica. A Figura 3.17a apresenta os picos característicos, enquanto que na Figura 3.17b, observa-se o efeito do aumento da concentração de TDI sobre a composição da casca polimérica. Uma maior fração de poliuréia foi observado com o aumento da quantidade de TDI, devido a reação unilateral secundária com água. Tais resultados divergem com os obtidos por Baier et al. (2010), os quais não observaram efeito da concentração de TDI sobre a composição da casca polimérica.

Figura 3.17 Resultados obtidos em análise em espectroscopia FT-IR (a) espectro na região de interesse e (b) composição da casca polimérica: razões entre áreas dos picos característica de poliuretano, poliuréia e isocianato residual.



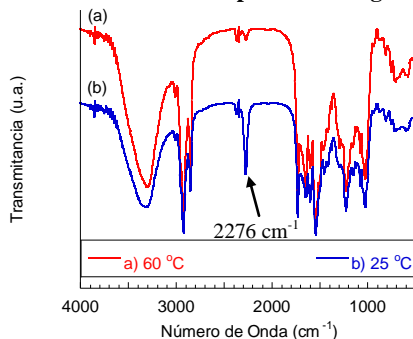
3.4.5 Avaliação Temperatura de Reação

Nanocápsulas de amido reticulado foram preparadas por polimerização interfacial a duas temperaturas diferentes, de 60 e 25 °C, com diferentes tempos de reação, 2 horas e 24 horas, respectivamente de acordo com a formulação TDI_3 apresentada na Tabela 3.6. FT-IR confirmou a reação química entre grupos OH presente no amido e no surfactante com o grupo NCO presente no TDI. Figura 3.18 apresenta o espectro referente a nanocápsulas de amido reticuladas, cuja casca polimérica é composta de grupos uretano e uréia. A vibração da carbonila em 1734 cm⁻¹ e da vibração N-H em 1544 cm⁻¹ é uma forte evidência de formação de poliuretanos.

A banda característica de NCO do TDI é observada em 2276 cm⁻¹. Pode ser observada na Figura 3.18 que, ao diminuir a temperatura para 25 °C, um pico acentuado de NCO residual foi observado após 24 horas de reação, devido ao consumo incompleto de grupos NCO do reticulante. Além do fato de que, a velocidade de reação pode ser mais lenta a 25 °C, a viscosidade dentro das gotas aquosa a uma temperatura mais baixa é maior do que a 60 °C, sendo este efeito acentuado pela etapa de gelatinização do amido a 90 °C. A viscosidade mais elevada é devida ao estabelecimento de amido de formar um gel viscoso com a água, quando aquecida, seguido por resfriamento (NGUYEN & KRISTENSEN, 1998). A formação desse gel viscoso a 25 °C pode reduzir a mobilidade do amido no interior da gotícula de solução aquosa, resultando numa menor concentração de hidroxilas na interface da gota e, por consequin-

te, de uma maior quantidade de isocianato residual após a polimerização interfacial.

Figura 3.18 Resultados obtidos em análise em espectroscopia FT-IR de nanocápsulas preparadas com 160 mg de TDI em diferentes temperaturas (a) 60 °C e (b) 25 °C. Ambas com amido previamente gelatinizado.



Segundo Baier et al. (2010), a síntese de nanopartículas de amido reticulado a temperatura mais amenas proporcionam uma ótima vantagem de encapsular agentes ativos sensíveis a temperatura. A partir disto, reações de polimerização interfacial foram realizadas a 60, 40 e 25 °C, aplicando-se quantidades de amido (0,2 g), PGPR (149 mg), cloreto de sódio (50 mg) e TDI (120 mg) constantes, segundo a Tabela 3.8.

Tabela 3.8 Formulação das reações de polimerização do amido com TDI em miniemulsão inversa em diferentes temperaturas.

Reagentes		Referência	T _{Reação} (°C)	Teor de Sólidos (%)
Amido (g)	0,2	Am_1 ^a	60	4,49
Água (g)	1,2	Temp_1	60	2,82
NaCl (mg)	50	Temp_2	40	2,72
PGPR (mg)	149	Temp_3	25	2,55
TDI (mg)	120			

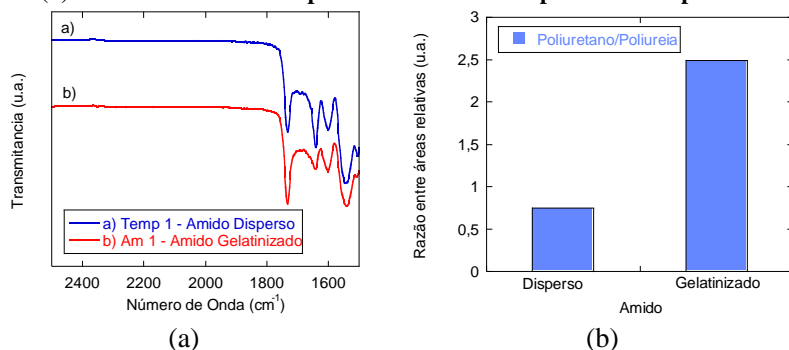
Amido disperso em água a temperatura ambiente, com exceção de a) amido gelatinizado a 90°C.

Enfatiza-se que, visando a encapsulação de agentes ativos sensíveis a temperatura, a etapa de gelatinização de amido a 90°C não foi efetuada, com exceção da reação Am_1.

A partir dos dados apresentados na Tabela 3.8, observa-se que o processo de solubilização do amido em água apresenta forte influência sobre o teor de sólidos final da miniemulsão. Nota-se que teor de sólidos experimental foi diferente do teórico (4 % em massa de sólidos), com exceção da reação Am_1, basicamente devido à baixa solubilidade do amido a temperatura ambiente, havendo perda de material.

A Figura 3.19 apresenta o efeito da etapa de gelatinização sobre a composição da casca polimérica obtida. Devido a perda de material e diminuição do teor de sólidos, o procedimento de dispersão do amido em temperatura ambiente, sem gelatinização, propicia a formação de poliuretã, como apresenta a Figura 3.19b.

Figura 3.19 Efeito da etapa de gelatinização do amido na composição da casca polimérica das NCs. (a) espectros na região de interesse obtidos em análise FT-IR (b) razões entre áreas dos picos característica de poliuretano e poliuretã.



A Figura 3.20 apresenta uma comparação entre as diferentes temperaturas de reações quando o amido se encontra apenas disperso na fase aquosa. A partir dos dados de razão entre as áreas dos picos característicos dos grupos uretano e uréia, foi possível observar que a temperatura de reação mais baixa favorece a formação de poliuretã, Figura 3.20b. Tal fato pode ser devido a maior reatividade do TDI com amido em temperaturas mais elevadas e igual a 60 °C.

A Tabela 3.9 apresenta o efeito da etapa de gelatinização e temperatura de reação sobre o diâmetro médio das partículas. A diferença entre os teores de sólidos (TS) e viscosidade da fase dispersa é a principal fonte de variação ($p < 0,05$) entre os diâmetros obtidos em Am_1 e Temp_1, Figura 3.21a.

Figura 3.20 Efeito da temperatura de reação com amido disperso na fase dispersa (a) espectros na região de interesse obtidos em análise FT-IR (b) razões entre áreas dos picos característica de poliuretano e poliuréia.

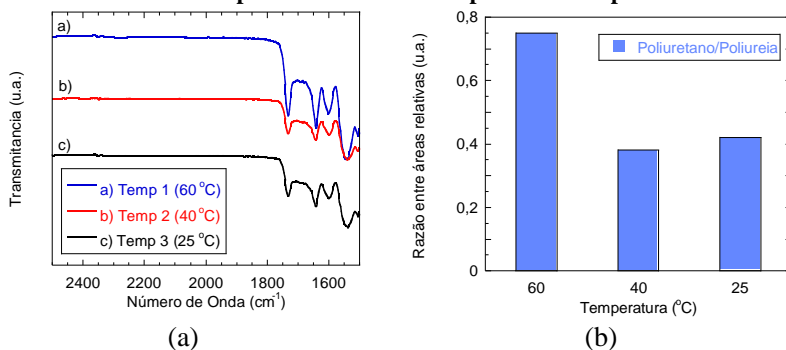


Tabela 3.9 Características das nanopartículas de amido reticulado obtidos com diferentes concentrações de surfatante.

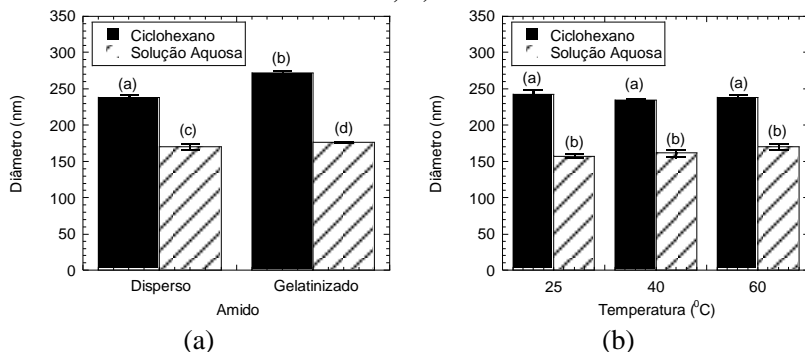
Ref	T (°C)	TS (%)	Diâmetro médio (nm) / (IPd) ^a			
			Ciclohexano		Solução aquosa ^c	
Am_1 ^b	60	4,49	272±2	(0,194)	177±1	(0,201)
Temp_1	60	2,82	238±3	(0,265)	172±4	(0,181)
Temp_2	40	2,72	235±2	(0,240)	161±5	(0,198)
Temp_3	25	2,55	242±4	(0,265)	157±2	(0,171)

a) Experimento realizado em triplicata. Amido disperso em água a temperatura ambiente, com exceção de b) amido gelatinizado a 90 °C. c) Nanocápsulas redispersas em solução aquosa contendo 0,25% em massa de SLS em razão de 6:1 de látex.

As diferentes temperaturas de reação não apresentaram efeito significativo sobre o diâmetro final das nanopartículas ($p = 0,23$) dispersas em ciclohexano e ($p = 0,07$) em solução aquosa, Figura 3.21b.

A única etapa que não foi adaptada para encapsulação de compostos sensíveis a temperatura foi a transferência das nanopartículas do solvente orgânico para solução aquosa com SLS, a qual foi realizada a 60 °C. Contudo, novamente, ambas as reações apresentaram efeito do surfatante, causando diferenças significativas nos diâmetros médios entre fases contínuas, a qual as nanopartículas estão dispersas.

Figura 3.21 Efeito da (a) condição de solubilização do amido em água e (b) temperatura de reação sobre nanopartículas de amido reticuladas dispersas em (■) ciclohexano e (▨) solução aquosa. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com método de Tukey de comparações das médias ($p < 0,05$).



3.5 CONCLUSÕES

No presente trabalho, formulações estáveis de miniemulsões inversas foram obtidas com diferentes concentrações de surfatante e amido. O estudo da estabilidade das miniemulsões inversas foi uma etapa de extrema importância, pois na ausência de tal avaliação se tornaria difícil estabelecer uma boa reprodutibilidade das polimerizações em miniemulsões subsequentes.

Nanopartículas de amido reticulado com 2,4 – tolueno diisocianato foram obtidas com sucesso. A influência de diferentes parâmetros foi avaliada, tais como concentração de surfatante, amido, co-estabilizador, TDI e tipo de sal aplicado sobre o diâmetro médio das nanopartículas e composição da casca polimérica. Foi observado que a concentração de TDI influencia na determinação do diâmetro médio hidrodinâmico, resultando em um valor acima do real. Já com relação a concentração de surfatante, foi observado que quanto maior a sua concentração, menor o diâmetro médio final obtido. E, diferentes tipos de sais com valências diferentes, devido as diferentes taxas de dissociação, possivelmente podem resultar em pressões osmóticas maiores, resultando em um diâmetro menor quando as nanopartículas estão dispersas em ciclohexano.

Em geral, foi observado que o diâmetro das nanogotas obtidas influencia a composição da casca polimérica. Quanto menor o diâmetro inicial das nanogotas, maior a concentração de poliuretano na composição da casca polimérica. Acredita-se que tal fato se deve ao aumento da

área interfacial total, favorecendo a polimerização interfacial entre TDI e amido.

Todas as reações apresentaram morfologia de nanocápsulas, contendo núcleo aquoso, representando um potencial na encapsulação de compostos hidrofílicos.

3.6 INFORMAÇÕES DE SUPORTE

3.6.1 Caracterização do Amido

3.6.1.1 MORFOLOGIA DO GRÂNULO DE AMIDO

Suspensões aquosas de amido solúvel com concentrações iguais a 7,14 % em massa, escolhida aleatoriamente, foram mantidas a temperatura constante igual a 25 °C por 30 minutos, com agitação branda (IKA Werke ETS-D5). Após esta etapa, a amostra foi seca sobre uma lâmina de microscópio e analisadas em um microscópio ótico trinocular (Bioval modelo L-2000A) com magnificação igual a 100x. As imagens foram adquiridas a partir de uma câmera fotográfica Sony Cyber-shot (DSC-S650/S700).

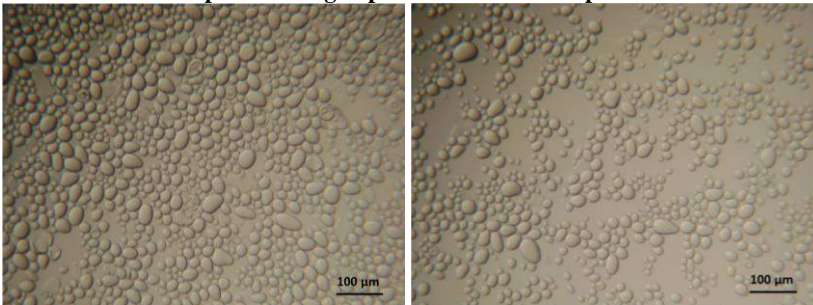
3.6.1.2 ÍNDICE DE SOLUBILIDADE DO AMIDO

O índice de solubilidade foi determinado por análise de gravimetria. Este procedimento foi realizado em triplicata. Suspensões aquosas de amido solúvel com concentrações iguais a 7,14 % em massa foram mantidas a temperatura constante iguais a 50, 70, 80 e 90 °C por 30 minutos, com agitação branda. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 8,000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi separado para análise de teor de sólidos.

3.6.2 Gelatinização do Amido

A síntese de nanopartículas poliméricas e a encapsulação de agentes ativos a partir da técnica de miniemulsão somente são possíveis devido à estabilidade das nanogotas, a qual depende da homogeneidade da fase contínua e da fase dispersa. Embora o amido seja um polímero hidrofílico, o mesmo não é solúvel em água fria, se apresentando em forma de grânulos, como apresenta a Figura 3.22.

Figura 3.22 Imagem obtida por microscópio óptico dos grânulos de amido solúvel de batata dispersos em água por 20 minutos a temperatura ambiente.



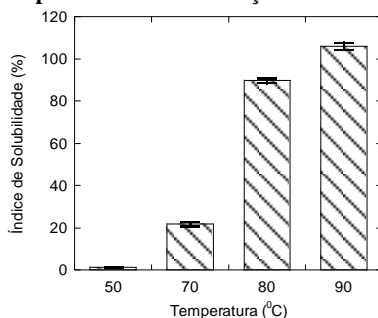
Para atender a máxima solubilização do amido, o mesmo deve ser disperso em excesso de água sob aquecimento. Para obter uma fase dispersa homogênea, um estudo preliminar da solubilidade do amido foi realizado. Entende-se por solubilidade como a quantidade máxima de amido que pode ser obtida em um volume específico de água (MUKERJEA et al., 2007).

A solubilidade do amido em água depende principalmente de dois fatores: (1) a quantidade de amido no volume de água e (2) a temperatura de solubilização (JOHNSTON et al., 2011). Para determinação do índice de solubilidade, temperaturas entre 50 e 90°C foram estudadas e a concentração de amido em água foi mantida constante e igual a 76,75 mg.ml⁻¹, a qual também foi a concentração proposta inicialmente da fase dispersa das miniemulsões inversas. A Figura 3.23 apresenta os resultados obtidos para o índice de solubilidade em função da temperatura.

A partir da concentração inicial da suspensão aquosa de amido solúvel de batata e considerando o índice de solubilidade médio, em 30 minutos com agitação branda sob temperatura constante, a solubilidade do amido em água foi igual a 1,02; 16,64; 68,93 e 81,27 mg.ml⁻¹, para as temperaturas igual a 50, 70, 80 e 90 °C, respectivamente. Dessa forma, pode-se afirmar que o percentual de material solúvel de amido aumenta significativamente com a temperatura.

Este resultado está de acordo com os obtidos por Johnston et al. (2011) e se deve ao fato de o aquecimento causar o rompimento do grânulo de amido, iniciando o processo de gelatinização, resultando em uma maior solubilidade e um aumento da viscosidade a temperaturas mais altas.

Figura 3.23 Índice de solubilidade do amido de batata solúvel em função da temperatura e concentração constante.



Uma propriedade relacionada ao processo de gelatinização é o processo de retrogradação, o qual ocorre quando a solução de amido é resfriada e as cadeias do amido tendem a se reorganizar novamente a partir de ligações de hidrogênio entre grupos hidroxilas da amilose, principalmente, formando um gel, aumentando novamente a viscosidade da pasta e dificultando a evaporação da água. Devido ao processo de resfriamento e à formação de uma pasta viscosa, o erro experimental foi maior para as análises de gravimetria após gelatinização com temperaturas iguais a 80 e 90 °C, resultando em um índice médio de solubilidade do amido em 105 % em massa para a temperatura de 90 °C, solubilizando completamente o amido.

3.6.3 Obtenção de Miniemulsões Estáveis

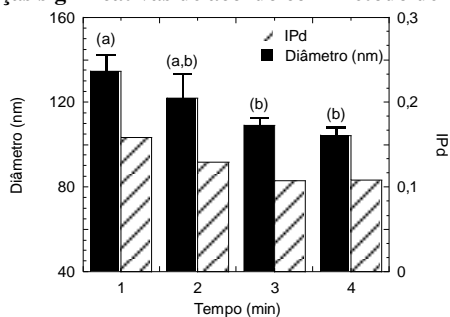
3.6.3.1 TEMPO DE ULTRASONICAÇÃO

Para avaliar o efeito do tempo de ultrassonificação sobre o diâmetro inicial médio das nanogotas, miniemulsões foram formadas contendo teor de sólidos igual a 4,7 % em massa com três repetições, conforme a Tabela 3.10.

Enfatiza-se que o amido foi gelatinizado previamente em solução aquosa contendo o sal durante 30 minutos sob temperatura constante de 90 °C. O tempo de ultrassom variou entre 1 a 4 minutos com uma intensidade constante igual a 70 %. A Figura 3.24 apresenta as médias dos resultados obtidos para diâmetro médio e índice de polidispersão (IPd) das nanogotas.

Tabela 3.10 Formulação das miniemulsão para avaliação do efeito do ultrassom sobre a identidade das nanogotas.

Reagentes	Repetição		
	1	2	3
Fase Aquosa			
NaCl (g)	0,056	0,053	0,053
Amido (g)	0,099	0,104	0,099
Água (g)	1,342	1,325	1,346
Fase Orgânica			
PGPR (g)	0,284	0,286	0,288
Ciclohexano (g)	7,541	7,575	7,511

Figura 3.24 Efeito do tempo de ultrassonificação sobre o diâmetro inicial e índice de polidispersão (IPd) das nanogotas aquosas de amido. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com método de Tukey ($p < 0,05$).

A partir dos resultados, pode-se observar que ao aumentar-se o tempo de ultrassom, menor é o diâmetro médio das gotas e o índice de polidispersão obtidos, devido a maior exposição a energia ultrassônica. Observa-se que, inicialmente, se tem uma diminuição aparente do diâmetro médio, seguido de um valor praticamente constante. Aumentando-se o tempo da etapa de ultrassonificação de 1 para 2 minutos, as nanogotas formadas são menores, porém sem diferença significativa ($p = 0,22$) entre os diâmetros. Enquanto que o aumento do tempo para 3 minutos apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), resultando em um diâmetro médio menor e igual a $110 \pm 3,6$ nm. Porém, a partir de 3 minutos, o diâmetro inicial das nanogotas não apresentou mais diferença significativa ($p = 0,86$).

Tal fato pode ser explicado a partir do recobrimento superficial das nanogotas pelo surfatante. Acredita-se que entre 1 e 3 minutos de ultrassom, o surfatante está recobrindo a maior área superficial possível. Contudo, aumentando-se o tempo da etapa de ultrassonificação de 3 para 4 minutos, o recobrimento proporcionado pelo surfatante já não é mais suficiente. Uma vez que, imediatamente após o término da etapa de ultrassonificação, as nanogotas atingem um pseudo-equilíbrio entre coalescência e fissura, sendo que a falta de recobrimento total da área superficial das nanogotas propicia a coalescência, não havendo diferença significativa ($p = 0,86$) do diâmetro médio entre 3 ($110 \pm 3,6$ nm) e 4 ($106 \pm 3,8$ nm) minutos de ultrassom.

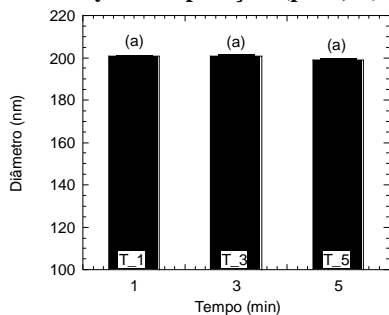
3.6.4 Polimerização em Miniemulsão Inversa

3.6.4.1 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE GOTEJAMENTO DO TDI

Para investigar se o tempo de gotejamento do reticulante é um fator influente nas características finais das partículas obtidas, miniemulsões foram formadas contendo 7,5 g de ciclohexano e 3,5% em massa de sólidos. As reações foram iniciadas a partir da adição da solução de reticulante composta de 5,0 g de ciclohexano, 30 mg de PGPR e 120 mg de TDI. A solução de TDI foi alimentada em diferentes tempos imediatamente após a etapa de ultrassonificação, 1 a 5 minutos. A Figura 3.25 apresenta os resultados de diâmetro das nanopartículas após 2 horas de reação.

Observa-se que todos os diâmetros finais das nanopartículas obtidos foram em torno de 200 nm, não havendo diferença significativa ($p < 0,05$). Dessa forma, pode-se afirmar que o tempo de adição da solução de reticulante não é um fator fonte de variação. Sendo assim, a solução de reticulante foi gotejada a miniemulsão em 1 minuto.

Figura 3.25 Efeito do tempo de alimentação da solução de TDI sobre o diâmetro final das nanopartículas de amido reticulado após 2 horas de reação a 60 °C. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com método de Tukey de comparações ($p < 0,05$).



3.6.4.2 EFEITO DO TIPO E CONCENTRAÇÃO DE CO-ESTABILIZADOR

Para realizar as medidas de tensão interfacial entre as fases que compõem a miniemulsão inversa foi utilizado um tensiômetro/goniômetro (Ramé-Hart, modelo 250). O procedimento adotado foi o da gota pendente na condição de equilíbrio de dois líquidos não miscíveis.

A gota composta por água e sal foi formada com o auxílio de uma microseringa contendo um tubo capilar submersa em uma solução de ciclohexano e surfatante (1,98% em massa de PGPR com relação ao solvente orgânico), que se encontra homogênea em um cubeta de vidro. Com a utilização de uma câmera, o equipamento registra a forma da gota em função do tempo com o auxílio do software DROPimage Advanced.

A tensão interfacial foi calculada a partir da equação de Laplace, a qual correlaciona a diferença de pressão ao longo de uma interface com a tensão interfacial e o raio de curvatura desta interface formada dois líquidos imiscíveis. As análises foram realizadas com três repetições para verificar a confiabilidade.

Observou-se que os diferentes tipos de co-estabilizador não influenciaram significativamente a tensão interfacial entre as fases ($p = 0,36$).

Enfatiza-se que análises de tensão interfacial entre fase aquosa contendo amido gelatinizado e fase orgânica composta de ciclohexano e surfatante foram realizadas, contudo, não houve reprodutibilidade devido o processo de retrogradação.

Tabela 3.11 Influência do tipo e concentração de co-estabilizador sobre a tensão interfacial entre gota de solução salina e ciclohexano com surfatante.

Látex	NaCl (mol/g)*	CuSO ₄ (mol/g)*	γ (mN/m)
C_8	$6,58 \times 10^{-4}$	-	$3,04 \pm 0,09$
C_11	$9,21 \times 10^{-4}$	-	$3,08 \pm 0,03$
C_9	$5,26 \times 10^{-4}$	$4,82 \times 10^{-5}$	$3,56 \pm 0,02$

* Concentração molar com relação a água.

ENCAPSULAÇÃO E LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS HIDROFÍLICOS EM NANOCÁPSULAS BIODEGRADÁVEIS

4.1 INTRODUÇÃO

Novas estratégias para administração de fármacos hidrofílicos têm recebido grande atenção na área de pesquisa e desenvolvimento. Fármacos de caráter hidrofílico ainda representam um desafio, atribuído a sua fragilidade, fácil degradação e oxidação *in vivo* e a baixa penetração celular de macromoléculas, tais como ácidos nucleicos, peptídeos e proteínas, utilizadas no tratamento de uma grande variedade de doenças, como câncer (VRIGNAUD; BENOIT & SAULNIER, 2011). Consideráveis esforços têm sido feitos com a finalidade de identificar estratégias para evitar a degradação e a oxidação destes compostos até que estes compostos possam atingir o alvo de ação, o tecido doente. Encapsulação destes compostos representa uma alternativa de proteção e de entrega eficiente de fármacos hidrofílicos ao tecido específico (VRIGNAUD; BENOIT & SAULNIER, 2011; BHARALI et al., 2003; CRESPIY et al., 2007; BAIER et al., 2010). Além de outras vantagens, tais como, redução de efeitos colaterais decorrentes de administração direta, maior conforto do paciente com a diminuição de doses e melhora da farmacocinética, processo que abrange absorção, distribuição, biotransformação e excreção dos fármacos após a sua administração.

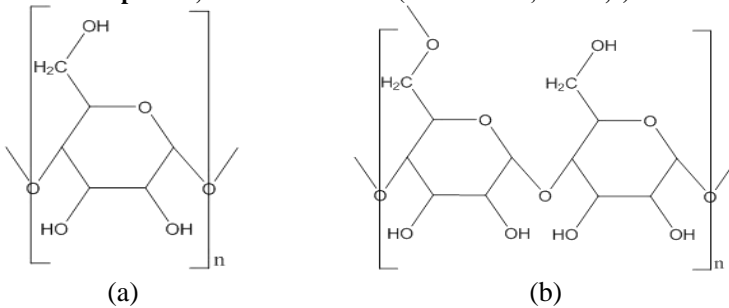
Entre os diferentes sistemas carreadores de fármacos, a importância de nanopartículas poliméricas na elaboração de sistemas de liberação controlada é atualmente reconhecida (BATHFIELD; GRAILLAT & HAMAIDE, 2005; VRIGNAUD; BENOIT & SAULNIER, 2011). Contudo, técnicas usualmente utilizadas e já bem estabelecidas na literatura para a encapsulação de compostos hidrofóbicos não se aplicam na encapsulação eficiente para compostos hidrofílicos. Técnicas de dupla emulsão com difusão de solvente e emulsão seguida evaporação de solvente são comumente investigadas na encapsulação destes compostos. Contudo, estas técnicas resultam em uma baixa eficiência de encapsulação de moléculas hidrofílicas devido à rápida partição do fármaco para a fase aquosa externa (COHEN-SELA et al., 2009; HANS & LOWMAN, 2002).

A técnica de polimerização em miniemulsão inversa apresenta uma oportunidade promissora de preparação de nanopartículas com núcleo-aquoso. Estas nanopartículas apresentam morfologia de casca-núcleo, onde o núcleo é composto de água, aumentando a solubilidade do fármaco dentro das nanocápsulas, resultando em uma alta eficiência

de encapsulação. Esta tecnologia relativamente recente foi desenvolvida para a encapsulação de compostos hidrofílicos, visando a aplicação na área biomédica como sistemas de liberação controlada de fármacos. Para tal aplicação, é necessário garantir que as nanopartículas apresentem superfície biocompatível, sejam preparadas a partir de materiais não-tóxicos e também biodegradáveis (LANDFESTER, 2003). Dessa forma, a utilização de materiais biocompatíveis e biodegradáveis para a preparação de sistemas de liberação de fármaco tem se tornado um atrativo.

Consideráveis estudos utilizam polímeros naturais na preparação de nanopartículas. Biopolímeros provenientes de fontes renováveis, tais como celulose, quitosana e amido são os mais comumente usados. Amido está entre os biopolímeros mais promissores devido a sua biodegradabilidade inerente, abundância e de fonte renovável (ZANETTI-RAMOS, 2011; KIM et al., 2012). Encontrado em raízes, caules, sementes agrícolas e alimentos básicos como arroz, milho, trigo, mandioca e batata, é composto principalmente de dois homopolímeros de D-glicose: amilase, uma cadeia linear de α -D(1,4)-glicose e amilopectina, contendo a mesma espinha dorsal que a amilose, mas também com ligações α -D(1,6), como apresenta a Figura 4.1.

Figura 4.1 Estrutura molecular (a) amilose, cadeia linear (Glu-Glu α -1,4) e (b) amilopectina, cadeia ramificada (Glu-Glu α -1,4 e α -1,6).



O amido é o único polissacarídeo organizado em discretas partículas, conhecidas como grânulos, cujo tamanho, morfologia, forma, composição e estrutura supramolecular dependem do tipo de fonte botânica. O tamanho dos grânulos pode variar entre 2 a 100 μ m de diâmetro e a sua composição, em sua maioria, é composta de 72 a 82 % em massa de amilase e 18 a 28 % em massa de amilopectina (LE CORRE; BRAS & DUFRESNE, 2010).

Amido é hidrolisado a glucose, maltose e malto oligossacarídeos pela α - e β -amilases e outros enzimas similares (SARIKAYA et al., 2000). A hidrólise enzimática do grânulo de amido não ocorre homogeneamente (HELBERT; SCHÜLEIN & HENRISSAT, 1996). Foi observado que a degradação enzimática do grânulo de amido começa em um ponto aleatório da superfície e continua radialmente, resultando na formação de poros (HELBERT; SCHÜLEIN & HENRISSAT, 1996). Devido a rápida degradação enzimática do amido nativo, conseqüentemente uma rápida liberação de muitos fármacos, a sua aplicação em sistema de liberação controlada de fármaco não é adequada (BENEKE; VILJOEN & HAMMAN, 2009). Com a finalidade de inibir ou reduzir a degradação enzimática, nanopartículas foram preparadas usando amido modificado, tal como amido hidroxietil (HES) (BAIER et al., 2012) e amido reticulado (HAMDI; PONCHEL & DUCHÊNE, 1998; HAMDI & PONCHEL, 1999). Adicionalmente, amido vêm sendo combinado a outros polímeros para obter as propriedades desejadas (AZEVEDO & REIS, 2009).

Foi demonstrado que o perfil de degradação de partículas preparadas com amido reticulado depende da concentração de α -amilase (HAMDI; PONCHEL & DUCHÊNE, 1998; RAHMOUNI et al., 2001). Micropartículas de amido reticulado de tamanho em torno de 5 μ m foram preparadas a partir da técnica de emulsão inversa usando uma mistura de ciclohexano e clorofórmio como fase contínua e epicloroidrino como agente reticulante (HAMDI; PONCHEL; DUCHÊNE, 1998; HAMDI & PONCHEL, 1999). A degradação enzimática por α -amilase das partículas foi investigada *in vitro* em pH 7,4, contendo 0,132 g/l de cálcio a 37 °C. Foi observado que, devido a insolubilidade das partículas de amido reticulado em água, juntamente com a difusão limitada da enzima na partículas, a qual depende da quantidade de poros, a degradação das partículas de amido é um mecanismo controlado pela área superficial total e que ocorre na interface líquido-sólido entre a fase contínua e a partícula (HAMDI; PONCHEL & DUCHÊNE, 1998), e acredita-se que pode ser afetado pelo teor de reticulação.

A partir do exposto, a encapsulação de compostos hidrofílico foi investigada em nanopartículas biodegradáveis derivada de polissacarídeo, almejando-se uma alta eficiência de encapsulação. As nanocápsulas foram obtidas a partir de polimerização interfacial via técnica de miniemulsão inversa. Para tanto, nanocápsulas de amido reticulado foram preparadas utilizando 2,4-tolueno diisocianato como agente reticulante em diferentes temperaturas de reação e a biodegradação enzimática foi avaliada utilizando-se diferentes concentrações de α -amilase.

4.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

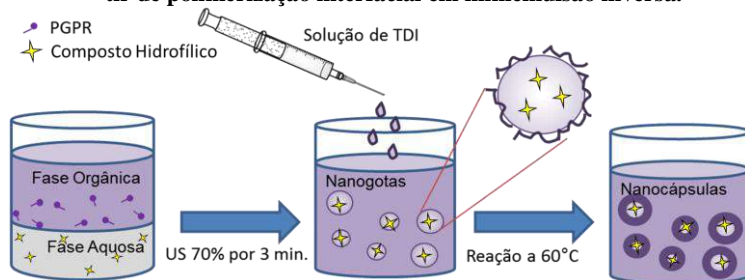
4.2.1 Materiais

Sulforodamina 101 (SR 101, BioChemica, Aldrich), um marcador fluorescente foi encapsulado nas nanocápsulas por ser composto de caráter hidrofílico. Para a redispersão das nanocápsulas em meio aquoso, lauril sulfato de sódio (SLS, Merck) e Tween 80 (Vetec) foram utilizados como surfatante. Os estudos de degradação enzimática das nanocápsulas de amido reticulado foram realizados utilizando-se α -amilase de *Bacillus subtilis* (Fluka). Água destilada foi utilizada em todos os procedimentos. Uma solução tampão de fosfato (PBS) 0,05 M e pH 7,4 foi preparada a partir de fosfato de sódio dibásico e monobásico. Todos os reagentes foram utilizados sem nenhum procedimento de purificação.

4.2.2 Procedimentos Experimentais

As nanopartículas de amido reticulado foram previamente sintetizadas a partir de polimerização por etapa como apresentado no Capítulo III utilizando 160 mg de TDI, segundo formulação TDI 3. Para a encapsulação da sulforodamina 101, a água que compõe a fase dispersa foi substituída por uma solução aquosa contendo 0,02 % em massa de SR 101, como apresenta o esquema na Figura 3.2.

Figura 4.2 Esquema de encapsulação de compostos hidrofílicos (SR 101) a partir de polimerização interfacial em miniemulsão inversa.



Após a síntese, nanocápsulas dispersas em ciclohexano foram adicionadas com auxílio de agitação magnética por 10 minutos em uma solução aquosa ou em solução PBS, ambas contendo SLS (lauril sulfato de sódio) ou Tween 80, seguida de uma etapa de sonicação por 1 minuto com uma amplitude de 70 % em um regime de pulso (20 segundos soni-

cando, 10 segundos de pausa). Segue-se com a evaporação do solvente por 8 horas a temperatura ambiente sob agitação magnética de 500 rpm.

4.2.3 Caracterização

4.2.3.1 TAMANHO MÉDIO DAS PARTÍCULAS

O tamanho médio das nanocápsulas de amido foi determinado por espalhamento dinâmico de luz (DLS), utilizando o equipamento Zetasizer, Nano Series – Malvern Instruments, o qual se baseia na taxa de difusão das partículas através do fluido para mensurar o diâmetro médio das partículas. Para realizar esta análise, as amostras finais foram diluídas em ciclohexano, em água ou em solução tampão de fosfato de sódio, dependendo do meio em que as nanocápsulas se encontram dispersas.

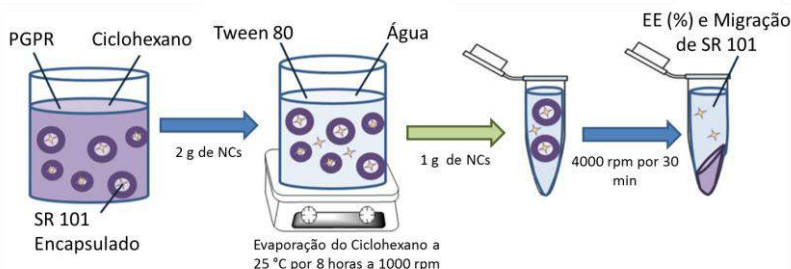
4.2.3.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E PERMEABILIDADE DA CASCA POLIMÉRICA

Eficiência de Encapsulação de Marcador Fluorescente Hidrofílico: A eficiência de encapsulação de SR 101 foi estudada após a redispersão das nanocápsulas em solução aquosa. Para tanto, 1 g das nanocápsulas dispersas em ciclohexano foram redispersadas em 5 g de água contendo 0,3 % em massa de SLS. Após a etapa de ultrasonicação, ciclohexano foi evaporado por 8 horas a 25 °C a 1000 rpm de agitação magnética. A eficiência de encapsulação foi determinada a partir de um espectrofotômetro de fluorescência (NanoDrop ND-3300, PEQLab, localizado no Instituto Max-Planck para Pesquisa em Polímeros - Mainz, Alemanha). SR 101 foi escolhido com marcador fluorescente hidrofílico devido a sua fluorescência estável na região do vermelho ($\lambda_{exc} / \lambda_{em}$: 583 / 603 nm). Um estudo da estabilidade é apresentado em Informações de Suporte. A eficiência de encapsulação foi calculada relacionando o sinal de fluorescência do sobrenadante da amostra após centrifugação a 4000 rpm por 30 min (Figura 4.3) com uma curva de calibração, apresentada em Informações de Suporte.

Permeabilidade da Casca Polimérica: A permeabilidade da casca polimérica das nanocápsulas redispersas em solução aquosa contendo SLS foi investigada a partir da determinação de perda de compostos hidrofílicos para a solução aquosa ao longo de sete dias a 37 °C. Alíquotas foram retiradas com específicos intervalos de tempo e centrifugadas a 4000 rpm (1467 xg, Centrifuga Eppendorf 5417C) durante 30 min

(Figura 4.3). Sobrenadante foi analisado em um espectrofotômetro de fluorescência (NanoDrop ND-3300, PEQLab).

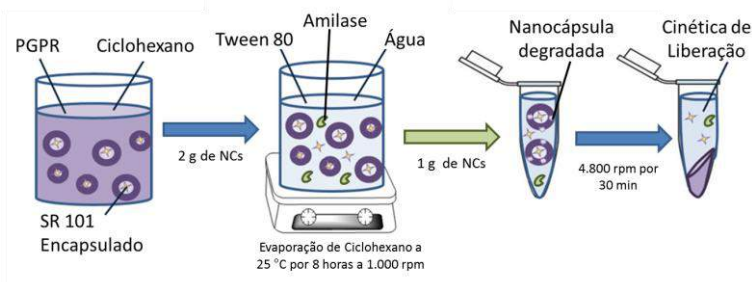
Figura 4.3 Esquema do procedimento adotado para determinação de eficiência de encapsulação (EE %) e permeabilidade da casca polimérica a partir da migração de SR 101 para a fase contínua.



4.2.3.3 LIBERAÇÃO DE COMPOSTOS HIDROFÍLICOS

Liberação de Compostos Hidrofílicos Através de Degradação Enzimática das Nanocápsulas: Para os experimentos de liberação, uma solução tampão de fosfato de sódio (PBS) foi preparada com 0,05 M e pH 7.4. As nanocápsulas foram redispersas em solução PBS como descrito a seguir: 2 g de NCs dispersas em ciclohexano foram redispersas em 10 g de solução PBS com 1 g de Tween 80. Após 8 horas de evaporação do ciclohexano em temperatura ambiente e agitação em 1000 rpm, amilase previamente dissolvida em solução PBS foi adicionada às nanocápsulas, resultando em uma concentração final de enzimas igual a 36; 18; 9; 0,9 e 0 mg.ml⁻¹. As amostras foram gentilmente agitadas e a cinética de liberação de SR 101 através da degradação enzimática das nanocápsulas foi avaliada a 37 °C. Alíquotas de 1 ml da amostra foram retiradas periodicamente e a reação enzimática foi parada com a adição de 0,5 ml de uma solução de HCl 0.1 M. As nanocápsulas foram sedimentadas por centrifugação por 30 min a 4800 rpm (1467 xg, Centrifuga MiniSpin Eppendorf), e o sobrenadante foi analisado em um espectrofotômetro UV-vis (AJX-1900, Micronal), de acordo com o esquema apresentado na Figura 4.4. O espectrograma em UV-vis do SR 101 está apresentado em Informações de Suporte, o qual apresenta absorvância máxima em 584 nm.

Figura 4.4 Esquema do procedimento adotado para investigação da cinética de liberação de marcador hidrofílico desencadeada a partir de degradação enzimática do amido pela amilase.



Atividade Enzimática: Primeiramente, a atividade da α -amilase foi determinada a partir de um ensaio colorimétrico. A atividade enzimática depende das condições do ambiente e por isso, foi avaliada em uma solução tampão de fosfato 0,05 M em pH 7,4 e 37 °C, visando a aplicação biomédica. Uma suspensão de amido gelatinizado foi previamente preparada com concentração igual a 0,1 g. ml^{-1} de amido em solução tampão de fosfato e mantida a 37 °C. A degradação enzimática iniciou com a adição de enzimas dissolvidas em solução tampão de fosfato, resultando em uma concentração final de 3,61 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de enzimas. A reação enzimática ocorreu com agitação magnética constante e foi interrompida em intervalos de tempo com a adição de 5 mL de solução de 0,1 M de HCl. 0,5 ml da mistura resultante foi adicionada a 5 ml de uma solução de iodine. A solução de iodo foi preparada a partir de uma solução mãe (500 mg de iodo e 5 g de iodeto de potássio em 100 ml de água), diluindo-a em 100 vezes. A solução de iodine apresenta coloração marrom avermelhada e em presença de amido residual não convertido, se torna azul. A absorbância da cor azul foi analisada no comprimento de 620 nm em um espectrofotômetro UV-vis (AJX-1900, Micronal). A amostra controle foi preparada com a solução de iodo, porém, sem enzimas e sem substrato. A absorbância da amostra com amido reagido foi comparada com a da amostra com amido inicialmente sem adição de enzimas, preparada seguindo o mesmo procedimento.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Devido às características de polimerização interfacial usando miniemulsão inversa, nanopartículas com estrutura casca-núcleo foram obtidas (Figura 4.5) e altas eficiências de encapsulação foram encontra-

das, entre 70 e 92 % aproximadamente. Na Figura 4.6a é possível observar que com uma menor quantidade de TDI (80 mg), a eficiência de encapsulação foi mais baixa (70 %) em relação a uma maior quantidade de TDI (160 mg, 92 %), após a redispersão de nanocápsulas (NCs) em água.

Figura 4.5 Imagem de microscopia de nanocápsulas de amido reticulado com 160 mg de TDI.

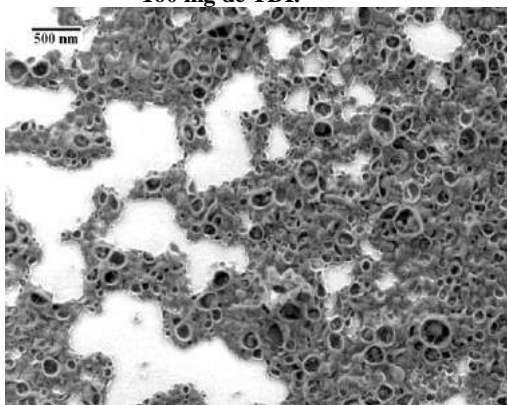
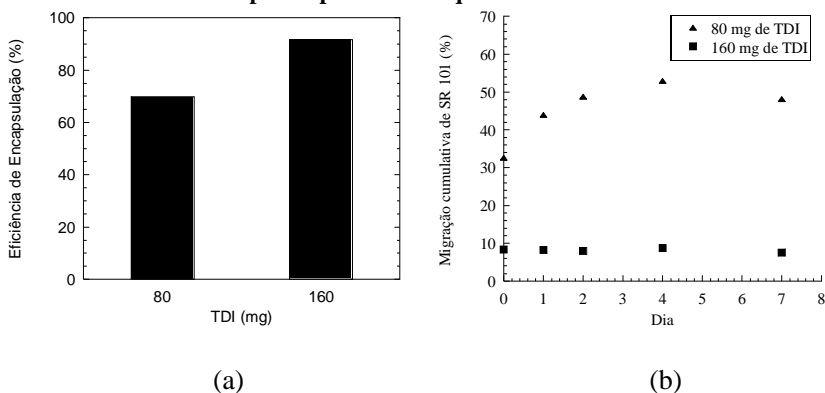


Figura 4.6 Eficiência de encapsulação do SR 101 em nanocápsulas preparadas com diferentes quantidades de TDI. (b) Migração cumulativa de corante hidrofílico das cápsulas para a fase aquosa contínua a 37 °C.



A perda de SR 101 para o meio contínuo aquoso foi monitorada durante 7 dias a 37 °C e pode ser atribuída à permeabilidade da casca polimérica, Figura 4.6b. A perda de SR 101 por migração à fase aquosa

após a redispersão em água pode ser facilmente minimizada aumentando-se a quantidade de TDI na reação, favorecendo o teor de reticulação.

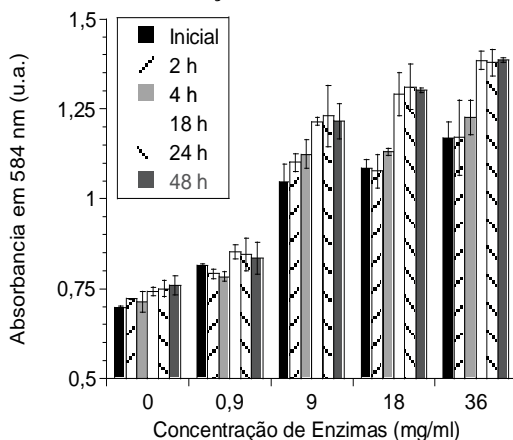
Para avaliar a cinética de liberação de SR 101 desencadeada apenas pela degradação enzimática, as nanocápsulas sintetizadas com 160 mg de TDI foram utilizadas.

Previamente, a atividade enzimática foi determinada utilizando as mesmas condições para os testes de degradação, PBS 0,05 M e pH 7,4 a 37 °C. As enzimas apresentaram atividade de 839 U/mg de enzima, resultados mostrados em Informações de Suporte.

A cinética de liberação de compostos hidrofílicos desencadeada por degradação enzimática foi monitorada com diferentes concentrações de α -amilase (36; 18; 9 e 0,9 mg.ml⁻¹) utilizando o marcador SR 101. Periodicamente, análise de espectroscopia de UV-vis foram realizadas do sobrenadante de alíquotas retiradas em 0, 2, 4, 18, 24 e 48 horas.

Os resultados obtidos da absorbância máxima de SR 101 em 584 nm de comprimento estão apresentados na Figura 4.7. Pode ser observado que ao aumentar a concentração de amilase, maior quantidade de SR 101 foi liberada até 18 horas de degradação. Após 18 horas a concentração do marcador hidrofílico no meio contínuo foi constante para todas as concentrações de amilase, indicando que não há mais degradação, consequentemente, liberação do composto hidrofílico (Figura 4.7).

Figura 4.7 Cinética de liberação de SR 101 desencadeada por degradação enzimática das nanocápsulas sintetizadas com 160 mg de TDI com diferentes concentrações de amilase.



A amostra controle sem a presença de enzima apresentou absorvência máxima em torno de 0,750 unidade adimensional, sendo que as pequenas variações podem ser atribuídas a danos na casca polimérica das nanopartículas durante o processo de centrifugação.

A cinética de liberação foi inicialmente determinada imediatamente após a adição da amilase ao meio. O aumento da concentração de SR 101 inicial com a concentração de amilase indica a liberação do composto hidrofílico localizado na superfície das nanocápsulas. Tal fato se deve a reação enzimática imediata com a camada superficial das nanocápsulas. Ao aumentar-se a concentração de amilase, maior a degradação da superfície das nanocápsulas e maior quantidade de SR 101 foi determinada no sobrenadante.

Observa-se que após a etapa inicial de degradação, a liberação de SR 101 com a menor quantidade de enzima avaliada (0,9 mg/ml) não foi significativa, indicando a degradação muito lenta. Concentrações enzimáticas acima de 9 mg/ml foram significativas na cinética de liberação do marcador hidrofílico até 18 horas de reação enzimática.

4.4 CONCLUSÕES

Nanocápsulas de amido reticulado foram preparadas utilizando a técnica de miniemulsão inversa a partir da polimerização interfacial entre amido de batata gelatinizado e 2,4-TDI. As nanocápsulas com estrutura de casca-núcleo foram preparadas com duas diferentes quantidade de TDI e foi observado que a eficiência de encapsulação depende do teor de reticulação.

O aumento da concentração de TDI favoreceu a reticulação, conseqüentemente, minimizou a perda de SR 101 para a fase aquosa contínua. Sumarizando, este trabalho apresentou uma possibilidade promissora para encapsulação de compostos hidrofílicos em nanocápsulas biodegradáveis com alta eficiência de encapsulação.

A biodegradabilidade das nanocápsulas foi demonstrada indiretamente pela cinética de liberação de SR 101 desencadeada com degradação enzimática das nanocápsulas. A cinética de liberação foi estudada a partir de medidas de absorção em espectrofotômetro de UV-vis. As nanocápsulas de amido foram degradadas por diferentes concentrações de α -amilase. Observou-se que concentrações de amilase abaixo de 0.9 mg/ml não apresentam liberação do SR 101, conseqüentemente, degradação muito lenta das nanocápsulas reticuladas.

4.5 INFORMAÇÕES DE SUPORTE

Estabilidade do Marcador Hidrofílico: a estabilidade de SR 101 foi investigada a partir de espectroscopia de fluorescência (NanoDrop ND-3300, PEQLab). O marcador foi submetido a todas as etapas do processo, tais como, diluição em água, aquecimento a 90 °C por 30 min, ultrasonicação e aquecimento a 60 °C por 2 horas. No final de cada etapa, uma alíquota foi analisada e verificado se houve alteração no sinal de fluorescência.

Figura 4.8 Estabilidade do SR 101. (a) Espectros após cada etapa realizada para síntese das nanocápsulas. (b) Sinal de Fluorescência no comprimento de onda 610 nm 1) inicial, após 2)30 min em 90 °C, 3) 1 hora em 25 °C, 4) ultrasonicação e 5) 2 horas a 60 °C.

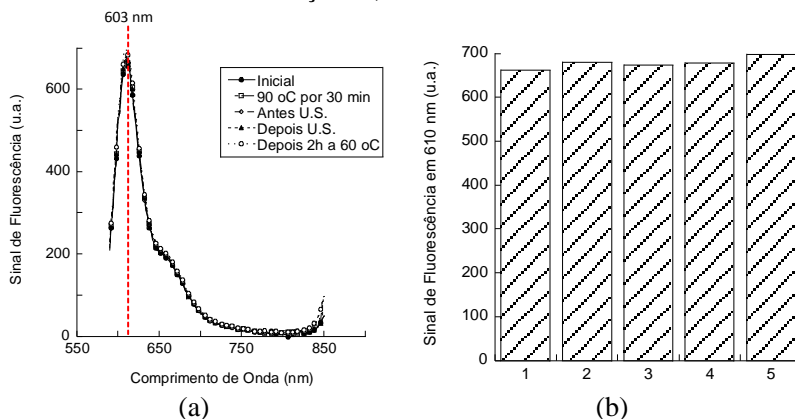


Figura 4.9 Perfil de intensidade de fluorescência com relação a concentração de SR 101. Curva de calibração de SR 101.

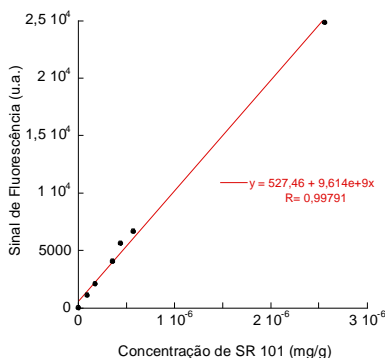
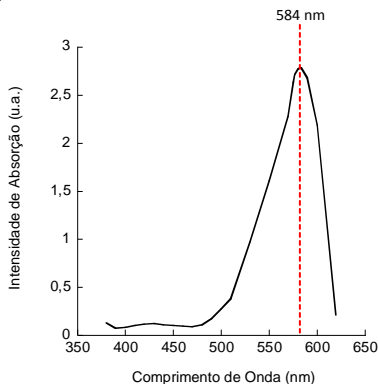
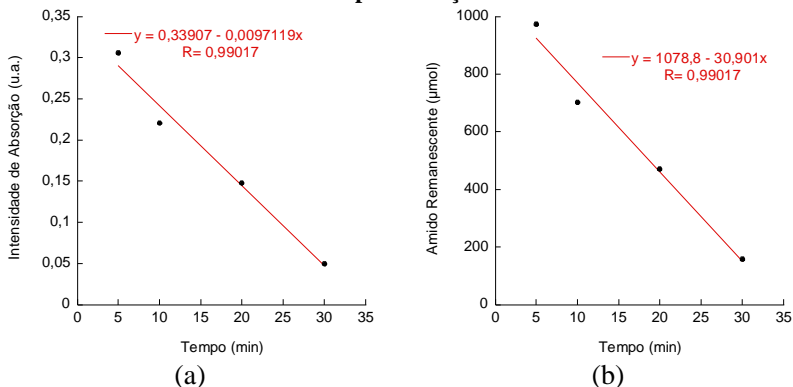


Figura 4.10 Espectro de absorbância do SR 101 na região do visível.

Atividade Enzimática: a atividade enzimática foi determinada a partir de um ensaio colorimétrico, avaliado por espectroscopia de UV-vis.

Figura 4.11 Perfil de (a) intensidade de absorção (b) moles de amido remanescente com o tempo de reação enzimática.

A atividade da enzima foi de $33 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$, enquanto que a atividade específica da enzima calculada foi igual a $839 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de enzima, sendo U definido pela hidrólise de $1 \mu\text{mol}$ de substrato por minuto.

OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS BIODEGRADÁVEIS E MONODISPERSAS

5.1 INTRODUÇÃO

Aplicação de nanopartículas e micropartículas como sistemas de liberação controlada de fármacos já está bem estabelecida na literatura. As vantagens da aplicação de nanopartículas sobre as micropartículas já foram amplamente discutidas. Dentre as principais vantagens de nanopartículas, pode-se citar a possibilidade de administração por diferentes meios, considerável aumento do tempo de circulação sanguínea, melhor distribuição corporal e aumento da biodisponibilidade dos fármacos, devido à facilidade de permear as barreiras celulares (KREUTER, 1996). Apesar da transição gradual de tamanho entre as nanopartículas e micropartículas, fatores fisiológicos, anatômicos e físico-químicos são as principais fontes para as divergências entre as nano e as micropartículas, e.g., distintas aplicações (KOHANE, 2007).

Administração a partir de inalação oral se tornou uma modalidade de tratamento importante no tratamento de doenças pulmonares (ZENG; MARTIN & MARRIOTT, 1995). Esta rotina de administração apresenta vantagens com relação às demais, tais como aumento da concentração de fármaco no local de ação e decréscimo dos possíveis efeitos colaterais (MANCA et al., 2008). Além destas vantagens, apesar de o pulmão e o trato respiratório serem capazes de metabolizar a dose de fármaco liberado, o pulmão apresenta uma grande área superficial absorptiva, a qual permite uma grande quantidade de componentes na circulação sanguínea a taxas consideráveis (BYRON, 1990). Contudo, uma desvantagem significativa que muitos fármacos inaláveis apresentam é a sua curta duração de efeito clínicos, o que requer a administração de pelo menos três a quatro vezes diariamente.

Delinear e preparar um novo tratamento administrado por aerossóis é complexo e algumas variáveis devem ser exploradas. Segundo Hureauux et al. (2009), os sistemas de inalação devem satisfazer os seguintes requisitos: a) as propriedades do fármaco e de seu carreador devem se manter inalteradas durante o processo de nebulização; b) o aerossol deve ser composto de gotas com tamanho na faixa entre 1 a 5 μm de diâmetro aerodinâmico e um período inferior a 15 minutos para se atingir a dose desejada e, c) a solução inalada deve apresentar pH e osmolaridade característicos precisos.

Enfatiza-se que a baixa eficiência de liberação das formulações mais tradicionais de aerossóis se deve a presença de partículas com ta-

manho acima de 5 μm , as quais são retidas na boca e esôfago, direcionadas ao sistema digestivos em vez de os pulmões. Por outro lado, partículas muito pequenas (menores de 0,4 μm , tipicamente conhecidas como nanopartículas) também apresentam baixa eficiência de deposição (BHARATWAJ et al., 2010) por serem facilmente expiradas ao longo da respiração. Dessa forma, o restrito tamanho requerido das partículas representa um importante desafio nesta etapa do trabalho.

A técnica de membrana microporosa já está estabelecida na literatura na obtenção de micropartículas monodispersas, sendo a membrana porosa de fibra de vidro Shirasu (SPG) a mais relatada e utilizada na literatura (BAO et al., 2007). A partir de microscopia eletrônica de varredura, Ito e Makino (2004) comprovaram a obtenção de micropartículas monodispersas a partir de emulsificação com membrana SPG. A partir disto, este trabalho tem como objetivo preparar micropartículas de distribuição de tamanho estreito com uma abordagem fácil e de apenas um passo de emulsificação.

5.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.2.1 Materiais

Poli(L-ácido láctico) (PLLA, Biomer Biopolyesters, Biomer L9000®, $M_n=66500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ e $M_w=145000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, determinados a partir de GPC em clorofórmio; Biomer, Krailing, Alemanha) foi escolhido como polímero e clorofórmio (Acros Organics), como solvente, ambos para a preparação das micropartículas. Lauril sulfato de sódio (SLS, Merck) foi utilizado como surfatante aniônico e Span 80 como surfatante não-iônico. Água destilada foi utilizada no processo e todos os reagentes foram utilizados sem nenhum procedimento de purificação.

5.2.2 Procedimentos Experimentais

Poli(L-ácido láctico) (PLLA) foi escolhido como polímero para a preparação das micropartículas, devido a sua biodegradabilidade. As micropartículas de PLLA foram preparadas por uma técnica de emulsificação seguida de evaporação de solvente, utilizando dois processos diferentes de emulsificação. Para ambos os procedimentos, o PLLA foi previamente solubilizado em clorofórmio por 1 hora a partir de agitação magnética a temperatura ambiente.

O primeiro procedimento consiste em um homogeneizador de alta força de cisalhamento (Ultraturrax) a uma velocidade de 18000 rpm du-

rante 4 min. Diferentes concentrações de PLLA e surfatante foram avaliadas. O efeito de um surfatante lipofílico (Span 80) dissolvido na fase dispersa foi avaliado utilizando este procedimento

O segundo procedimento consiste em um módulo de membrana porosa de fibra de vidro Shirasu (SPG), Figura 5.1. Para a técnica de emulsificação de membrana, membranas hidrofílicas SPG em forma de tubo (10 mm de diâmetro exterior e a espessura de 0,7 mm) e poros de tamanho específico e uniforme (fornecidas por SPG Technology Co. Ltd. (Sadowara, Japão) foram utilizadas, por onde a fase dispersa é pressionada para a fase contínua. A fase dispersa, composta de clorofórmio (2,5 g) e de PLLA, foi armazenada em um recipiente conectado a uma entrada de gás nitrogênio por meio de um medidor de pressão de PG-30-102R-N-ND (COPAL Electronics, Japão). Ao aplicar-se uma pressão adequada, a fase dispersa atravessa a membrana através dos poros (Figura 5.1f), para a fase contínua (Figura 5.1g), constituída por uma solução aquosa de SLS, que foi mantida sob agitação durante a etapa de emulsificação (Figura 5.1e), a fim de destacar individualmente as gotículas formadas na interface entre a membrana e fase contínua.

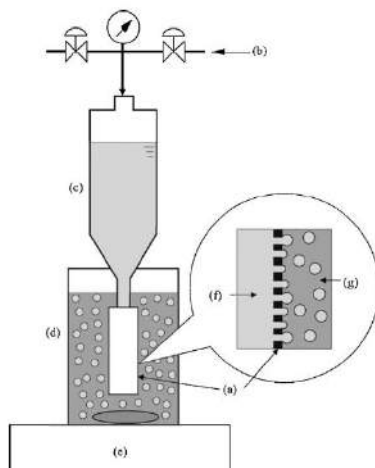
Posteriormente, a evaporação do solvente foi realizada a 40 °C durante a noite utilizando um agitador magnético com velocidade de agitação entre 500 e 750 rpm. Quando utilizada outra temperatura de evaporação de solvente, a temperatura será mencionada ao longo do texto. Para se obter micropartículas monodispersas, membranas com um tamanho médio de poro iguais a 2 e 5 µm foram utilizadas e a uma pressão motriz de 60 e 10 kPa, respectivamente. Após o uso, as membranas foram regeneradas por imersão em clorofórmio, sulfóxido de dimetila e em seguida, a água destilada durante 15 minutos em cada solvente, utilizando um banho de ultrassom.

5.2.3 Caracterização das Micropartículas

A superfície das micropartículas foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) utilizando um microscópio de emissão de campo (LEO (Zeiss) 1530 Gemini, Oberkochen, Alemanha) a uma voltagem de aceleração de 0,5 kV. Geralmente, as amostras foram preparadas diluindo-se as micropartículas em água destilada. Uma gota da amostra diluída foi colocada em placas de sílica e secas sob condições normais de ambiente. Tamanho das micropartículas foi analisado utilizando-se o software de análise de imagem Sizemeter. Diâmetro médio de partícula, o desvio padrão e distribuição de tamanho de partícula fo-

ram determinados a partir de conjuntos de dados de pelo menos 300 medidas.

Figura 5.1 Esquema do sistema experimental utilizado para a preparação das microgotas de emulsão (a) módulo da membrana SPG, (b) alimentação de nitrogênio, (c) reservatório da fase dispersa, (d) reservatório da fase aquosa contínua, (e) agitador magnético, (f) fase dispersa e (g) fase contínua.



Fonte: OH et al. (2011)

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos trabalhos na literatura preparam nanocápsulas e micropartículas utilizando um homogeneizador de alta velocidade ou ultrassom na etapa de emulsificação. Uma série de formulações de micropartículas foi preparada utilizando um homogeneizador de alta velocidade ultraturax a 18000 rpm durante 4 min. Previamente, PLLA dissolvido em 2,5 g de clorofórmio foi emulsificado em 12 g de água utilizando Span 80 e/ou SLS como surfatantes, como apresenta a Tabela 5.1.

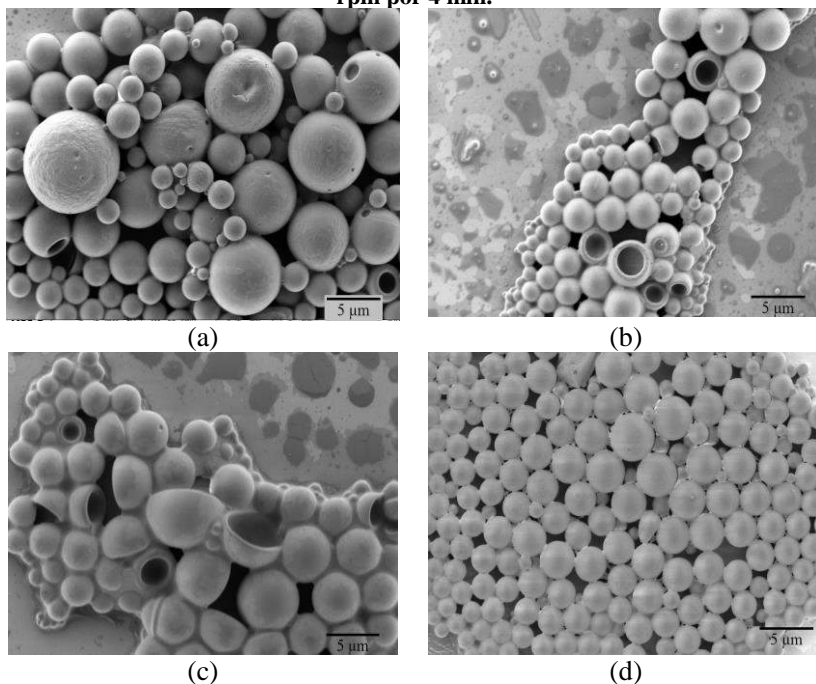
A Figura 5.2 apresenta as imagens das micropartículas obtidas por análises de SEM. A morfologia obtida depende da concentração e tipo de surfatante. Além do surfatante oleoso, Span 80, auxiliar na estabilidade das partículas, também é o responsável pela formação de um núcleo oleoso nas micropartículas, resultando em microcápsulas de PLLA, como pode ser observado em Figura 5.2a, Figura 5.2b e Figura 5.2c.

Tabela 5.1 Formulação das micropartículas obtidas a partir de emulsificação com ultraturrax a 18.000 rpm por 4 min, seguida de evaporação do solvente a 40 °C.

Reagentes		Ref.	PLLA (mg)	SLS (mg)	Span 80 (%) ^a
Clorofórmio (g)	2,5	UT 17	170	38	10
Água (g)	12,0	UT 16	170	18	10
		UT 15	170	18	50
		UT 1	80	18	50
		UT 13	80	18	100
		UT 4-1	40	18	-

a) % mássica com relação ao PLLA.

Figura 5.2 Imagens obtida a partir de análise em SEM das micropartículas (a) UT 16, (b) UT 1, (c) UT 13 e (d) UT 4-1 obtidas usando um ultraturrax a 18.000 rpm por 4 min.



Uma maior concentração de Span 80 resultou em um maior número de microcápsulas, comparando-se Figura 5.2a e Figura 5.2b. Tal fato se deve a separação de fases entre o PLLA e o Span 80 durante a

etapa de evaporação de solvente. Micropartículas preparadas com a formulação UT 4-1 apresentaram morfologia final de microesferas, segundo Figura 5.2d. Todas as micropartículas apresentam uma distribuição larga de tamanho. Já está estabelecido na literatura que controlar o tamanho das partículas preparadas a partir de emulsificação por ultraturrax é muito difícil.

De fato, Gaumet et al. (2007) relataram a dificuldade em obter partículas de PLGA com distribuição estreita de tamanho aplicando-se homogeneizador de alta pressão. A fim de obter uma distribuição de tamanho de partículas monomodal e estreita, os autores propuseram um método de centrifugação seletiva para populações distintas de tamanho diferente. Contudo, de acordo com os autores, a metodologia sugerida não conduziu a resultados satisfatórios.

Diversos trabalhos na literatura apresentam a técnica de emulsificação em membrana SPG como uma abordagem de se obter tamanho homogêneo de partícula. O efeito do tamanho médio dos poros da membrana sobre diâmetro e distribuição de tamanho de micropartículas foi avaliado. Para isso, as membranas com poros médios de 2 e 5 μm foram utilizadas. Além de homogeneidade dos poros, a pressão motriz também é um parâmetro que afeta a distribuição do tamanho das micropartículas. A pressão motriz foi ajustada para 60 kPa e 10 kPa, para os tamanhos de poro iguais a 2 e 5 μm , respectivamente (estes valores foram escolhidos com base em testes preliminares). A Tabela 5.2 apresenta a formulação de micropartículas obtidas com a técnica de membrana SPG.

Microesferas com uma superfície lisa foram obtidas, como pode ser observado na Figura 5.3. A partir de uma comparação entre o MT 2-1 (Figura 5.3a) e MT 5-1 (Figura 5.3b), pode-se observar que o tamanho médio da partícula aumentou de 2,30 para 6,23 μm com o aumento do tamanho médio de poro da membrana SPG de 2 para 5 μm , respectivamente.

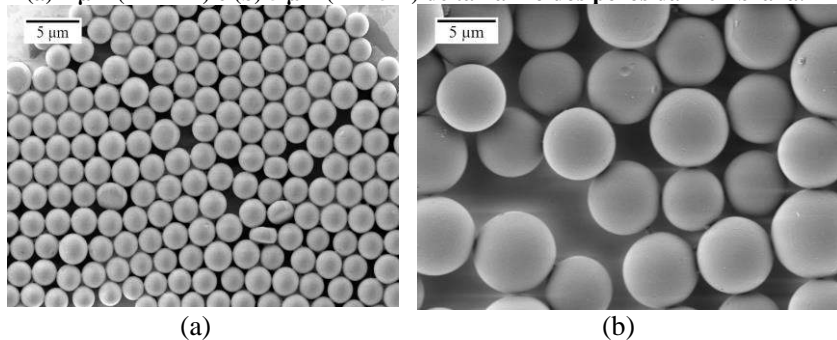
O tamanho das partículas foi muito semelhante ao tamanho dos poros da membrana. Os resultados obtidos foram de acordo com os resultados apresentados por Vladisavljević et al. (2006). Os autores variaram o tamanho médio dos poros da membrana de 5,4 até 20,3 μm e observaram que, após a emulsificação direta, a razão entre o tamanho médio de partícula e o tamanho médio dos poros foi constante e independente da dimensão média do poro.

Tabela 5.2 Formulação de micropartículas obtidas pela técnica de membrana SPG, seguida de evaporação do solvente.

Reagentes	MT 2-1 ^a	MT 5-1 ^b	MT 5-4 ^b	MT 5-11 ^b
PLLA (mg)	80	80	40	40
Clorofórmio (g)	2,50	2,50	2,50	2,50
SLS (mg)	18	18	18	30
Água (g)	12,0	12,0	12,0	12,0
Etapa de Emulsificação				
P _{Motriz} (kPa)	60	10	10	10
V _{Agitação} (rpm)	500	750	750	750
Etapa de Evaporação de Solvente				
Temperatura (°C)	40	40	40	40
Diâmetro (µm)	2,30	6,23	4,90	4,87

Emulsificação pela técnica de emulsificação de membrana utilizando uma membrana hidrofílica de tamanho de poro igual a (a) 2 µm e (b) 5 µm.

Figura 5.3 Micropartículas de PLLA obtidas a partir da técnica de membrana (a) 2 µm (MT 2-1) e (b) 5 µm (MT 5-1) de tamanho dos poros da membrana.



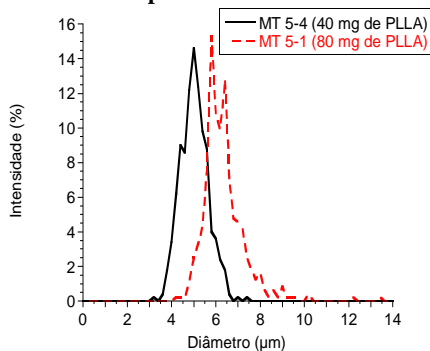
Enfatiza-se que a razão entre o tamanho médio de partícula e o tamanho médio de poro pode apenas ser mantida constante uma vez que as condições de operação sejam otimizadas. Neste caso, a pressão motriz e velocidade de agitação da fase contínua durante a etapa de emulsificação foram adaptadas de acordo com o tamanho dos poros da membrana utilizada (Tabela 5.2). Geralmente, maior o tamanho de poro da membrana, menor a pressão motriz necessária e mais alta a velocidade de agitação da fase contínua para desprender as microgotículas formadas da parede externa da membrana SPG para a fase contínua.

Para garantir o despreendimento regular das gotas formadas nos poros, tensão de cisalhamento foi aplicada na interface entre a membrana e fase contínua, utilizando um agitador magnético. Já foi relatado que na membrana de emulsificação a velocidade de agitação da fase contínua tem um efeito significativo sobre o tamanho e distribuição do tamanho das gotículas (OH et al., 2011).

Foi observado que, para membranas com tamanho de poro igual a 5 μm , a velocidade de agitação é um parâmetro crítico para obtenção de partículas estáveis e monodispersas. Enquanto que para o tamanho de poro da membrana igual a 2 μm , a velocidade de agitação foi de 500 rpm, para o tamanho de poro igual a 5 μm , foi necessário aumentar para 750 rpm. Este fato pode estar relacionado ao aumento da força de inércia associada ao maior tamanho de partícula. De acordo com Nazir et al. (2010), em emulsificação com fluxo cruzado, as forças que atuam sobre a formação de gotículas são principalmente a força de tensão interfacial (a qual mantém a gota ligada ao poro da membrana) e a força de cisalhamento (promovida pela agitação da fase contínua, a qual tenta remover a gota). No entanto, no caso de grandes gotículas ($> 10 \mu\text{m}$), também as forças de flutuação e de inércia precisam ser considerados.

A concentração de PLLA na fase dispersa também tem um papel importante ao utilizar a técnica de emulsificação por membrana. A quantidade de PLLA foi variada de 80 a 40 mg, MT 5-4 e MT 5-1, respectivamente. Observou-se que o diâmetro médio de partícula diminuiu com a redução da quantidade de PLLA, de 6,23 para 4,93 μm , respectivamente. Ma et al. (1999) também estudaram o efeito da concentração de polímero PLA sobre o diâmetro da partícula, utilizando uma membrana SPG com um tamanho médio de poro de 5,2 μm , diclorometano como fase dispersa e álcool laurílico, como co-surfatante. Os autores observaram que os pequenos incrementos na concentração PLA reduziram o diâmetro da partícula. A diminuição do tamanho das partículas foi atribuída pelos autores para a maior viscosidade da fase dispersa. Quando a viscosidade da fase dispersa aumenta, o fluxo da fase no interior dos poros da membrana torna-se mais lento, conseqüentemente, o tamanho das gotas diminui. Contudo, comparando-se os resultados de tamanho médio das partículas MT 5-1 e MT 5-4, observa-se um aumento do diâmetro das partículas com o aumento da concentração de PLLA. A Figura 5.4 apresenta as distribuições de tamanho de partícula.

Figura 5.4 Efeito da concentração de PLLA sobre a distribuição do diâmetro das partículas.



Acredita-se que tal aumento de diâmetro pode estar associado ao processo de evaporação do solvente. Apesar da relação, maior viscosidade da fase dispersa, menor o tamanho das gotas, durante o processo de evaporação de solvente, as gotas apresentam maior concentração de PLLA, o que as tornam maiores quando comparado a micropartículas com menor concentração de PLLA.

Durante o processo de formação de gota, as moléculas de surfatante adsorvem na interface entre fase dispersa e água recém-formada e reduz a tensão interfacial, assim, facilitando a formação de gotas. A taxa de transferência de moléculas de surfatante da solução para a interface fase dispersa-água recém-formada, em parte, depende do fluxo de fase contínua (OH et al., 2011). Com um aumento na quantidade de SLS de 18 mg para 30 mg, não foi observada efeito tanto nos tamanhos médios de partículas, 4,90 µm e 4,87 µm, respectivamente, quanto nas distribuições de tamanho de partículas, conforme Figura 5.5. A Figura 5.6 apresenta imagens de SEM de micropartículas obtidas com uma quantidade diferente de surfatante na fase contínua e velocidade de agitação igual a 750 rpm, as quais corroboram com os resultados apresentados na figura anterior.

Este fato indica que a menor quantidade de surfatante (18 mg, MT 5-4) utilizada foi suficiente para recobrir toda a superfície da partícula para estabilizar a gota. Portanto, o tamanho das gotas foi controlado pelas condições de emulsificação, tais como, tamanho dos poros da membrana, força motriz (pressão) e velocidade de agitação da fase contínua.

Figura 5.5 Efeito da concentração de surfatante na fase contínua sobre a distribuição do diâmetro das partículas.

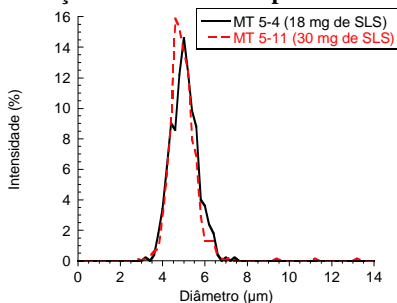
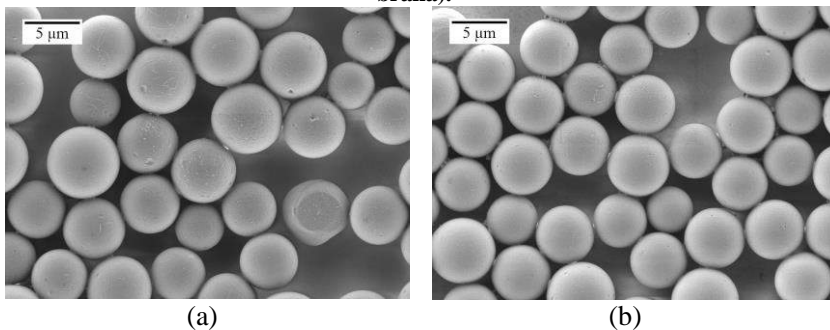


Figura 5.6 Efeito da concentração de surfatante. Comparação entre micropartículas de PLLA (a) MT 5-4 e (b) MT 5-11 (com uma maior quantidade de SLS), obtida pela técnica de membrana (5 µm de tamanho de poro da membrana).



5.4 CONCLUSÕES

Preparação de micropartículas de PLLA usando tanto uma técnica convencional de emulsificação quanto a técnica de membrana SPG foi investigada neste trabalho. Apesar de muitos esforços, a partir da técnica de emulsificação por ultraturrax, micropartículas de natureza multidispersas foram obtidas. A técnica de emulsificação por membrana SPG resultou em micropartículas esféricas e monodispersas, confirmado por imagens de microscopia eletrônica de varredura. Foi observado que o tamanho médio das partículas diminuiu com a diminuição do tamanho de poro da partícula. E a razão entre o tamanho médio de partícula e o tamanho médio de poro pode ser mantida constante uma vez que as condições de operação sejam otimizadas para as características da membrana utilizada. Escolhendo condições de operação apropriadas, micropartí-

culas monodispersas de PLLA foram obtidas a partir da técnica de emulsificação por membrana SPG seguida por evaporação de solvente.

MICROPARTÍCULAS BIODEGRADÁVEIS E MULTICOMPARTIMENTADAS

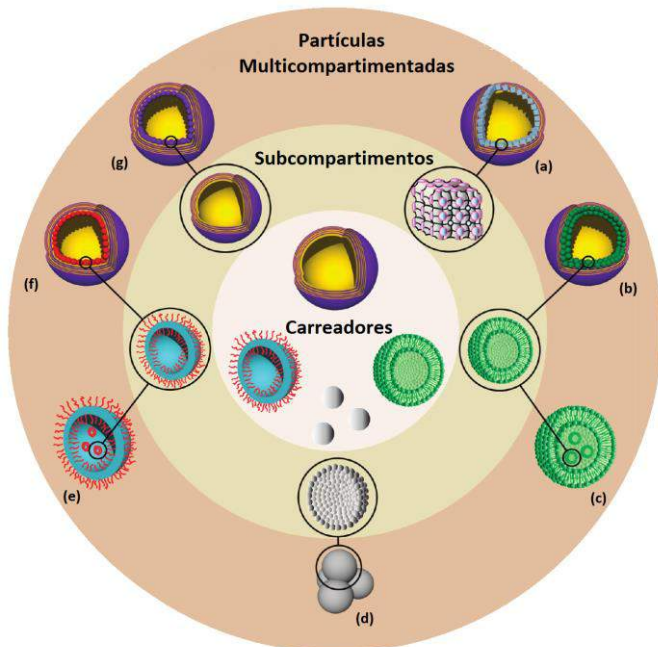
6.1 INTRODUÇÃO

Partículas multicompartmentadas, inspirada pela natureza, têm recebido considerável esforços para a sua elaboração e síntese. Arquiteturas multicompartmentadas como vesossomos (Figura 6.1c), composto de lipossomos-em-lipossomos (AL-JAMAL & KOSTARELOS, 2007), polimerossomos ((Figura 6.1e, polimerossomos-em-polimerossomos) (CHRISTIAN et al., 2009) e capsossomos (lipossomos-em-cápsulas poliméricas, (Figura 6.1b) (CHANDRAWATI et al., 2009) são os exemplos bem sucedidos encontrados na literatura aplicados como carreadores de fármacos e microreatores.

Devido a habilidade de se organizar espontaneamente, lipossomos e copolímeros em bloco com caráter anfifílico (polimerossomos) representam as matrizes comumente investigadas no desenvolvimento de sistemas multicompartmentados. Com estes dois exemplos, a técnica camada-por-camada (layer-by-layer, LbL) é amplamente explorada, a qual se baseia na deposição sequencial de material sobre uma partícula precursora, seguida de sacrifício do núcleo (CHANDRAWATI et al., 2011; CHANDRAWATI et al., 2009; STÄDLER et al., 2009). Atualmente, a utilização de uma partícula precursora para o núcleo sacrificado vem sendo também investigada com polímeros com outro tipo de estrutura molecular na preparação de partículas com múltiplos compartimentos (KULYGIN et al., 2010, COSTA et al., 2013).

Poucos estudos foram realizados utilizando diferentes técnicas no desenvolvimento de sistemas multicompartmentados. Com o processo convencional de camada-por-camada, estruturas multilamelares podem ser obtidas. No entanto, explorando a técnica de dupla emulsão, uma nova classe de polimerossomos foram preparados utilizando um equipamento microfluidizador, seguido da técnica de evaporação de solvente (LORENCEAU et al., 2005; SHUM et al., 2011). Diferentes morfologias de polimerossomos foram apresentadas. A arquitetura foi composta de múltiplas gotas que ao grudarem entre si após a evaporação do solvente, porém sem coalescência, mantiveram suas interfaces, resultando em uma estrutura tipo espuma. Enfatiza-se que com esta técnica, as múltiplas gotas não se encontraram limitadas por uma casca maior externa, como esquematizado na Figura 6.1d.

Figura 6.1 Exemplos de carreadores (circulo interno) e suas subunidade (circulo médio) utilizados na elaboração de partículas multicompartimentadas (circulo externo). Em sentido horário, começando do topo, os carreadores são cápsulas poliméricas, lipossomas, partículas coloidais e polimerossomos. Cápsula polimérica subcompartmentalizada com (a) cubossomos ou (b) lipossomos (capsossomos). (c) Lipossomos em lipossomos (vesossomos), (d) colidossomos multicompartimentados, (e) polimerossomos em polimerossomos, Cápsulas poliméricas subcompartmentalizadas com (f) polimerossomos ou (g) cápsulas poliméricas).



Fonte: adaptado de Chandrawati et al. (2011).

A casca externa apresenta um papel de grande importância, pois fornece uma primeira barreira contra a degradação dos compartimentos internos e diminui a velocidade de liberação do fármaco (BOYER & ZASADZINSKI, 2008; PALEOS et al., 2013). Estruturas subcompartmentalizadas delimitadas por uma partícula maior tem maiores possibilidades de elaboração, comparadas às partículas de um único compartimento: os compartimentos internos podem apresentar composição diferente entre os mesmos e, entre a casca externa maior (PALEOS et al., 2013), como foi apresentado na Figura 6.1.

Poucos trabalhos objetivaram o desenvolvimento de sistemas subcompartimentados com nanopartículas poliméricas. Bharatwaj et al. (2010) incorporou nanocápsulas de poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo) de tamanho de aproximadamente 240 nm em micropartículas de copolímero quitosana-co-poli(ácido láctico) utilizando uma metodologia modificada de emulsificação seguido de difusão do solvente. No entanto, os resultados obtidos pelos autores apresentaram que as micropartículas são polidispersas em sua natureza. Dependendo da aplicação, partículas com estreita distribuição de tamanho são requeridas. Por exemplo, na aplicação para sistemas de carreamento de fármaco pulmonar a partir de administração por inalação oral, como proposto por Bharatwaj et al. (2010), partículas de tamanho entre 400 nm e 5 μm são necessárias, caso contrário, as partículas podem não conseguir atingir o pulmão, alvo de ação. No caso de carreamento de fármacos para o pulmão, o tamanho das partículas tem grande influência (KLEINSTREUER; ZHANG & DONOHUE, 2008).

Técnica de emulsificação por membrana porosa é conhecida por gerar gotas monodispersas que podem ser posteriormente polimerizadas ou solidificadas a partir de evaporação de solvente, resultando em uma distribuição de partículas estreita (ITO & MAKINO, 2004). Neste trabalho, está sumarizado o desenvolvimento de partículas multicompartimentadas monodispersas como uma plataforma para sistemas de liberação controlada de fármacos baseado em nanopartículas como subunidades. Tentativas foram realizadas com a finalidade de microencapsular nanocápsulas de amido reticulado em micropartículas de poli(ácido láctico) (PLLA). Para tanto, as subunidades foram compostas de nanocápsulas de amido reticulado com núcleo aquoso preparadas a partir da técnica de miniemulsão inversa, as quais exibem permeabilidade controlável. A microencapsulação foi realizada em micropartículas de PLLA a partir da combinação do processo de emulsificação em membrana SPG, seguida da evaporação de solvente.

6.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

6.2.1 Materiais

Poli(L-ácido láctico) (PLLA, Biomer Biopolyesters, Biomer L9000®, $M_n = 66500 \text{ g.mol}^{-1}$ e $M_w = 145000 \text{ g.mol}^{-1}$, determinados a partir de GPC em clorofórmio; Biomer, Krailing, Alemanha) foi escolhido como polímero e clorofórmio (Acros Organics) como solvente, ambos para a preparação das micropartículas. Lauril sulfato de sódio

(SLS, Merck) foi utilizado como surfatante aniônico. Sulforodamina 101 (SR 101, BioChemica, Aldrich), um marcador fluorescente foi previamente encapsulado nas nanocápsulas de amido reticulado. Água destilada foi utilizada no processo e todos os reagentes foram utilizados sem nenhum procedimento de purificação.

Para a síntese de oligômeros de PLLA, L-lactídeo (Sigma Aldrich) foi previamente recristalizado uma vez em tolueno, todos os demais reagentes foram utilizados sem nenhum procedimento de purificação. 1,4 – butanodiol (BD) e Sn(II)2-etilhexanoato usados, respectivamente, como co-iniciador e catalisador na polimerização de abertura de anel foram adquiridos (Sigma Aldrich). A poliadição de PLLA oligomérico foi realizada aplicando 2,4- tolueno diisocianato (TDI, Sigma Aldrich) e clorofórmio. Água destilada foi utilizada em todos os procedimentos.

6.2.2 Procedimentos Experimentais

6.2.2.1 SÍNTESE DE NANOCÁPSULAS DE AMIDO RETICULADO

As nanocápsulas (NCs) de amido reticulado foram previamente sintetizadas a partir de polimerização por etapa segundo a formulação TDI 3 (160 mg de TDI), como apresentado no Capítulo III. Para a encapsulação da sulforodamina 101, a água que compõe a fase dispersa foi substituída por uma solução aquosa contendo 0,06 % em massa de SR 101, como apresentado no Capítulo IV.

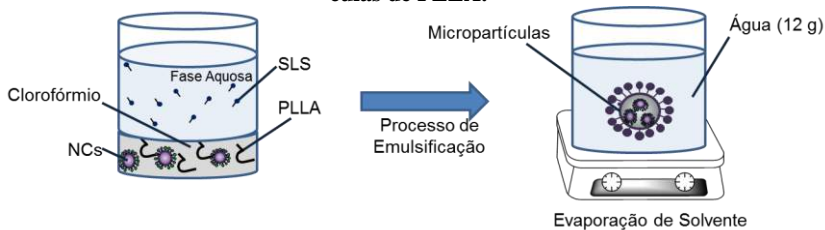
Uma série de reações, nas quais o ciclohexano foi parcialmente substituído por clorofórmio, foi realizada a fim de possibilitar a enxertia de PLLA oligomérico em nanocápsulas de amido reticulado e, portanto, a solubilização do oligômero na fase contínua. Para tanto, os volumes de fase contínua e da solução de TDI foram mantidos constantes. A mistura foi composta por uma razão volumétrica igual a 2:1 entre ciclohexano e clorofórmio. A miniemulsão foi obtida como descrita anteriormente, exceto a reação, a qual ocorreu por 24 horas a 25 °C para evitar a evaporação de clorofórmio que compõe a fase contínua, mantendo dessa forma o teor de sólidos constante durante todo o tempo de reação.

6.2.2.2 MICROENCAPSULAÇÃO DE NCS DE AMIDO EM MICROPARTÍCULAS DE PLLA

As micropartículas de PLLA foram preparadas de acordo com os procedimentos de emulsificação e evaporação de solvente apresentados

no Capítulo V. Para o procedimento de emulsificação, tanto o homogeneizador de alta força de cisalhamento (ultraturrax), quanto o módulo de membrana porosa de fibra de vidro Shirasu foram utilizados. Para a microencapsulação das nanocápsulas, as mesmas foram adicionadas à fase dispersa como descrito a seguir. As nanocápsulas dispersas em ciclohexano foram previamente lavadas a partir de centrifugação durante 50 min a 5600 rpm para retirada do surfatante livre e redispersas em clorofórmio com o auxílio de um banho de ultrassom por 30 min. A fase dispersa foi composta de NCs de amido reticulado e PLLA previamente dissolvido em clorofórmio, como apresenta o esquema na Figura 6.2.

Figura 6.2 Esquema do processo de microencapsulação de NCs em micropartículas de PLLA.



6.2.2.3 COMPATIBILIZAÇÃO DAS NCs DE AMIDO COM MICROPARTÍCULAS DE PLLA

A fim de melhorar a compatibilização entre as nanocápsulas de amido (NCs) e de micropartículas de PLLA, cadeias de PLLA oligomérico foram enxertadas na superfície das nanocápsulas.

Síntese de oligômeros de PLLA: A síntese de cadeias de PLLA oligoméricos a partir de L-lactídeo foi realizada como descrito por Korhonen et al. (2001), aplicando-se 1,4 - butanodiol (BD) como iniciador e Sn (II) 2 etilhexanoato como catalisador. O monômero foi alimentado ao reator com uma razão molar entre L-lactídeo e BD de 1:10 e 0,05 % molar de Sn (Oct)₂ relacionado ao monômero. A reação ocorreu a 160 °C durante 3 horas em atmosfera inerte promovida com alimentação constante de nitrogênio. O produto final foi dissolvido em aproximadamente 20 ml de clorofórmio quente (60 °C). A solução de polímero foi gotejada em metanol (26 g) com agitação magnética a 50 °C. A solução turva resultante foi precipitada em 250 ml de pentano gelado em agitação magnética. A fase líquida foi decantada e o produto precipitado foi redissolvido em 25 ml de clorofórmio. A solução foi transferida para um balão de fundo redondo, seco e o solvente foi remo-

vido por meio de extração a vácuo com o auxílio de um rotaevaporador. O polímero foi adicionalmente seco em uma estufa a vácuo durante 48 horas a temperatura ambiente.

Síntese de oligômeros de PLLA-NCO-terminado: A reação de polimerização de oligômeros de PLLA com TDI foi realizada na presença de excesso de TDI (razão molar de 1:5 entre PLLA e TDI). A reação foi realizada a 60 ° C, utilizando clorofórmio como solvente (proporção em massa de 1:10 de PLLA e clorofórmio) durante 24 horas. Após a polimerização, o PLLA-NCO-terminado foi seco em uma estufa a vácuo durante 48 horas a temperatura ambiente.

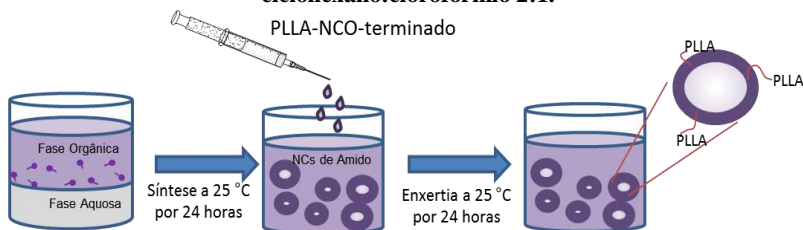
Precipitação/Enxertia de PLLA na Superfície de NCs: Após a síntese de nanocápsulas em uma mistura de ciclohexano: clorofórmio (2:1) como fase contínua, a 25 ° C durante 24 horas, PLLA-NCO-terminado previamente dissolvido nesta mistura com a mesma razão volumétrica, foi gotejado na miniemulsão resultante e deixou-se reagir durante 24 horas a 25 ° C, como apresenta a Figura 6.3.

6.2.3 Caracterização

6.2.3.1 TAMANHO E MORFOLOGIA DE PARTÍCULA

A morfologia das nanocápsulas e a superfície de micropartículas foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) utilizando um microscópio de emissão de campo (LEO (Zeiss) 1530 Gemini, Oberkochen, Alemanha) a uma voltagem de aceleração de 0,5 kV. Geralmente, as amostras foram preparadas diluindo-se as nanocápsulas em ciclohexano ou em clorofórmio e as micropartículas em água destilada. Em seguida, uma gota de amostra foi colocada em placas de sílica e secas sob condições normais de ambiente.

Figura 6.3 Esquema do processo de enxertia de oligômeros de PLLA-NCO-terminado em NCs de amido sintetizadas em uma fase contínua composta por ciclohexano:clorofórmio 2:1.



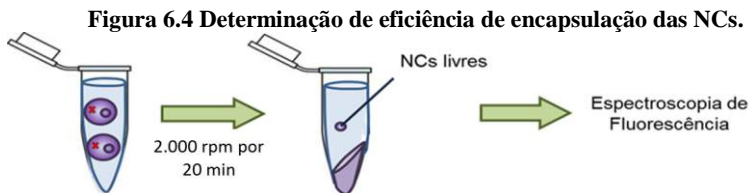
6.2.3.2 COMPOSIÇÃO DA CASCA POLIMÉRICA

Espectroscopia por transformada de Fourier por infravermelho (FT-IR) foi realizada para avaliar a reação entre o TDI e hidroxilas do amido durante a polimerização em miniemulsão inversa. A amostra previamente liofilizada durante 24 horas a -60°C , sob pressão reduzida, foi pressionado com KBr para formar um pellet. Espectros entre 4000 e 400 cm^{-1} foram obtidos usando um espectrômetro Bruker IFS 113V.

6.2.3.3 EFICIÊNCIA DE APRISIONAMENTO DE NCs EM MICROPARTÍCULAS

A quantidade de NCs encapsuladas foi estudada na presença do marcador fluorescente hidrofílico (SR 101). As nanocápsulas foram previamente preparadas como descrito anteriormente utilizando uma solução aquosa a 0,06 % em massa de SR 101, como fase dispersa. Após os processos de emulsificação da fase de PLLA com NCs usando a técnica de membrana SPG e de evaporação do solvente, o volume final da emulsão foi verificado e as micropartículas foram sedimentadas por centrifugação a 2000 rpm durante 20 min. A mesma quantidade de nanocápsulas preparadas com SR 101 e redispersa no mesmo volume final da solução aquosa de SLS por meio de um ultrassom acoplado a uma ponteira (1 minuto a 70 % da amplitude utilizando um Branson Sonifier W-450-digital, resfriado com banho de gelo, ausente de micropartículas PLLA) foi utilizado como amostra controle. O sinal de fluorescência da amostra controle foi definido como 100 %. A quantidade de nanocápsulas não aprisionadas foi calculada indiretamente relacionando o sinal de fluorescência do sobrenadante obtido a partir da amostra e da amostra controle, ambos utilizando um espectrômetro de fluorescência (Nano-Drop ND-3300, PEQLab), Figura 6.4. Tal procedimento somente foi utilizado uma vez que a relação entre concentração de nanocápsulas e o sinal de fluorescência foi linear, como apresentado em Informações de Suporte.

Para visualizar e identificar a localização de NCs dentro das micropartículas, análise de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) foram realizadas, depositando as micropartículas em uma lâmina para microscópio. Uma objetiva de imersão em óleo, Leica HCX PL APO CS 1,4/100 \times foi utilizada acoplada de uma linha de argônio com potência menor que $100\text{ }\mu\text{W}$ a 561 nm.



6.2.3.4 PROPRIEDADES DOS OLIGÔMEROS SINTETIZADOS.

As estruturas do PLLA e PLLA-NCO-terminado sintetizados foram avaliadas por meio de análise de ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-NMR}$). As amostras foram dissolvidas em clorofórmio- d_1 (Fluka, grau de deuteração não inferior a 99,8 %) em tubos de NMR de 5 mm a temperatura ambiente. Os espectros de NMR foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance funcionando a 250 MHz para prótons.

Massas molares médias (M_n e M_w) e distribuições de massa molar (IPd) foram determinados a partir de padrões de poliestireno, por cromatografia de permeação em gel (GPC).

Para confirmar a funcionalização de PLLA com grupos NCO, FT-IR líquido foi executado. PLLA e PLLA-NCO-terminado foram previamente dissolvidos em clorofórmio, e a análise foi realizada colocando uma gota de solução em placas de KBr. Espectras entre 4000 e 400 cm^{-1} foram obtidos usando um espectrômetro IFS 113V Bruker.

A fim de determinar o teor de NCO em PLLA-NCO-terminado, titulação inversa de dibutilamina foi realizada, de acordo com o método de Spiegelberger. O polímero sintetizado (0,5 g) foi dissolvido em 50 ml de isopropanol, 50 ml de xileno e 5 ml de uma solução 0,5 molar de dibutilamina em xileno. Após a adição de uma solução de etanol saturada de azul de bromofenol como indicador, a mistura foi titulada com uma solução 0,5 molar de ácido clorídrico até alterar de azul para amarelo. Em paralelo, um ensaio em branco foi realizado. O teor de NCO foi calculado como apresenta a seguir:

$$NCO[\%] = \frac{(A - B) * 42,0 * D}{C} * 100$$

A é o volume de HCl consumido para a titulação em branco e B é o volume de HCl necessário para titulação de amostra. C representa o peso da amostra e D é a concentração molar do ácido clorídrico.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As nanocápsulas foram previamente sintetizadas com um marcador fluorescente hidrofílico, SR 101, permitindo assim determinar a localização das NCs de amido no interior das micropartículas. Nota-se que, o encapsulamento de um marcador fluorescente também representa a capacidade de encapsular fármacos hidrofílicos. As micropartículas foram preparadas de acordo com a Tabela 6.1.

Tabela 6.1 Formulação de micropartículas contendo as nanocápsulas de amido reticulado.

Referência	NCs (mg)	PLLA (mg)	SLS (mg)	Span 80 (%) ^a
UT 15	20	160	18	100
UT 13	20	80	18	100
UT 1	10	80	18	50
UT 4-2	70	40	30	-

a) % mássica com relação ao PLLA.

A encapsulação das nanocápsulas foi realizado dispersando as NCs em uma solução de PLLA previamente dissolvido em clorofórmio. Análise de diâmetro médio por espalhamento de luz dinâmico indicou um inchamento das nanocápsulas quando dispersas em clorofórmio. O diâmetro médio das nanocápsulas aumentou de 180 nm, em ciclohexano, para 220 nm, em clorofórmio. A integridade das NCs neste solvente foi investigada por redispersão das nanocápsulas em clorofórmio e as imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão estão apresentadas na Figura 6.5.

As nanocápsulas foram aprisionadas em micropartículas de PLLA seguindo duas metodologias. A primeira consistiu em emulsionar a fase dispersa (PLLA, NCs, 2,5 g de clorofórmio e Span 80, quando o último foi aplicado) na fase contínua (12 g de água e SLS) utilizando um homogeneizador de alta velocidade (18000 rpm por 4 min), segundo a Tabela 6.1.

A Figura 6.6 apresenta um estudo comparativo qualitativo entre as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) das micropartículas UT-15 com e sem NCs de amido, avaliando o efeito do surfatante hidrofóbico Span 80.

Figura 6.5 Imagem de SEM das NCs (a) dispersas em ciclohexano (b) redispersas em clorofórmio.

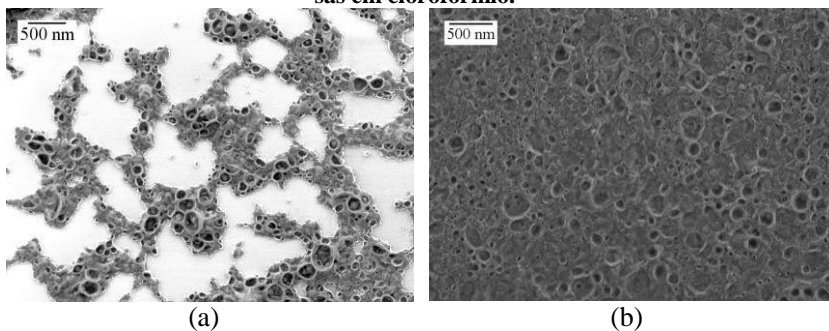
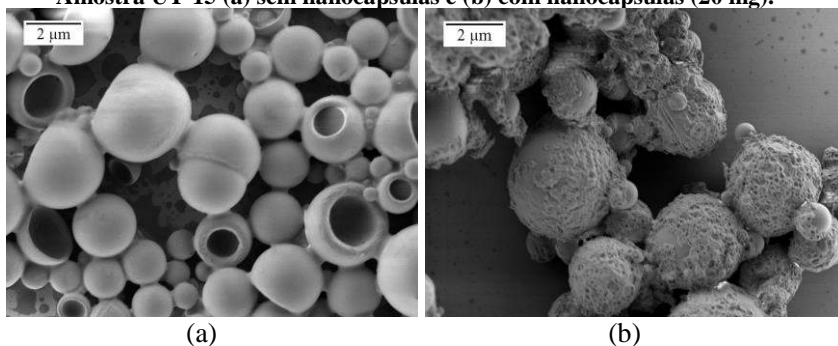


Figura 6.6 Estudo comparativo de morfologia de micropartículas de PLLA. Amostra UT-15 (a) sem nanocápsulas e (b) com nanocápsulas (20 mg).

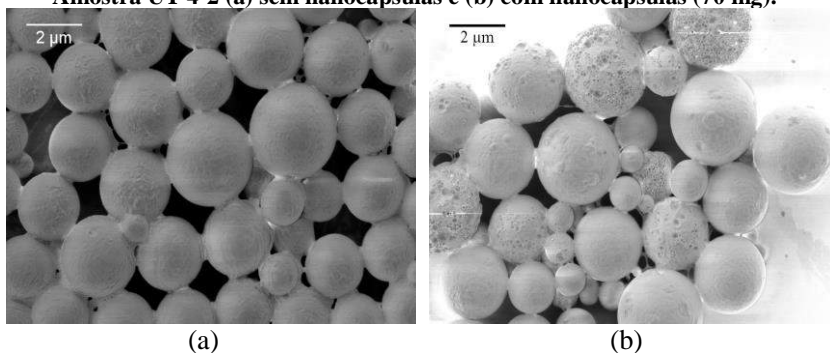


Micropartículas de PLLA com morfologia de cápsula foram obtidas, como observa-se na Figura 6.6a. Acredita-se que, além de o Span 80 estabilizar as microgotas de PLLA/clorofórmio, este também é responsável pela formação do núcleo das micropartículas. Durante a etapa de evaporação do solvente, ocorre a separação de fases entre o surfatante hidrofóbico e o polímero, formando um núcleo oleoso e líquido. Contudo, devido ao vácuo formado ao longo das análises de SEM, algumas microcápsulas ocas foram observadas.

Micropartículas com morfologia esférica foram obtidas em formulações com nanocápsulas de amido reticulado Figura 6.6b. Sabendo-se que uma nova interface foi formada entre nanocápsulas e PLLA e, nanocápsulas e água, o Span 80 se encontra adsorvido nestas novas interfaces. Não havendo surfatante hidrofóbico livre, não há a formação de núcleo oleoso, resultando em uma morfologia de microesferas.

Apesar de esforços realizados com diversas formulações, as micropartículas apresentaram distribuição de tamanho de natureza polidispersa a partir da técnica de emulsificação por homogeneizador de alta velocidade, previamente no Capítulo V, Figura 6.7. Por outro lado, foi observado que as micropartículas com NCs não apresentaram uma superfície lisa. A partir da Figura 6.7b, acredita-se que a NCs de amido sejam responsáveis pela superfície rugosa observada e se localizam na superfície das micropartículas de PLLA.

Figura 6.7 Estudo comparativo de morfologia de micropartículas de PLLA. Amostra UT 4-2 (a) sem nanocápsulas e (b) com nanocápsulas (70 mg).



Com o objetivo de se obter micropartículas com distribuição de tamanho monodispersa, técnica de emulsificação por membrana porosas SPG foi utilizada. A Tabela 6.2 apresenta as formulações das emulsões preparadas com dois tamanhos distintos de poro de membrana, 2 e 5 µm.

Micropartículas foram primeiramente preparadas a partir da técnica membrana SPG com membrana de tamanho de poro igual a 2 µm (MT 2-2). Imagem obtida por SEM de micropartículas MT 2-2 é apresentada na Figura 6.8. Micropartículas MT 2-2 apresentam morfologia esférica, distribuição de tamanho monodispersa e superfície lisa. Contudo, análise de eficiência de encapsulação das nanocápsulas a partir de espectroscopia de fluorescência não detectou sinal de SR 101. Vários parâmetros diferentes foram variados, como por exemplo, diminuição da pressão motriz 60-20 kPa, mas nenhum destes testes conduziram a resultados satisfatórios e não foram apresentados.

A partir destes resultados é possível afirmar que, devido ao tamanho relativamente pequeno dos poros da membrana (2 µm) e em comparação com o tamanho das nanocápsulas (220 nm), associado ao caráter

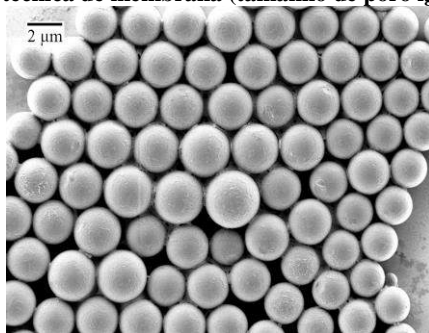
hidrofílico tanto da membrana quanto das nanocápsulas, possivelmente as nanocápsulas foram retidas na parede interna da membrana e não passaram através da membrana, ou por afinidade, ou por porosidade. Dessa forma, afirma-se que o tamanho médio de poro da membrana desempenha um papel importante na eficiência da encapsulação de nanocápsulas em micropartículas sólidas.

Tabela 6.2 Formulação de micropartículas contendo as nanocápsulas de amido reticulado.

Reagentes	MT 2-2 ^a	MT 5-3 ^b	MT 5-5 ^b	MT 5-8 ^b	MT 5-16 ^b
NCs (mg) ^c	210	175	350	70	70
PLLA (mg)	80	80	40	40	40
SLS (mg)	18	18	18	30	30
Etapa de Emulsificação					
P _{Motriz} (kPa)	60	10	10	10	10
V _{Agitação} (rpm)	500	750	750	750	750
Etapa de Evaporação de Solvente					
T (°C)	40	40	40	40	55
V _{Agitação} (rpm)	500	750	750	750	750

Emulsificação pela técnica de emulsificação de membrana utilizando uma membrana hidrofílica de tamanho de poro igual a (a) 2 μm e (b) 5 μm . c) O teor de sólidos da NCs dispersas em ciclohexano igual a 3,5 % em massa.

Figura 6.8 Imagem de SEM das NCs aprisionadas em micropartículas MT 2-2 obtida pela técnica de membrana (tamanho de poro igual a 2 μm).

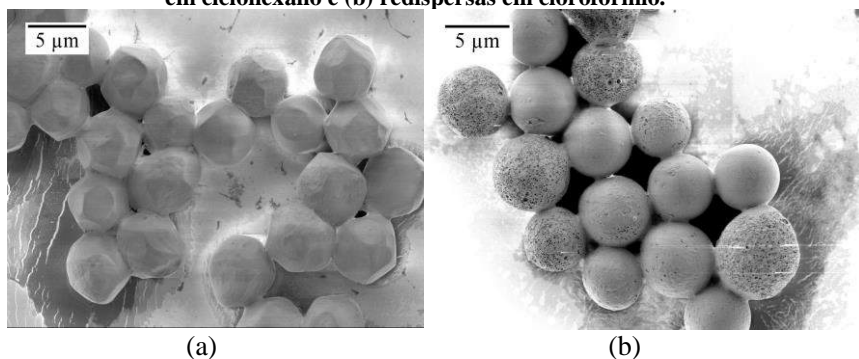


A microencapsulação de NCs foi avaliada utilizando uma membrana de tamanho de poro de 5 μm e de acordo com a série de formulações apresentada na Tabela 6.2. Observou-se que a introdução de nano-

cápsulas para a fase dispersa resultou em micropartículas polidispersas, ou até mesmo os agregados foram observados (MT 5-5). Este fato pode ser devido às duas superfícies interfaciais novas criadas entre micropartículas de PLLA e nanocápsulas e, entre água e nanocápsulas, as quais adsorvem moléculas de surfatante, por conseguinte, menor quantidade de surfatante está disponível para a estabilização da micropartícula. Assim, uma maior concentração do agente tensoativo solúvel em água foi necessária para obter micropartículas estáveis e monodispersas (MT 5-8).

O procedimento de adição das nanocápsulas na fase dispersa da emulsão pode afetar a morfologia final das micropartículas. A Figura 6.9 apresenta uma comparação entre as imagens obtidas em SEM de micropartículas MT 5-8 com nanocápsulas dispersas em ciclohexano (Figura 6.9a) e com nanocápsulas redispersas em clorofórmio (Figura 6.9b).

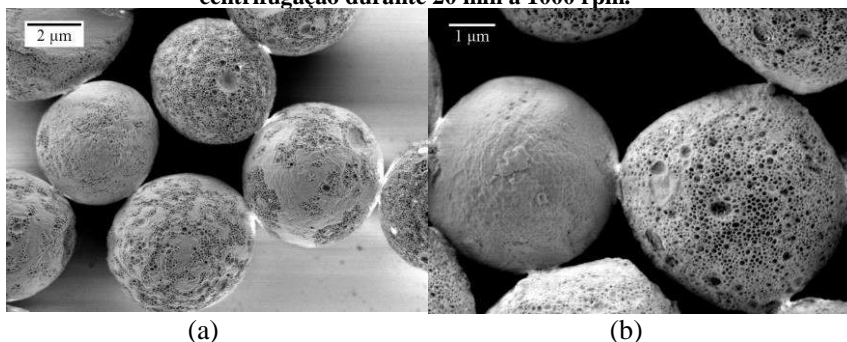
Figura 6.9 Imagens de SEM de micropartículas MT 5-8 obtidas pela técnica de membrana SPG com NCs de amido adicionadas a fase dispersa (a) dispersas em ciclohexano e (b) redispersas em clorofórmio.



Observa-se que as micropartículas apresentam natureza monodispersa e o diâmetro médio aparentemente não foi afetado com a adição de NCs nestas condições. Contudo, a partir da Figura 6.9a é possível notar a importância em se redispersar as micropartículas em clorofórmio para obter micropartículas esféricas, Figura 6.9b. Os resultados obtidos na Figura 6.9a se devem ao fato de o ciclohexano apresentar temperatura de ebulição mais elevada que o clorofórmio e a sua evaporação ser mais lenta, aumentando o tempo total de evaporação do solvente, resultando em micropartículas macias, que ao se chocarem não coalescem devido a atuação do surfatante, porém, deformam.

Embora a partir das imagens de SEM as micropartículas pareçam ser porosas (Figura 6.9b), cada poro representa uma nanocápsulas colapsadas localizada na superfície das micropartículas. Para verificar se as nanocápsulas desprende da superfície durante a centrifugação, SEM das micropartículas lavadas e centrifugadas foi realizada. As imagens estão apresentadas na Figura 6.10. Como pode se observar, mesmo depois de as micropartículas serem lavadas e centrifugadas, estas foram bem redispersas em água, apresentando uma morfologia esférica e as nanocápsulas não foram descoladas da superfície. De fato, é possível ver que as NCs estão aprisionadas na superfície das micropartículas.

Figura 6.10 Imagens de SEM das micropartículas de PLLA (MT 5-8), depois de centrifugação durante 20 min a 1000 rpm.



A partir dos resultados apresentados na Figura 6.10, observa-se que as nanocápsulas não estão homogeneamente distribuídas na superfície de micropartículas, mas o fato de que existem algumas micropartículas com superfície lisa não significa, necessariamente, que estas não contêm qualquer NCs dentro delas. Devido ao tamanho das micropartículas, não foi possível investigar e determinar de maneira confiável o local de nanocápsulas aprisionadas via microscopia eletrônica de transmissão, mesmo com amostras imobilizadas em resina e cortes ultra-finos.

Para determinar o local de nanocápsulas dentro das micropartículas, microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) com fluorescência foi utilizada. Análises em CLSM foram realizadas para verificar a distribuição de nanocápsulas no sistema, através de um corte no meio da micropartícula, Figura 6.11. Algumas micropartículas apresentam fluorescência de SR 101 em sua superfície, representado por um anel vermelho contornando as micropartículas. Tais resultados (Figura 6.11b) cor-

roboram com os obtidos por SEM (Figura 6.10). A maioria das nanocápsulas encontra-se na superfície das micropartículas.

Acredita-se que tal morfologia se deve ao processo de separação de fases entre o PLLA e as nanocápsulas de amido e diferenças de tensões interfaciais. Após a etapa de emulsificação, as nanocápsulas se encontram homogeneamente distribuídas no interior de uma gota formada principalmente por clorofórmio. Contudo, a migração das nanocápsulas para a interface das micropartículas ocorre durante o processo de evaporação de solvente. Ao final do processo de separação de fases, a morfologia obtida lembra a de uma microcápsula (micropartícula envolta por nanocápsulas, Figura 6.11b). Tal fato se deve a mobilidade das NCs de amido governada pela característica hidrofílica da casca polimérica como força motriz.

A Figura 6.12 apresenta resultados obtidos por CLSM com superexposição do marcador SR 101 (áreas em azul, Figura 6.12b) e após um período de tempo de análise (Figura 6.12c, quando a gota aquosa evaporou sutilmente). Os resultados mostram a presença de nanocápsulas no interior das micropartículas, representados por pequenos pontos vermelho.

Aumentando-se a temperatura de 40 °C (MT 5-8) para 55 °C (MT 5-16) durante a etapa de evaporação de solvente influenciou a distribuição de nanocápsulas dentro do micropartículas, como mostra a Figura 6.13.

Figura 6.11 Nanocápsulas aprisionadas em micropartículas MT 5-8. a) Microscopia de luz comum e b) Microscopia confocal de varredura a laser da amostra.

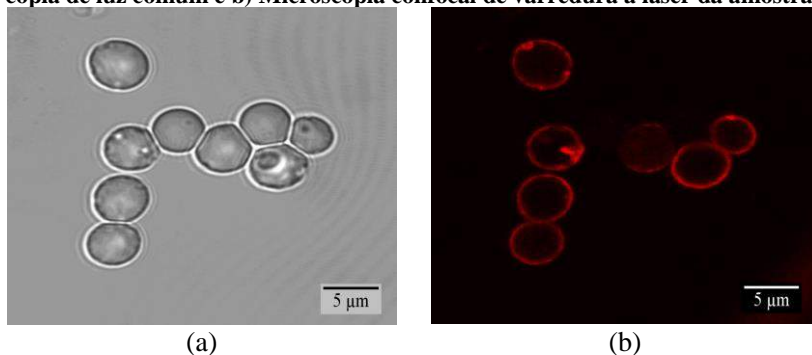


Figura 6.12 Nanocápsulas aprisionadas em micropartículas MT 5-8. a) Microscopia de luz comum e b) Microscopia confocal de varredura a laser da amostra.

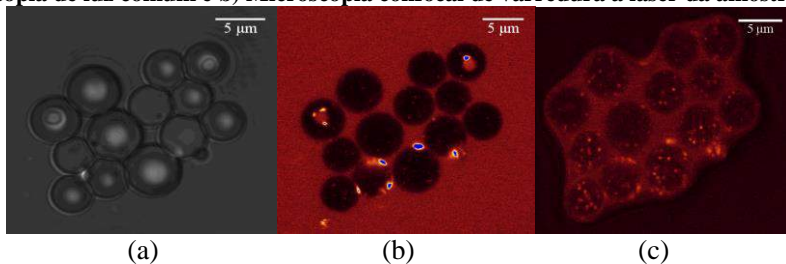
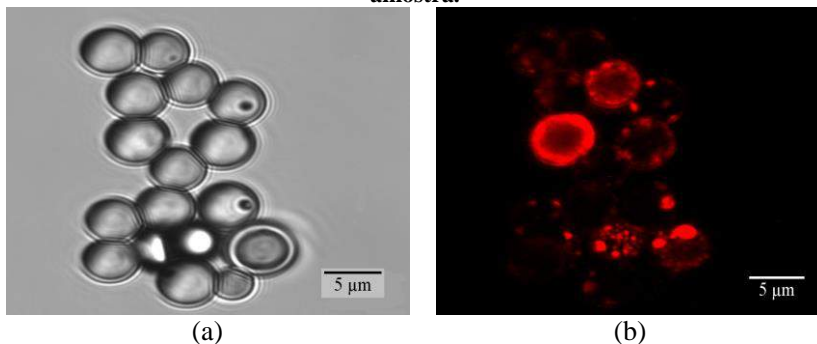


Figura 6.13 Nanocápsulas aprisionadas em micropartículas MT 5-16. a) Microscopia de luz comum e b) Microscopia confocal de varredura a laser da amostra.



O aumento da temperatura durante a etapa de evaporação do solvente resultou em um ligeiro aumento da eficiência de encapsulação das nanocápsulas de em torno de 85 % (MT 5-8) para aproximadamente 90% (MT 5-16). As diferenças de morfologia e eficiência de encapsulação observadas se devem ao aumento da taxa de evaporação de solvente, dessa forma, reduzindo a mobilidade das nanocápsulas no interior da partícula.

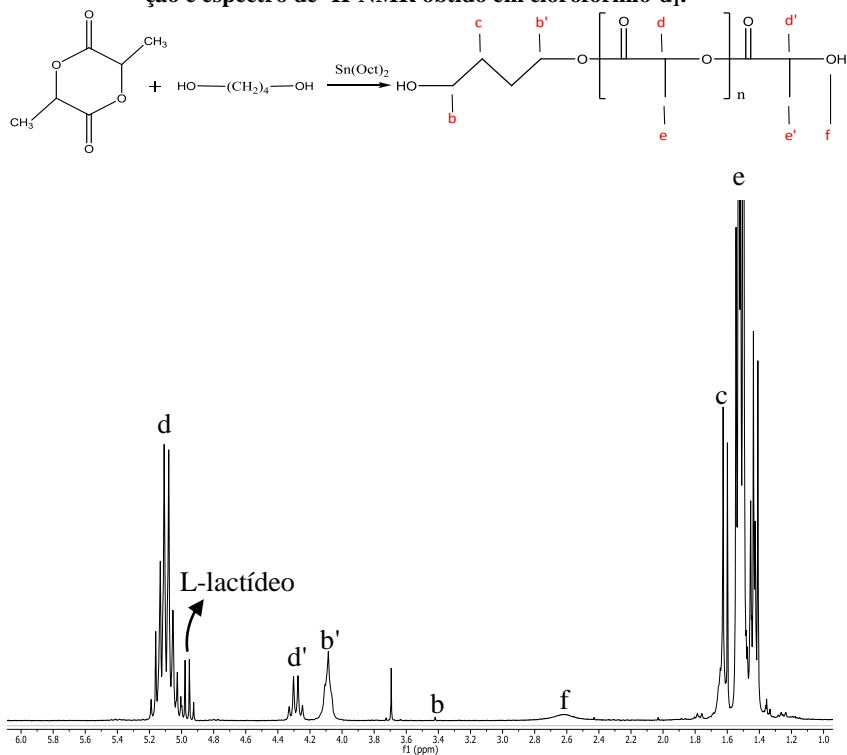
6.3.1 Compatibilização de NCs de amido reticulado com Micropartículas de PLLA

Oligômeros de PLLA enxertados na superfície das nanocápsulas podem possibilitar a compatibilização das nanocápsulas de amido reticulado com o PLLA das micropartículas.

6.3.1.1 SÍNTESE DE OLIGÔMEROS

Para tanto, primeiramente, oligômeros lineares de PLLA foram sintetizados a partir de L-lactídeo usando 1,4 – butanodiol como co-iniciador. 1,4-BD foi escolhido como co-iniciador devido ao fato de este iniciar o crescimento de cadeia do monômero por ambas as terminações resultando em um PLLA com grupos hidroxilas em ambas as terminações, como apresenta a Figura 6.14. As concentrações utilizadas foram adequadas com a síntese de oligômeros, como proposto por Korhonen, Helminen e Seppa (2001). Espectro de $^1\text{H-NMR}$ com picos característicos apresentados na Figura 6.14 confirmam a estrutura de PLLA, sintetizados com uma razão molar de 1:10 entre L-lactídeo e 1,4-BD.

Figura 6.14 Síntese de oligômeros de PLLA. Esquema da reação de polimerização e espectro de $^1\text{H-NMR}$ obtido em clorofórmio- d_1 .



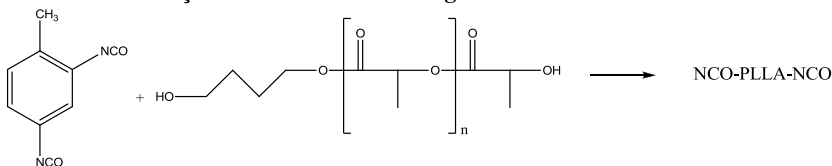
A Tabela 6.3 apresenta os resultados de massas molares médias e índice de polidispersão (IPd) do PLLA sintetizado. As massas molares médias obtidas são características para oligômeros e os resultados apresentados foram de acordo com os obtidos por Korhonen, Helminen e Seppa (2001).

Tabela 6.3 Propriedades do PLLA oligomérico sintetizado com 1,4-BD.

Detector	UV S3702	Shodex RI
Mw (g.mol ⁻¹)	2,6 x 10 ³	2,8 x 10 ³
Mn (g.mol ⁻¹)	2,1 x 10 ³	2,2 x 10 ³
IPd	1,25	1,24

A reação de enxertia dos oligômeros de PLLA na superfície das nanocápsulas de amido pode ocorrer de duas formas. A primeira consiste em adicionar o PLLA oligomérico na fase contínua, a qual as nanocápsulas estão dispersas e deixar reagir com os grupos de NCO remanescentes após a preparação das nanocápsulas. A segunda tentativa consistiu em funcionalizar as terminações do PLLA oligomérico com grupos isocianato a partir de reação com TDI em excesso, de acordo com a Figura 6.15, previamente. Os grupos de isocianato terminais do PLLA reagem então com as hidroxilas remanescentes na casca polimérica das nanocápsulas.

Figura 6.15 Síntese de PLLA-NCO-terminado a partir de polimerização de adição de TDI com PLLA oligomérico em solvente.



A funcionalização do PLLA com grupos NCO pode ocorrer como sugerido na Figura 6.15. A reação entre o PLLA oligomérico e TDI ocorreu a 60 °C por 24 horas em clorofórmio como solvente. As massas molares médias e o índice de polidispersão estão apresentados na Tabela 6.4.

Apesar de excesso de TDI ter sido aplicado na síntese (5:1 razão molar entre TDI:PLLA oligomérico), massa molares médias indicam que houve extensão de cadeia, comparando-se os resultados de massa

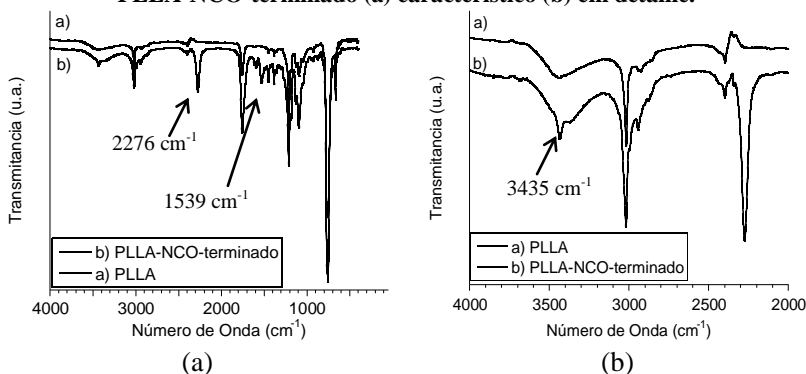
molares inicial do PLLA (Tabela 6.3) e do produto final apresentado na Tabela 6.4

Tabela 6.4 Propriedades do PLLA-NCO-terminado oligomérico sintetizado com TDI em solvente.

Detector	UV S3702	Shodex RI
Mw (g.mol ⁻¹)	5,3 x 10 ³	6,1 x 10 ³
Mn (g.mol ⁻¹)	3,3 x 10 ³	3,7 x 10 ³
IPd	1,58	1,66

A Figura 6.16 e a Figura 6.17 apresentam uma comparação entre os espectros de FT-IR e ¹H-NMR do PLLA-NCO-terminado e PLLA, respectivamente.

Figura 6.16 Espectro obtido a partir de análise de FT-IR líquido de PLLA e PLLA-NCO-terminado (a) característico (b) em detalhe.



Análise de FT-IR líquido foi realizada a fim de verificar a presença de grupos isocianato remanescente. A Figura 6.16 apresenta os espectros obtidos para PLLA e PLLA-NCO-terminado dissolvidos em clorofórmio. Observa-se no espectro do PLLA apresenta picos característicos de hidroxilas em 3435 cm⁻¹ e um pico estreito em 1763 cm⁻¹ referente aos grupos ésteres internos.

Ao introduzir os grupos NCO nas terminações do PLLA, o espectro de FT-IR obtido apresentou um pico característico de amida em 3435 cm⁻¹, resultado da formação de grupos NH (Figura 6.16b) e um novo pico em 2276 cm⁻¹ relacionado aos grupos remanescente NCO. Novos picos referente ao grupos aromático do TDI e amida, 1600 cm⁻¹ e 1539

cm^{-1} , respectivamente. O teor de NCO determinado a partir de titulação reversa foi de 9,5 % em massa.

Espectros de $^1\text{H-NMR}$ (Figura 6.17) confirmam a reação entre as hidroxilas terminais do PLLA e TDI. Adicionando grupos NCO nas terminações do PLLA, o espectro do PLLA-NCO-terminado apresentou um novo pico em 2.25 ppm característico do grupo metil do TDI, o anel benzeno em 7,05 ppm (RUI-HE et al., 2006) e um pico característico em 6,75 ppm referente a amida formada. Adicionalmente, a ausência do pico característico em 2,5 ppm das hidroxilas terminais do PLLA no espectro do PLLA-NCO-terminado confirma o seu consumo total pelos grupos NCO.

6.3.1.2 SÍNTESE DE NANOCÁPSULAS

Considerando que o PLLA-NCO-terminado não é solúvel tanto em água quanto em ciclohexano, a síntese de nanocápsulas de amido reticulado foi realizada substituindo-se parcialmente o ciclohexano por clorofórmio, possibilitando uma alternativa de adicionar oligômero na fase contínua.

O efeito da composição da fase contínua sobre as nanocápsulas foi investigada. Nanocápsulas de amido foram preparadas em uma fase contínua 2:1 em volume de ciclohexano e clorofórmio, primeiramente sem adição dos oligômeros. A polimerização em miniemulsão inversa foi realizada a 25 °C por 24 horas para evitar a evaporação do solvente que compõe a fase contínua. As reações iniciaram com a adição de 160 mg de TDI.

Um estudo comparativo do efeito do solvente da fase contínua sobre a composição da casca polimérica foi realizado a partir de análise de FT-IR, apresentado na Figura 6.18. Observa-se que a substituição parcial do ciclohexano por clorofórmio não influenciou a composição da casca polimérica das nanocápsulas. Ambas as amostras apresentaram forte pico em 2276 cm^{-1} referente ao grupo NCO remascente previamente discutido no Capítulo III.

Figura 6.17 Espectra de $^1\text{H-NMR}$ obtido em clorofórmio- d_1 de (a) PLLA-NCO-terminado e (b) PLLA.

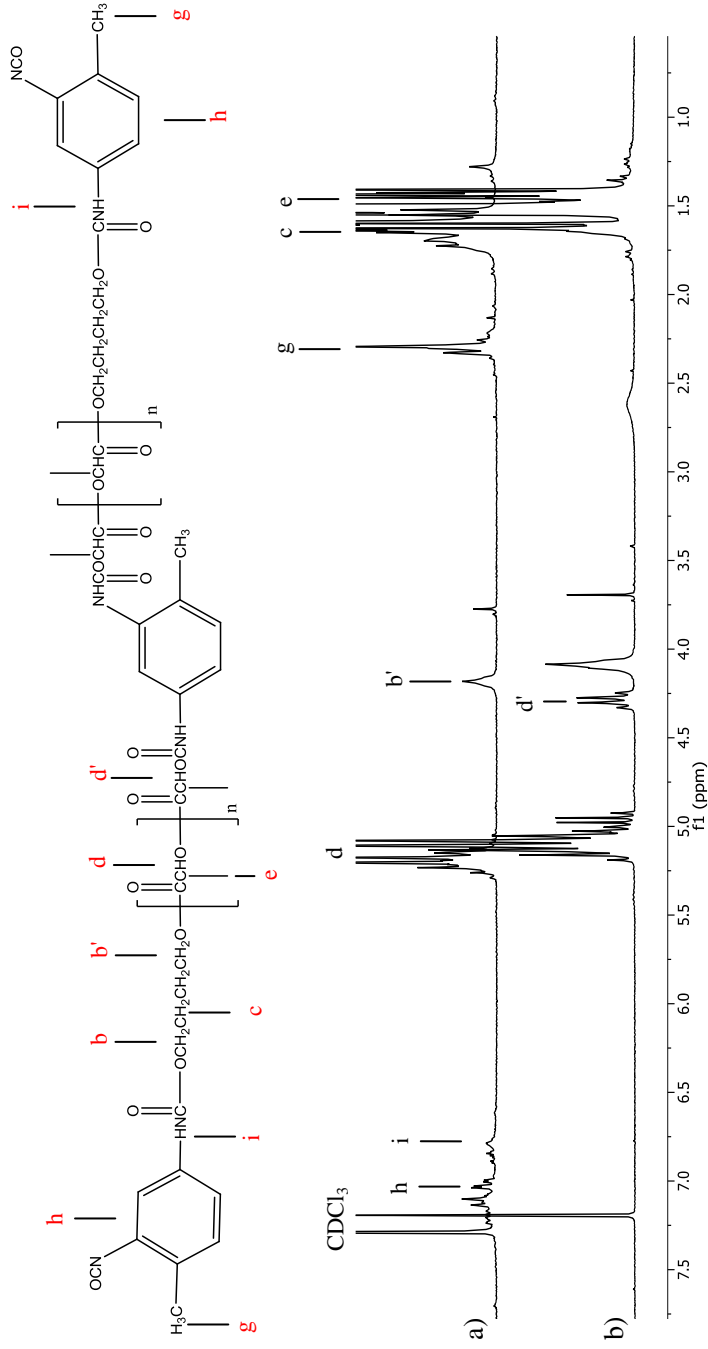
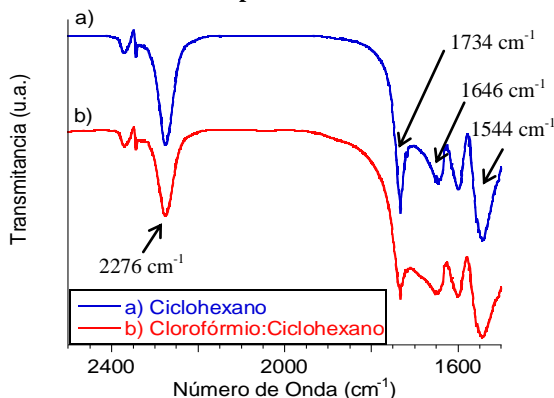


Figura 6.18 Espectros obtidos a partir de análise de FT-IR das nanocápsulas após síntese em (a) ciclohexano e (b) 2:1 de ciclohexano:clorofórmio, ambas a 25 °C por 24 h.



Para as reações de enxertia do PLLA-NCO-terminado na superfície das nanocápsulas, primeiramente as nanocápsulas foram sintetizadas por 24 horas adicionando 100 mg de TDI a 25 °C. Seguidamente, 20 mg de PLLA-NCO-terminado, previamente dissolvido em 2 g de uma solução ciclohexano:clorofórmio com razão volumétrica igual a 2:1, foram adicionados e a prosseguiu por mais 24 horas a 25 °C. A Figura 6.19 apresenta uma comparação entre os espectros de FT-IR de nanocápsulas sintetizadas com apenas TDI e, de NCs preparadas com TDI e PLLA-NCO-terminado.

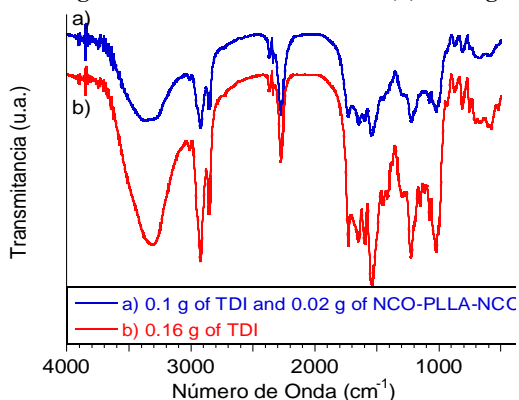
Observa-se que a substituição parcial do TDI pelo PLLA-NCO-terminado não afetou a composição da casca polimérica, a qual é composta por grupos uretanos e ureia (BAIER et al., 2010) e ambas as amostras apresentaram um pico característico de NCO forte em 2276 cm⁻¹. Porém, neste caso, espera-se que a presença de alto teor de NCO remanescente facilite a incorporação do PLLA utilizado para a preparação das MPs sobre a superfície das NCs de amido.

6.3.1.3 PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

Nanocápsulas de amido reticulado com núcleo aquoso foram aprisionados em micropartículas monodispersas PLLA, de acordo com MT 5-8. Mesmo quando se encontram na superfície das micropartículas, permitem a entrega adequada das nanocápsulas para os pulmões em terapias de inalação oral. Mas, para um melhor perfil de liberação prolongada de fármaco, a internalização das NCs em micropartículas é desejá-

vel, o que poderia ser conquistado compatibilizando a superfície das NCs de amido com PLLA.

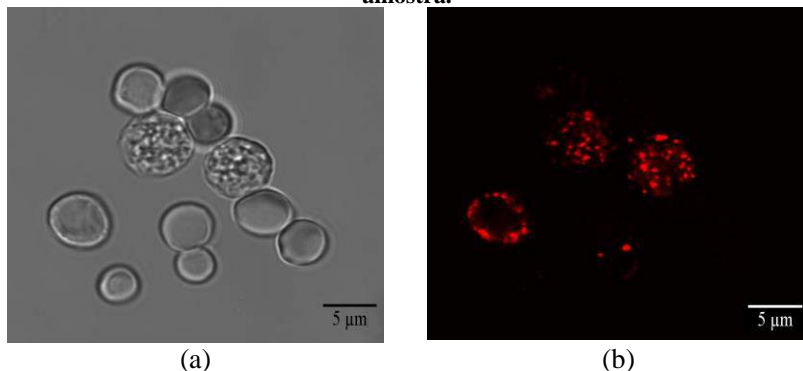
Figura 6.19 Espectros de FT-IR de nanocápsulas sintetizadas com (a) 100 mg de TDI e 20 mg de PLLA-NCO-terminado e (b) 160 mg de TDI.



Foi apresentado anteriormente que nanocápsulas de amido reticulado com PLLA enxertado podem ser obtidas via polimerização miniemulsão inversa, resultando uma casca polimérica com maior concentração de NCO residual. SR 101 como corante hidrofílico foi utilizado para rotular as nanocápsulas de amido, permitindo a avaliação da eficiência de encapsulação e investigação de distribuição de nanocápsulas dentro das micropartículas. A Figura 6.20 apresenta imagens de luz comum e CLSM da amostra MT 5-14.

A funcionalização de superfície das nanocápsulas de amido com o oligômero PLLA-NCO-terminado, apesar de não proporcionar melhor distribuição de NCs entre as micropartículas, resultou em um aumento da internalização das NCs, como observado na Figura 6.20. Além de a reação de enxertia tornar a superfície das NCs mais hidrofóbicas, a maior concentração de grupos NCO residual (Figura 6.19) na casca polimérica das NCs favorece a reação entre as NCs e o PLLA da matriz polimérica das micropartícula, ambos diminuindo a mobilidade e a força motriz que levaria as NCs migrarem para a superfície das MPs, promovendo a internalização. A eficiência de encapsulação na amostra MT 5-14 foi de 90 %.

Figura 6.20 Nanocápsulas aprisionadas em micropartículas MT 5-14. a) Microscopia de luz comum e b) Microscopia confocal de varredura a laser da amostra.

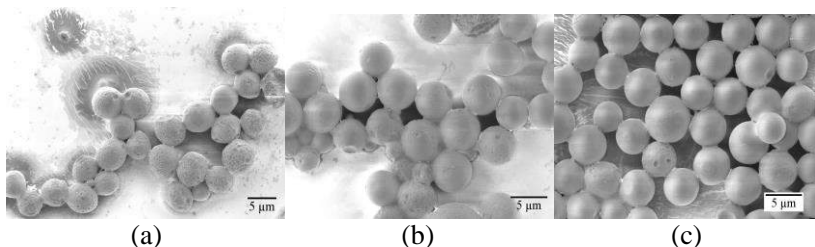


A Tabela 6.5 apresenta um comparação das eficiências de encapsulação de nanocápsulas por micropartículas preparadas com a técnica de membrana SPG com tamanho de poro igual a 5 µm. Imagens de SEM estão apresentadas na Figura 6.21, onde observa-se que ambas apresentaram a mesma distribuição de tamanho de partículas.

Tabela 6.5 Comparação entre as eficiências de encapsulação de micropartículas preparadas por diferentes métodos.

Referência	EE (%) ± D _v P
MT 5-8	85 ± 1
MT 5-16	90 ± 1
MT 5-14	90 ± 1

Figura 6.21 Imagem de SEM das micropartículas das amostras (a) MT 5-8 e (b) MT 5-16, ambas com NCs sintetizadas com 160 mg de TDI e (c) MT 5-14 com NCs sintetizadas com 100 mg de TDI e 20 mg de PLLA-NCO-terminado.



6.4 CONCLUSÕES

Micropartículas de PLLA foram preparadas a partir de duas técnicas distintas de emulsificação seguida da técnica de evaporação de solvente. A partir da técnica de emulsificação por membrana porosa de vidro SPG, micropartículas de natureza monodispersas foram obtidas com diâmetro médio similar ao diâmetro de poro da membrana.

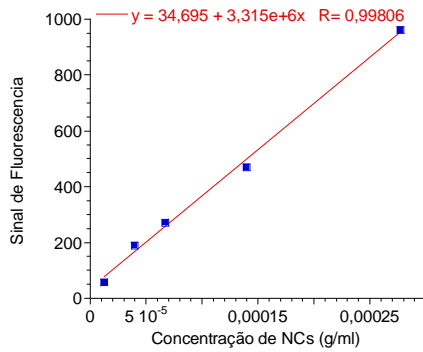
A microencapsulação de nanocápsulas em micropartículas foi avaliada com diferentes tamanhos de poro de membrana. A eficiência de encapsulação foi determinada com um procedimento confiável a partir de espectroscopia de fluorescência e observou-se que o tamanho de poro da membrana aplicada têm papel importante na eficiência de encapsulação. As nanocápsulas foram encapsuladas em micropartículas e as técnicas de microscopias eletrônica de varredura e confocal de varredura a laser foram essenciais na determinação da localização das nanocápsulas nas micropartículas. Foi observado que, de acordo com o procedimento aplicado, a localização das nanocápsulas pode ser delineada. E a modificação da composição da casca polimérica a partir da reação de enxertia do amido com PLLA-NCO-terminado aumentou a internalização das nanocápsulas nas micropartículas.

Esta etapa do trabalho apresentou um sistema promissor de liberação controlado de fármacos, o qual possibilita a encapsulação combinada de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos em uma única partícula multicompartimentada.

6.5 INFORMAÇÕES DE SUPORTE

Perfil de fluorescência máxima com relação a concentração de NCs de amido marcadas com SR 101 em água: a curva de calibração foi realizada em um espectrofotômetro de fluorescência de acordo com o seguinte procedimento: nanocápsulas de amido reticuladas dispersas em ciclohexano foram redispersas em solução aquosa contendo SLS. Após evaporação do solvente, esta solução-mãe de NCs marcadas com SR 101 foi diluída com a solução aquosa de SLS. Uma alíquota de 100 µl foi analisada em espectrômetro de fluorescência (NanoDrop ND-3300, PEQLab). A Figura 6.22 apresenta a curva de calibração realizada com o sinal de fluorescência máximo em 610 nm, respectivamente.

Figura 6.22 Perfil de intensidade de fluorescência com relação a concentração de NCs de amido marcadas com SR 101. Curva de calibração de NCs.



CO-ENCAPSULAÇÃO DE FÁRMACOS HIDROFÍLICOS E HIDROFÓBICOS EM MICROPARTÍCULAS MULTICOMPARTIMENTADAS E LIBERAÇÃO CONTROLADA

7.1 INTRODUÇÃO

No caso da micobactéria da tuberculose, os pulmões são, se não os únicos, a principal porta de entrada para o desenvolvimento da doença (MISRA et al., 2011). Administração a partir de inalação oral se tornou uma modalidade de tratamento importante no tratamento de doenças pulmonares (ZENG; MARTIN & MARRIOTT, 1995). Esta rota de administração apresenta vantagens com relação às demais, tais como aumento da concentração de fármaco no local de ação e decréscimo dos possíveis efeitos colaterais (MANCA et al., 2008). Além destas vantagens, apesar de o pulmão e o trato respiratório serem capazes de metabolizar a dose de fármaco liberado, o pulmão apresenta uma grande área superficial absorptiva, a qual permite uma grande quantidade de componentes na circulação sanguínea a taxas consideráveis (BYRON, 1990). Dessa forma, a administração por inalação oral não necessariamente se limita a tratamento de doenças pulmonares, podendo ser explorada como porta de entrada para a circulação sanguínea de diversos outros fármacos.

No entanto, elaborar e preparar um novo tratamento administrado por aerossóis é complexo e algumas variáveis devem ser exploradas. O principal requisito a ser satisfeito é com relação ao tamanho das gotas dos aerossóis, que devem se encontrar entre 1 a 5 μm de diâmetro aerodinâmico (HUREAUX et al., 2009). A baixa eficiência de liberação das formulações mais tradicionais de aerossóis se deve a presença de partículas com tamanho acima de 5 μm , as quais são retidas na boca e esôfago, direcionadas ao sistema digestivos em vez de os pulmões. Por outro lado, partículas muito pequenas (menores de 0,4 μm , tipicamente conhecidas como nanopartículas) também apresentam baixa eficiência de deposição por serem facilmente expiradas ao longo da respiração (KLEINSTREUER; ZHANG & DONOHUE, 2008).

Com objetivo de satisfazer os requisitos com relação ao tamanho médio das partículas para aplicação como sistema de liberação controlada administrado via inalação oral, Bharatwaj *et al.* (2010) incorporou nanocápsulas de poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo) de tamanho de aproximadamente 240 nm em micropartículas de caráter polidisperso e tamanho entre 0,5 e 4 μm de um copolímero quitosana-co-poli(ácido láctico)

utilizando uma metodologia modificada de emulsificação, seguido de difusão do solvente. Enfatiza-se que tal sistema proposto pelos autores, apesar de apresentar uma estrutura subdividida, apresenta apenas a possibilidade de encapsulação de fármacos hidrofóbicos.

Dutt e Khuller (2001) encapsularam rifampicina e isoniazida em uma mesma partícula e compararam a eficiência de encapsulação de ambos os fármacos em lipossomas e em micropartículas. Os autores obtiveram uma eficiência de encapsulação para a rifampicina, fármaco hidrofóbico, entre 44-49% e 3.5-4% em lipossomas (0,1 – 0,2 μm) e em micropartículas de PLGA (na faixa de tamanho entre 51 e 75 μm), respectivamente. Enquanto que a encapsulação da isoniazida foi de 8-10% e 7% em lipossomas e em micropartículas de PLGA, respectivamente.

Micropartículas multicompartimentadas apresentam uma alternativa potencial na co-encapsulação de fármacos que compõem um coquetel, os quais não combinariam naturalmente. Sabendo-se que materiais biodegradáveis e biocompatíveis são pré-requisitos na síntese de sistemas de liberação modificada de fármacos, um sistema multicompartimentado foi desenvolvido utilizando amido e PLLA.

Esta etapa do trabalho tem como objetivo demonstrar a habilidade do sistema multicompartimentado em encapsular simultaneamente compostos hidrofílicos e hidrofóbicos, avaliar a cinética de liberação dos compostos ativos, além da biodegradabilidade dos polímeros utilizados.

7.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

7.2.1 Materiais

Micropartículas biodegradáveis foram preparadas com PLLA e poli(láctico-co-glicólico) (PLGA, 85:15 lactídeo:glicolídeo, $M_w = 50000 - 75000 \text{ g.mol}^{-1}$, Aldrich). Sulforodamina 101 (SR 101, BioChemica, Aldrich), um marcador fluorescente, ou isoniazida (Sigma-Aldrich), fármaco que compõe o coquetel da tuberculose, foram encapsulados nas nanocápsulas, por serem compostos de caráter hidrofílico. N-(2,6-diisopropilfenil) perileno-3,4-dicarboximida (PMI, BASF), um marcador fluorescente, ou rifampicina, foram encapsulados nas micropartículas, devido ao caráter hidrofóbico destes compostos.

Solução tampão de fosfato livre de magnésio e cálcio (PBS) para os testes de liberação do fármaco foi adquirida na Gibco (Alemanha). Os estudos de degradação ácida das micropartículas multicompartimentadas foram realizados utilizando-se um solução de HCl 0,1 M. Os estudos de

degradação enzimática das nanopartículas de amido reticulado foram realizados utilizando-se α -amilase de *Bacillus subtilis* (Fluka). Degradação enzimática das micropartículas de PLLA foi realizada com proteína K (pó liofilizado, 20 U.mg⁻¹) foi adquirido de Thermo Scientific. A cinética de liberação dos fármacos foi determinada na presença de um surfatante pulmonar, 2,3-dipalmitoil-sn-glicerol-1-fosfocolina (Sigma Aldrich). Água destilada foi utilizada em todos os procedimentos. Todos os reagentes foram utilizados sem nenhum procedimento de purificação.

7.2.2 Procedimentos Experimentais

As nanocápsulas de amido reticulado (NCs) foram previamente sintetizadas a partir de polimerização por etapa como apresentado no Capítulo III, utilizando 160 mg de TDI, segundo formulação TDI 3. Para a encapsulação da sulforodamina 101 ou isoniazida, resumidamente, a água que compõe a fase dispersa foi substituída por uma solução aquosa contendo 0,02 % ou 0,56 % em massa de SR 101 ou de isoniazida, respectivamente.

Após a preparação, nanocápsulas dispersas em ciclohexano foram centrifugadas durante 50 min a 5600 rpm para retirada do surfatante livre e, em seguida redispersas em clorofórmio. A preparação das micropartículas multicompartimentadas foi de acordo com o procedimento apresentado no Capítulo VI, segundo a formulação MT 5-8. Resumidamente, nanocápsulas redispersas em uma solução de clorofórmio e PLLA previamente dissolvido foi emulsificado a partir da técnica de membrana porosa SPG (tamanho de poro igual a 5 μ m) em uma solução aquosa de SLS. Para a preparação de micropartículas de PLGA, PLLA foi totalmente substituído por PLGA. Para a co-encapsulação das NCs e PMI ou rifampicina, estes foram previamente solubilizados em clorofórmio.

7.2.3 Caracterização

7.2.3.1 TAMANHO E MORFOLOGIA DE PARTÍCULA

A morfologia e a superfície de micropartículas foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) utilizando um microscópio de emissão de campo (LEO (Zeiss) 1530 Gemini, Oberkochen, Alemanha) a uma voltagem de aceleração de 0,5 kV. Geralmente, as amostras foram preparadas diluindo-se as micropartículas em água desti-

lada. Em seguida, uma gota de amostra foi colocada em placas de sílica e secas sob condições normais de ambientes.

SR 101 foi escolhido com marcador fluorescente hidrofílico devido a sua estável fluorescência na região do vermelho ($\lambda_{exc} / \lambda_{em}$: 583 / 603 nm). Já PMI foi escolhido como marcador hidrofóbico e possui fluorescência na região do verde ($\lambda_{exc} / \lambda_{em}$: 488 / 520). A morfologia multicompartimentada das partículas foi investigada em microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) depositando uma gota da dispersão das micropartículas no em uma lâmina para microscópio. Uma objetiva de imersão em óleo, Leica HCX PL APO CS 1.4/100 \times foi utilizada acoplada de uma linha de argônio com potência menor que 100 μ W a 488 nm e 561 nm, para PMI e SR 101, respectivamente.

7.2.3.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E LIBERAÇÃO DE FÁRMACO HIDROFÍLICO EM NANOCÁPSULAS DE AMIDO

A eficiência de encapsulação de isoniazida foi estudada após a redispersão das nanocápsulas em solução PBS. Para tanto, 1 g das nanocápsulas dispersas em ciclohexano foi redispersado em 5 g de água contendo 0,3 % em massa de SLS. Após a etapa de ultrasonicação (1 min em regime de pulso), ciclohexano foi evaporado durante 8 horas a 25 °C e 1000 rpm de agitação magnética. A eficiência de encapsulação foi determinada a partir de um espectrofotômetro UV-vis (Perkin-Elmer Lambda 25, locado no Instituto Max-Planck para Pesquisa em Polímeros - Mainz, Alemanha). Isoniazida possui absorvância máxima em 261 nm e uma curva de calibração foi realizada, apresentada em Informações de Suporte. A eficiência de encapsulação foi calculada relacionando o sinal de absorvância máxima do sobrenadante da amostra após centrifugação a 4000 rpm por 30 min com a curva de calibração e o valor total teórico de isoniazida adicionada as nanocápsulas. As amostras foram gentilmente agitadas e a cinética de liberação do fármaco foi avaliada a 37 °C com o mesmo procedimento, retirando-se amostra em intervalos específicos de tempo.

7.2.3.3 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E LIBERAÇÃO DO FÁRMACO HIDROFÓBICO EM MICROPARTÍCULAS

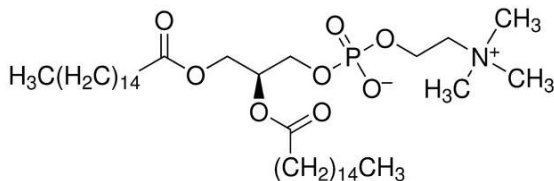
A eficiência de encapsulação da rifampicina foi estudada tanto na presença quanto na ausência de nanocápsulas. Enfatiza-se que neste caso, as nanocápsulas não foram carregadas com o marcador fluorescente SR 101. Após os processos de emulsificação da fase orgânica (polímero,

clorofórmio e NCs) usando a técnica de membrana SPG e de evaporação do solvente, o volume final da amostra foi verificado e as micropartículas foram sedimentadas por centrifugação a 3000 rpm durante 20 min. O sobrenadante foi analisado em um espectrofotômetro de UV-vis (Perkin-Elmer Lambda 25). Rifampicina apresenta absorvância máxima em 475 nm. A eficiência de encapsulação foi calculada relacionando o resultado de absorvância máxima com uma curva de calibração previamente realizada, apresentada em Informações de Suporte.

Para os experimentos de liberação, uma solução tampão de fosfato de sódio (PBS) foi utilizada. As micropartículas foram redispersas em solução PBS após sedimentação por centrifugação a 3000 rpm durante 20 min. As amostras foram gentilmente agitadas e a cinética de liberação de rifampicina foi avaliada a 37 °C. Alíquotas de 1 ml da amostra foram retiradas periodicamente e as micropartículas foram sedimentadas por centrifugação, seguindo o procedimento descrito acima.

A cinética de liberação dos fármacos, isoniazida e rifampicina, foram realizadas na presença de um surfatante pulmonar, 2,3-dipalmitoil-sn-glicerol-1-fosfocolina em uma concentração igual a 17,2 mg.l⁻¹, a fim de mimetizar o ambiente pulmonar. A Figura 7.1 apresenta a sua estrutura molecular.

Figura 7.1 Estrutura molecular do surfatante pulmonar, 2,3-dipalmitoil-sn-glicerol-1-fosfocolina.



7.2.3.4 DEGRADAÇÃO ÁCIDA DAS MICROPARTÍCULAS MULTICOMPARTIMENTADAS

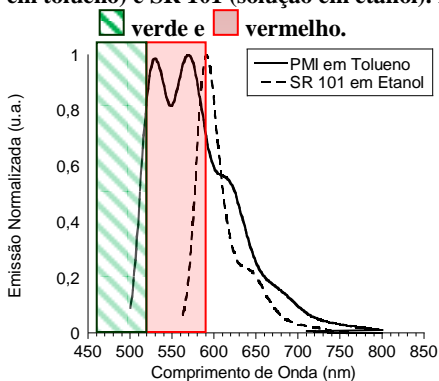
Micropartículas MT 5-8 contendo PMI e SR 101 em suas subunidades, previamente liofilizadas, foram redispersas em solução de HCl 0,1 M. A degradação ácida ocorreu a temperatura ambiente com agitação leve. Alíquotas foram retiradas e análise em CLSM e SEM foram realizadas. As amostras foram investigadas em um microscópio Olympus Bx41 como descrito anteriormente, com excitação na região do vermelho para verificar a distribuição das nanocápsulas e em um microscópio eletrônico de varredura de alta resolução (JEOL JSM-6701F)

com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (SEM-FEG) com voltagem de 10 kV, alocado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME, UFSC). Uma gota de amostra foi colocada em placa de sílica, seca sob condições normais de ambientes e recoberta com uma fina camada de ouro.

7.2.3.5 DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA DAS MICROPARTÍCULAS MULTICOMPARTIMENTADAS E LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

A degradação enzimática das micropartículas foi investigada utilizando um microscópio Olympus Bx41, locado no Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB II, BEG) com sistema de epifluorescência e iluminação diascópica transmitida, acoplado a filtros azul (U-MWU2, $\lambda_{exc} / \lambda_{em}$: 330 – 385 / 420 nm), verde (U-MWB2, $\lambda_{exc} / \lambda_{em}$: 460 - 490 / 520 nm) e vermelho (U-MGW2, $\lambda_{exc} / \lambda_{em}$: 510 - 550 / 590 nm) e câmera digital colorida (Q-imaging, 3.3 megapixel de resolução). As imagens foram capturadas pelo software Q-capture Pro 5.1 (Q-imaging). A Figura 7.2 apresenta os espectros de fluorescência dos marcadores escolhidos, PMI e SR 101. As áreas hachuradas ilustram a região dos filtros verde e vermelho. Apesar de o PMI apresentar excitação e emissão na região do verde, o seu espectro de fluorescência é largo e influencia na análise da SR 101 na região do vermelho. Dessa forma, os marcadores fluorescentes não foram coencapsulados, mas analisados separadamente.

Figura 7.2 Espectros de fluorescência (intensidade normalizada) dos marcadores PMI (solução em tolueno) e SR 101 (solução em etanol). Região dos filtros



A degradação enzimática do PLLA foi desencadeada pela proteínase K em micropartículas MT 5-8 contendo apenas PMI encapsulado. A reação enzimática iniciou com a adição de 9 mg.mg^{-1} (concentração final) de proteinase K. As amostras foram investigadas utilizando o filtro com excitação na região do verde.

A degradação enzimática das nanocápsulas que compõe as partículas multicompartimentadas foi realizada adicionando 10 mg.mg^{-1} (concentração final) de α -amilase. As imagens foram capturadas utilizando fluorescência com excitação na região do vermelho.

Enfatiza-se que, as micropartículas foram centrifugadas a 3000 rpm durante 20 min três vezes para retirada de SLS, evitando a danificação das enzimas. Após o processo de liofilização das micropartículas, estas foram redispersas em solução PBS após duas lavagens para retirar SLS.

A cinética de liberação dos fármacos desencadeada por degradação enzimática foi avaliada com diferentes concentrações de enzimas a 37°C . Após a preparação e repetitivas centrifugações a 3.000 rpm por 30 min, as micropartículas multicompartimentadas foram redispersadas e mantidas sob leve agitação em uma solução tampão de fosfato 0,05 M e pH 7,4 previamente preparada. A concentração de rifampicina liberada foi determinada a partir de análise em espectrofotômetro UV-vis em 475 nm. Para tanto, alíquotas foram retiradas periodicamente e as micropartículas foram sedimentadas por centrifugação (4.000 rpm por 30 min). Uma curva de calibração da concentração de fármaco com a absorbância foi realizada e a concentração liberada foi determinada calculando-se a absorbância do sobrenadante com a curva de calibração.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

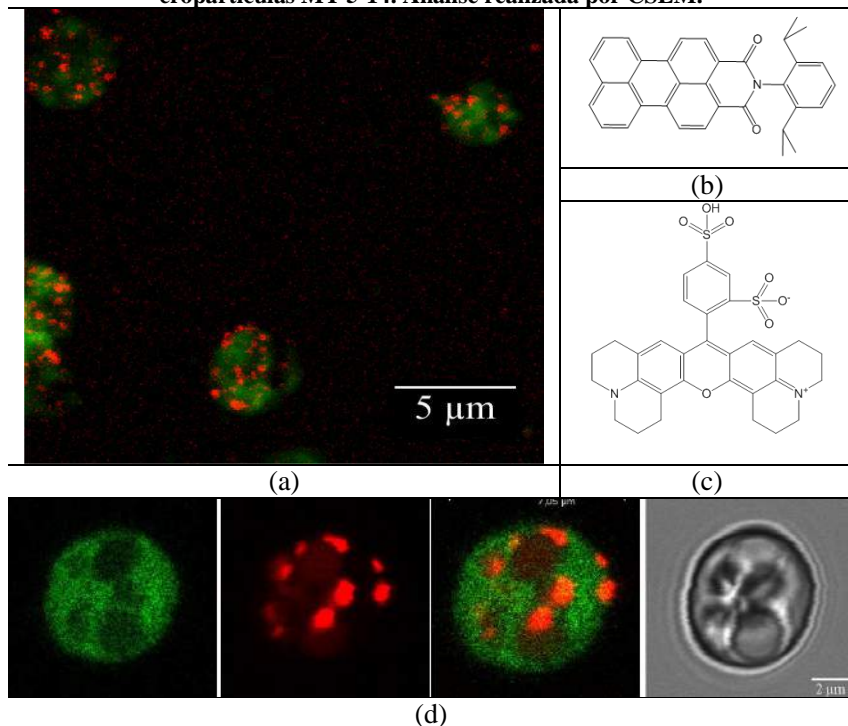
Micropartículas multicompartimentadas com subunidades representam uma alternativa promissora para encapsulação concomitante de compostos hidrofílico e hidrofóbico. Anteriormente, foi demonstrada a utilização de nanocápsulas de núcleo aquoso preparadas com amido reticulado para liberação de compostos hidrofílicos desencadeada por degradação enzimática (Cap. IV). A imobilização destas NCs em micropartículas de PLLA estabeleceram uma micropartícula multicompartimentada (Capítulo VI).

A aplicação de marcadores fluorescentes permite ilustrar a possibilidade da co-encapsulação de agente terapêuticos hidrofílicos nas nanocápsulas de amido e de hidrofóbicos, na matriz polimérica de PLLA.

A Figura 7.3 apresenta a co-encapsulação de SR 101, marcador fluorescente hidrofílico, previamente encapsulado nas NCs de amido e PMI, marcador hidrofóbico encapsulado na matriz polimérica de PLLA. Resultado obtido por análise em microscopia CSLM.

A localização dos dois marcadores fluorescentes em um mesmo sistema confirmam a arquitetura de partículas multicompartimentadas. As estruturas moleculares do PMI e do SR 101 estão apresentadas nas Figura 7.3b e Figura 7.3c, respectivamente.

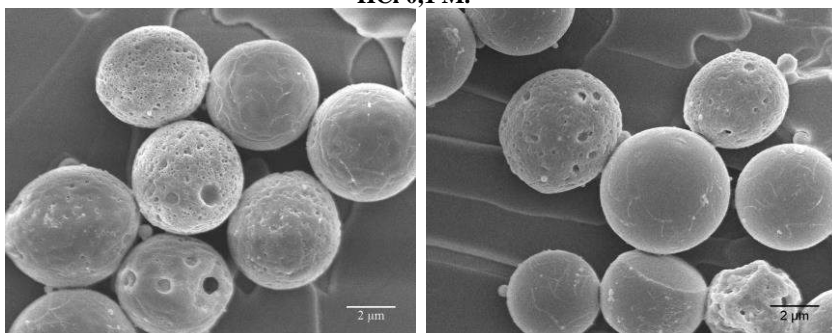
Figura 7.3 Co-encapsulação de NCs de amido reticuladas carregadas com SR 101 (vermelho) e de marcador fluorescente hidrofóbico PMI (verde). (a) Micropartículas MT 5-8. Estruturas moleculares de (b) PMI e (c) SR 101. (d) Micropartículas MT 5-14. Análise realizada por CSLM.



Os resultados obtidos demonstram a habilidade destas partículas encapsularem uma grande variedade de agentes ativos terapêuticos, hidrofílicos e hidrofóbicos, visando aplicação na área biomédica como sistema de liberação controlada de fármacos.

A liberação de compostos desencadeada por degradação, tanto ácida quanto enzimática possibilita novas oportunidades e define a aplicação do sistema de liberação de fármaco controlada. A Figura 7.4 apresenta imagens de SEM de partículas multicompartimentadas de PLLA após 3 dias imersas em solução ácida de HCl 0,1 M. Observa-se que após o período predeterminado, as micropartículas de PLLA e as nanocápsulas de amido reticulado não apresentaram degradação significativa visível.

Figura 7.4 Degradação ácida de micropartículas multicompartimentadas MT 5-8 de PLLA com subunidade de amido reticulado após 3 dias em solução de HCl 0,1 M.



Foi demonstrado previamente que a liberação controlada de SR 101 a partir das nanocápsulas de amido reticulado pode ser desencadeada por reação enzimática com α -amilase (Capítulo IV). Imagens de microscopia de fluorescência foram realizadas nas amostras previamente liofilizadas e redispersas em solução tampão de fosfato 0,05 M (pH 7,4) e observa-se que a distribuição de NCs de amido dentro das micropartículas nesta análise foi homogênea e as micropartículas apresentam um anel mais vermelho, indicando a presença de NCs na superfície das MPs, Figura 7.5a. O resultado apresentado em Figura 6.11b se diferencia do apresentado em Figura 7.3a devido as limitações do microscópio de fluorescência utilizado.

A partir da Figura 7.5b e Figura 7.5c é possível observar o comportamento de degradação das nanocápsulas dentro das micropartículas com 9 mg/ml de α -amilase. A liberação controlada de SR 101 desencadeada por amilase foi previamente investigada redispersando as NCs em solução PBS 0,05 M com diferentes concentrações de amilase (Capítulo IV). Após um dia de reação enzimática, as nanocápsulas localizadas na superfície das micropartículas foram degradadas, baseando-se no fato de

as micropartículas apresentarem fluorescência no vermelho mais fraco na interface das MPs com o meio contínuo contendo amilase (Figura 7.5b). Tal fato se deve ao consumo de amido das NCs e liberação do SR 101. Após 5 dias de reação enzimática, observa-se o consumo de nanocápsulas localizadas no interior das micropartículas (Figura 7.5c).

Figura 7.5 Degradação enzimática de micropartículas multicompartimentadas MT 5-8 de PLLA com subunidade de amido reticulado (a) sem degradação (b) após 1 dia e (c) após 5 dias de reação enzimática com 9 mg/ml de amilase.

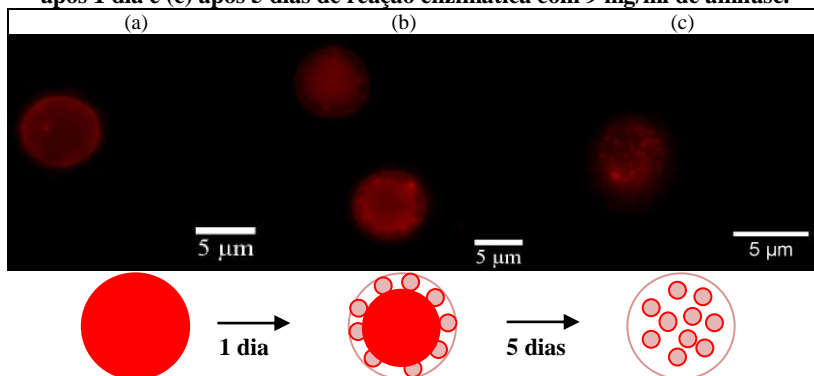
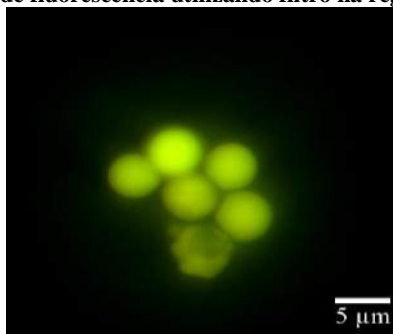


Figura 7.6 Micropartículas multicompartimentadas MT 5-8 de PLLA co-encapsulando PMI e nanocápsulas de amido reticulado SR 101. Imagem de microscopia de fluorescência utilizando filtro na região do verde.

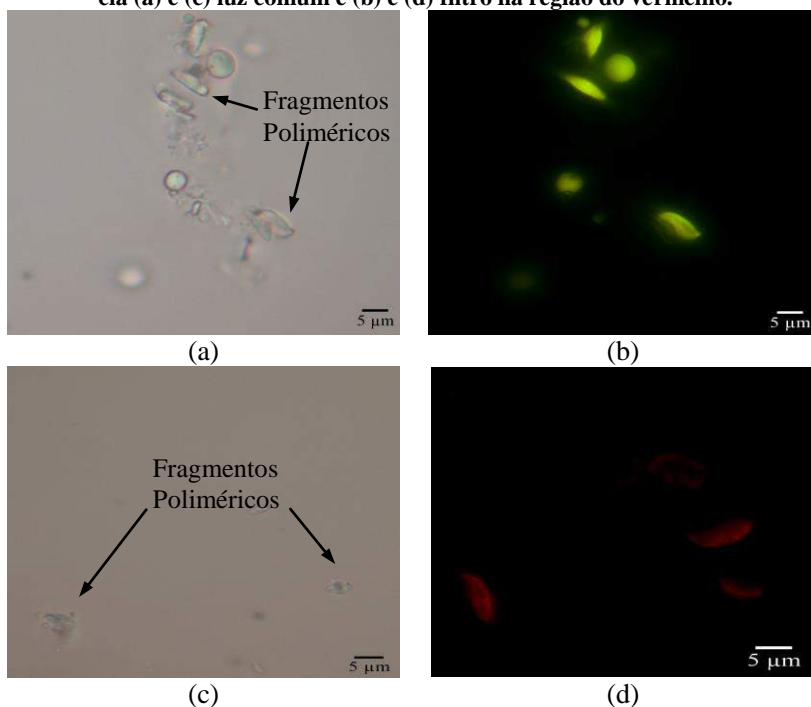


A degradação das micropartículas de PLLA foi investigada aplicando-se 9 mg/ml de proteinase K. NCs carregadas com SR 101 foram co-encapsuladas em micropartículas de PLLA com PMI, marcador fluorescência com excitação na região do verde (Figura 7.6). Após um dia de degradação enzimática com proteinase em solução

tampão de fosfato 0,05 M (pH 7,4) e 37 °C, foi observado em análise de microscopia de fluorescência fragmentos poliméricos, os quais ainda possuem fluorescência, indicando que o PMI não foi liberado devido a sua elevada hidrofobicidade, segundo a Figura 7.7b.

A partir da Figura 7.5 e da Figura 7.7 afirma-se que uma das vantagens significativas do sistema com arquitetura multicompartimentada desenvolvido neste trabalho, além da possibilidade de coencapsulação de uma grande variedade de compostos, é a degradação enzimática seletiva dos polímeros aplicados.

Figura 7.7 Degradação enzimática de micropartículas multicompartimentadas MT 5-8 de PLLA com subunidade de amido reticulando SR 101 e PMI a partir de proteinase K 9 mg/ml. Imagem de microscopia de fluorescência (a) e (c) luz comum e (b) e (d) filtro na região do vermelho.

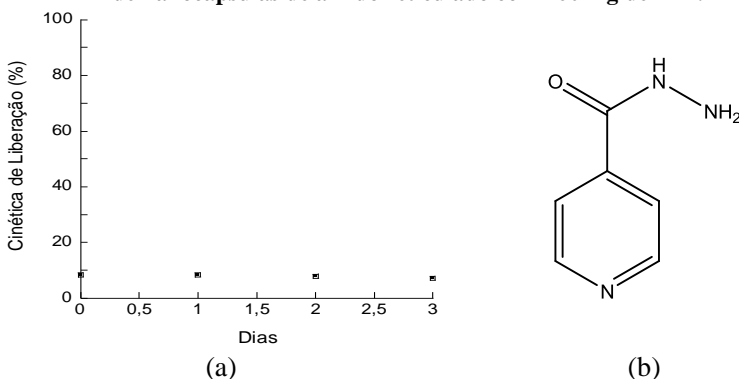


Fármacos que compõem o coquetel de tratamento da tuberculose foram investigados como modelo para aplicação de sistema de liberação controlada de compostos ativos. Isoniazida, fármaco hidrofílico e rifam-

picina, fármaco hidrofóbico foram encapsuladas em seus respectivos compartimentos.

Nanocápsulas sintetizadas com 160 mg de TDI, de acordo com os procedimentos apresentados no Capítulo III, obtiveram eficiência de encapsulamento da isoniazida em torno de 92 %. Foi demonstrado previamente (Capítulo IV), que nanocápsulas sintetizadas com 160 mg de TDI são impermeáveis. Como esperado, após 3 dias, a isoniazida não foi liberada das nanocápsulas, como apresenta a Figura 7.8.

Figura 7.8 (a) Cinética de liberação da isoniazida, apresentada em (b), a partir de nanocápsulas de amido reticulado com 160 mg de TDI.



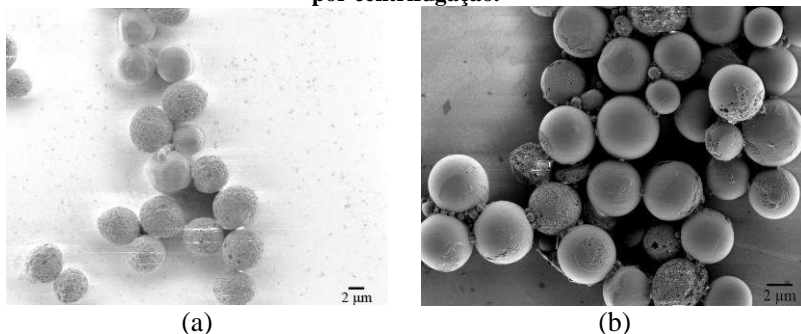
O fármaco hidrofóbico foi encapsulado em micropartículas de PLLA e de PLGA (85:15) em diferentes concentrações, conforme a Tabela 7.1. Observa-se que a eficiência de encapsulação da rifampicina foi relativamente maior na ausência das nanocápsulas e menor ao substituir PLLA por PLGA. Devido a maior hidrofílicidade do PLGA comparada a do PLLA, menor foi a eficiência de encapsulação do fármaco hidrofóbico.

A Figura 7.9 apresenta uma comparação entre as imagens de SEM das micropartículas baseadas na formulações MT 5-8 preparadas com PLLA e PLGA. Observa-se que a morfologia e tamanho encontrados não se diferenciam entre si. Enfatiza-se que a imagem foi obtida da amostra após lavagem para retirada de surfatante livre.

Tabela 7.1 Eficiência de co-encapsulação de rifampicina e NCs de amido em micropartículas poliméricas de PLLA ou de PLGA 85:15, segundo formulação MT 5-8.

Rfp:Polímero	NCs (mg)	Polímero	EE (%) \pm D _v P
1:2	-	PLLA	31,8 \pm 1,4
1:2	70		26,4 \pm 1,5
1:5	70		27,0 \pm 1,2
1:10	70		30,2 \pm 1,0
4:9	70	PLGA	20,3 \pm 0,9

Figura 7.9 Imagem obtida a partir de SEM de micropartículas MT 5-8 preparadas com (a) PLLA e (b) PLGA, ambas com NCs e rifampicina após lavagem por centrifugação.



A lavagem das micropartículas para análise em SEM se faz importante para se observar uma superfície livre de surfatante. Imagens de partículas multicompartimentadas de PLLA com subunidade de amido sem lavagem estão apresentadas na Figura 7.10. Além de se observar uma camada de surfatante sobre as micropartículas, nota-se a presença de cristais do tamanho de aproximadamente 1 μ m de rifampicina livres.

Acredita-se que, devido ao tamanho das micropartículas (\pm 5 μ m), não foi observada liberação da rifampicina em solução PBS a 37 $^{\circ}$ C e utilização de surfatante pulmonar após 3 dias, resultados apresentados na Figura 7.11. Adicionalmente, a liberação desencadeada pela degradação por hidrólise não foi observada devido a alta massa molar do PLLA utilizado. Por outro lado, estudos recentes apresentaram a degradação enzimática do PLLA pela proteinase K. Dessa forma, a ausência de liberação de ambos os fármacos detectada não representa obstáculos na aplicação das micropartículas multicompartimentadas como sistemas

de liberação controlada de compostos ativos uma vez que a liberação pode ser desencadeada por degradação enzimática.

Figura 7.10 (a) Imagem obtida a partir de SEM de micropartículas de PLLA com NCs e rifampicina sem lavagem por centrifugação. **(b)** Estrutura molecular de rifampicina.

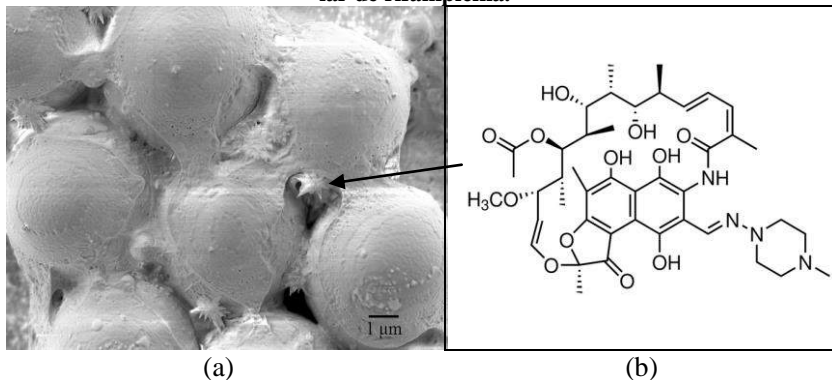
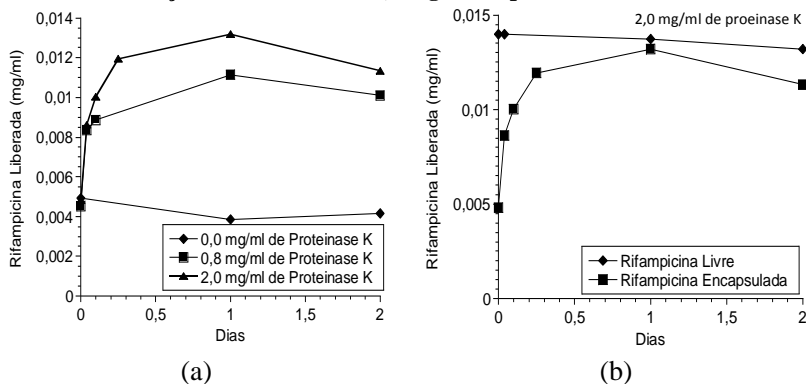


Figura 7.11 (a) Cinética de liberação da rifampicina a partir de degradação enzimática do PLLA por proteinase K. **(b)** Comparação entre a liberação desencadeada por degradação enzimática e estabilidade da rifampicina em solução enzimática com 2,0 mg/ml de proteinase K.



A liberação dos fármacos desencadeada por degradação enzimática foi avaliada em micropartículas multicompartimentadas preparadas segundo a formulação MT 5-8 (Cap VI), contendo uma razão entre rifampicina e PLLA igual a 1:2. Diferentes concentrações de proteinase K foram avaliadas e os resultados estão apresentados na Figura 7.11a. Observa-se que, aumentando-se a concentração de enzima, aumenta a ciné-

tica de liberação da rifampicina. Uma comparação entre a cinética de liberação da rifampicina e a estabilidade da rifampicina em ambiente com proteinase K está apresentada Figura 7.11b. Ambas as curvas apresentaram um leve decaimento após o período de 2 dias.

7.4 CONCLUSÕES

Foi demonstrado que as micropartículas multicompartimentadas desenvolvidas neste trabalho têm grande potencial para encapsulação e liberação de compostos ativos para aplicação como sistemas carreadores de fármacos e microreatores catalíticos, para reações entre compostos induzidas e desencadeadas por degradação enzimática de relevância intracelular.

SR 101 e PMI, marcadores fluorescentes hidrofílico e hidrofóbico, respectivamente, foram encapsulados no sistema multicompartimentado desenvolvido. A partir de análise em microscopia de fluorescência foi demonstrado que os polímeros utilizados para a elaboração da micropartícula subcompartimentalizada apresenta degradação enzimática seletiva. PLLA foi degradado por proteinase K e a amilase degradou apenas as nanocápsulas de amido reticulado.

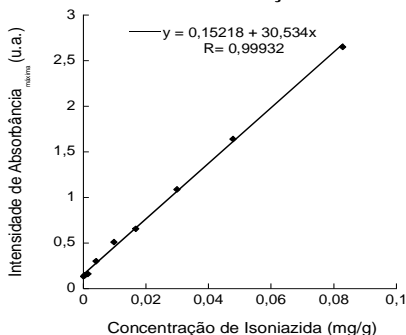
Isoniazida e rifampicina, fármacos que compõem o coquetel de tratamento da tuberculose, foram simultaneamente encapsulados. Estes resultados preliminares demonstram o potencial da aplicação destas micropartículas multicompartimentadas como sistemas carreadores de fármaco para liberação controlada desencadeada por degradação enzimática e administração via inalação oral para tratamento de doenças pulmonares.

7.5 INFORMAÇÕES DE SUPORTE

Perfil de absorvância máxima com relação a concentração de isoniazida: a curva de calibração foi realizada em um espectrofotômetro de UV-vis de acordo com o seguinte procedimento: nanocápsulas de amido reticulado dispersas em ciclohexano foram redispersas em solução PBS contendo SLS e surfatante pulmonar. Após evaporação do solvente, uma alíquota foi separada para adição da isoniazida. Esta solução-mãe de isoniazida foi diluída com a solução de nanocápsulas redispersas em PBS, mantendo as concentrações de NCs, SLS e surfatante pulmonar similar as das amostras. Todas as diluições foram centrifugadas por 4000 rpm por 30 min e análise em espectrometria de UV-vis foi realizada do sobrenadante obtido. A Figura 7.12 apresenta os resultados para a

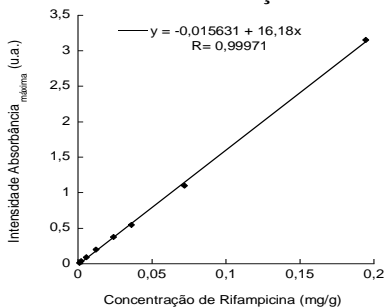
curva de calibração obtida relacionando a absorbância em 261 nm com a concentração do fármaco.

Figura 7.12 Perfil de absorbância com relação a concentração de isoniazida. Curva de calibração.



Perfil de absorbância máxima com relação a concentração de rifampicina: a curva de calibração foi realizada em um espectrofotômetro de UV-vis de acordo com o seguinte procedimento. Rifampicina foi solubilizada em solução PBS contendo surfatante pulmonar. Apesar de rifampicina apresentar caráter hidrofóbico, a presença do surfatante pulmonar auxilia na dispersão do fármaco em meio aquoso. Uma solução-mãe foi preparada e diluída com a solução PBS e surfatante pulmonar. Análise em espectrometria de UV-vis foi realizada. A Figura 7.13 apresenta os resultados para a curva de calibração obtida relacionando a absorbância máxima de 475nm com a concentração do fármaco.

Figura 7.13 Perfil de absorbância com relação a concentração de rifampicina. Curva de calibração.



CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

No presente trabalho, um sistema promissor de liberação controlado de fármacos foi apresentado, o qual possibilita a encapsulação combinada de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos em uma única partícula multicompartimentada. As micropartículas multicompartimentadas desenvolvidas consistem em uma matriz polimérica de poli(ácido láctico) com subunidades de amido reticulado.

Primeiramente, nanocápsulas de amido reticulado foram obtidas a partir da polimerização interfacial com 2,4 – tolueno diisocianato em miniemulsão inversa. Devido as características da técnica de polimerização interfacial em miniemulsão inversa, foram obtidas morfologia de nanocápsulas de núcleo aquoso e casca polimérica composto por grupos uretanos e ureia. A influência de diferentes parâmetros foi avaliada, tais como concentração de surfatante, amido, co-estabilizador, TDI e tipo de sal aplicado sobre o diâmetro médio das nanopartículas e composição da casca polimérica. Em geral, foi observado que o diâmetro das nanogotas obtidas influencia a composição da casca polimérica. Quanto menor o diâmetro inicial das nanogotas, maior a concentração de grupos uretano na composição da casca polimérica. Acredita-se que tal fato se deve ao aumento da área interfacial total das nanogotas, favorecendo a polimerização interfacial entre os grupos NCO do TDI e hidroxilas presentes no amido.

As nanocápsulas preparadas com estruturas casca-núcleo apresentam grande potencial na encapsulação de compostos hidrofílicos. SR 101 foi encapsulada em nanocápsulas preparadas com duas diferentes quantidade de TDI. Foi observado que a eficiência de encapsulação depende do teor de reticulação e, a permeabilidade das nanocápsulas pode ser controlada a partir da concentração de TDI. O aumento da concentração de TDI favoreceu a reticulação, conseqüentemente, minimizou a perda de SR 101 para a fase aquosa contínua.

A biodegradabilidade das nanocápsulas foi demonstrada indiretamente pela cinética de liberação de SR 101 desencadeada a partir da degradação enzimática das nanocápsulas. A cinética de liberação foi estudada a partir de medidas de absorção em espectrofotômetro de UV-vis. As nanocápsulas de amido foram degradadas por diferentes concentrações de α -amilase. Observou-se que concentrações de amilase abaixo de 0,9 mg/ml não apresentaram liberação do SR 101, indicando um processo de degradação muito lento das nanocápsulas reticuladas.

As micropartículas monodispersa de PLLA foram preparadas usando técnica emulsificação por membrana porosa SPG. Foi observado

que o tamanho médio das partículas diminuiu com a diminuição do tamanho de poro da membrana. E a razão entre o tamanho médio de partícula e o tamanho médio de poro da membrana pode ser mantida constante, uma vez que as condições de operação sejam otimizadas para as características da membrana utilizada.

Micropartículas multicompartimentadas foram obtidas a partir da microencapsulação de nanocápsulas em micropartículas de PLLA. A técnica de emulsificação por membrana porosa SPG foi utilizada e diferentes tamanhos de poro de membrana foram avaliados. A eficiência de encapsulação foi determinada com um procedimento confiável a partir de espectroscopia de fluorescência. Observou-se que o tamanho de poro da membrana aplicada têm papel importante na eficiência de encapsulação das nanocápsulas. Análises de microscopias eletrônica de varredura e confocal de varredura a laser foram essenciais na caracterização das micropartículas multicompartimentadas. Foi observado que, de acordo com o procedimento aplicado, a localização das nanocápsulas pode ser delimitada. A modificação da composição da casca polimérica a partir da reação de enxertia do amido com PLLA-NCO-terminado aumentou a internalização das nanocápsulas nas micropartículas.

Os marcadores fluorescentes, SR 101 e PMI, hidrofílico e hidrofóbico, respectivamente, foram encapsulados no sistema multicompartimentado desenvolvido neste trabalho. A partir de análise em microscopia de fluorescência foi demonstrado que os polímeros escolhidos para a elaboração da micropartícula compartimentalizada apresentaram degradação enzimática seletiva. PLLA foi degradado por proteinase K, enquanto que a amilase degradou apenas as nanocápsulas de amido reticulado. Adicionalmente, observou-se que o sistema multicompartimentado se apresentou estável em meio ácido durante cinco dias.

Isoniazida e rifampicina, fármacos que compõem o coquetel de tratamento da tuberculose, foram simultaneamente encapsulados. Estes resultados preliminares demonstraram o potencial da aplicação destas micropartículas multicompartimentadas como sistemas carreadores de fármaco para liberação controlada desencadeada por degradação enzimática e administração via inalação oral para tratamento de doenças pulmonares.

A habilidade de indução de morte de bactérias causadoras da tuberculose das nanocápsulas e micropartículas multicompartimentadas estão em andamento, separadamente. As etapas futuras deste trabalho envolvem um estudo aprofundado para aplicação da micropartícula multicompartimentada como sistema de liberação de fármaco para administração pulmonar. Avaliação da aerodinâmica das micropartículas multi-

compartimentadas deve ser realizada, de acordo com os pré-requisitos para aplicação em inaladores para administração pulmonar de fármacos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-JAMAL, W. T.; KOSTARELOS, K. Construction of nanoscale multicompartiment liposomes for combinatory drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 331, n. 2, p. 182–5, 1 mar. 2007.

ANGADI, S. C.; MANJESHWAR, L. S.; AMINABHAVI, T. M. Interpenetrating polymer network blend microspheres of chitosan and hydroxyethyl cellulose for controlled release of isoniazid. **International journal of biological macromolecules**, v. 47, n. 2, p. 171–9, 1 ago. 2010.

ANTONIETTI, M.; LANDFESTER, K. Polyreactions in miniemulsions. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 27, p. 689–757, 2001.

ASUA, J. M. Miniemulsion polymerization. **Progress in Polymer Science**, v. 27, n. 7, p. 1283–1346, set. 2002.

AZEVEDO, H. S.; REIS, R. L. Encapsulation of alpha-amylase into starch-based biomaterials: an enzymatic approach to tailor their degradation rate. **Acta biomaterialia**, v. 5, n. 8, p. 3021–30, out. 2009.

BABALIK, A. et al. Plasma concentrations of isoniazid and rifampin are decreased in adult pulmonary tuberculosis patients with diabetes mellitus. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 11, p. 5740–2, nov. 2013.

BAIER, G. et al. Cross-linked starch capsules containing dsDNA prepared in inverse miniemulsion as “nanoreactors” for polymerase chain reaction. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 4, p. 960–8, 12 abr. 2010.

BAIER, G. et al. Suppressing unspecific cell uptake for targeted delivery using hydroxyethyl starch nanocapsules. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 9, p. 2704–15, 10 set. 2012.

BAIER, G. et al. Enzyme responsive hyaluronic acid nanocapsules containing polyhexanide and their exposure to bacteria to prevent infection. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 4, p. 1103–12, 8 abr. 2013.

BAO, D. et al. Preparation of Monodispersed Polymer Microspheres by SPG Membrane Emulsification-Solvent Evaporation Technology. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 28, n. 3, p. 485–490, mar. 2007.

BATHFIELD, M.; GRAILLAT, C.; HAMAIDE, T. Encapsulation of High Biocompatible Hydrophobe Contents in Nonionic Nanoparticles by Miniemulsion Polymerization of Vinyl Acetate or Styrene: Influence of the Hydrophobe Component on the Polymerization. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 206, n. 22, p. 2284–2291, 14 nov. 2005.

BENEKE, C. E.; VILJOEN, A. M.; HAMMAN, J. H. Polymeric plant-derived excipients in drug delivery. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2602–20, jan. 2009.

BERNARDY, N. et al. Nanoencapsulation of Quercetin via Miniemulsion Polymerization. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 6, n. 2, p. 181–186, 1 abr. 2010.

BHARALI, D. J. et al. Cross-linked polyvinylpyrrolidone nanoparticles: a potential carrier for hydrophilic drugs. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 258, n. 2, p. 415–423, fev. 2003.

BHARATWAJ, B. et al. The potential for the noninvasive delivery of polymeric nanocarriers using propellant-based inhalers in the treatment of Chlamydial respiratory infections. **Biomaterials**, v. 31, n. 28, p. 7376–85, out. 2010.

BOHÓRQUEZ, S. J.; ASUA, J. M. Particle nucleation in high solids batch miniemulsion polymerization stabilized with a polymeric surfactant. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 46, n. 19, p. 6407–6415, 1 out. 2008.

BOYER, C.; ZASADZINSKI, J. A. NIH Public Access. v. 1, n. 3, p. 176–182, 2008.

BYRON, P. Determinants of drug and polypeptide bioavailability from aerosols delivered to the lung. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 5, p. 107 – 132, 1990.

CAO, Z. et al. Synthesis of narrowly size-distributed metal salt/poly(HEMA) hybrid particles in inverse miniemulsion: versatility and

mechanism. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 26, n. 23, p. 18008–15, 7 dez. 2010.

CAO, Z.; ZIENER, U.; LANDFESTER, K. Synthesis of Narrowly Size-Distributed Thermosensitive Poly(N -isopropylacrylamide) Nanocapsules in Inverse Miniemulsion. **Macromolecules**, v. 43, n. 15, p. 6353–6360, 10 ago. 2010.

CAPEK, I. On inverse miniemulsion polymerization of conventional water-soluble monomers. **Advances in colloid and interface science**, v. 156, n. 1-2, p. 35–61, 22 abr. 2010.

CARDOSO, P. B.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Encapsulation of Jojoba and Andiroba Oils by Miniemulsion Polymerization. Effect on Molar Mass Distribution. **Macromolecular Symposia**, v. 324, n. 1, p. 114–123, 4 fev. 2013.

CHANDRAWATI, R. et al. Cholesterol-mediated anchoring of enzyme-loaded liposomes within disulfide-stabilized polymer carrier capsules. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5988–98, out. 2009.

CHANDRAWATI, R. et al. Multicompartment Particle Assemblies for Bioinspired Encapsulated Reactions. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 2, n. 20, p. 2639–2649, 20 out. 2011.

CHELLAT, F. et al. Therapeutic potential of nanoparticulate systems for macrophage targeting. **Biomaterials**, v. 26, n. 35, p. 7260–75, dez. 2005.

CHRISTIAN, D. A et al. Polymersome carriers: from self-assembly to siRNA and protein therapeutics. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 71, n. 3, p. 463–74, mar. 2009.

COELHO, J. F. et al. Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. **The EPMA journal**, v. 1, n. 1, p. 164–209, mar. 2010.

COEN, E. M. et al. Modelling particle size distributions and secondary particle formation in emulsion polymerisation. **Polymer**, v. 39, n. 26, p. 7099–7112, 2006.

COHEN-SELA, E. et al. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 133, n. 2, p. 90–5, 19 jan. 2009.

COSTA, R. R. et al. Multifunctional compartmentalized capsules with a hierarchical organization from the nano to the macro scales. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 7, p. 2403–10, 8 jul. 2013.

CRESPY, D. et al. Polymeric Nanoreactors for Hydrophilic Reagents Synthesized by Interfacial Polycondensation on Miniemulsion Droplets. **Macromolecules**, v. 40, n. 9, p. 3122–3135, maio 2007.

CRESPY, D.; LANDFESTER, K. Miniemulsion polymerization as a versatile tool for the synthesis of functionalized polymers. **Beilstein journal of organic chemistry**, v. 6, p. 1132–48, jan. 2010.

DEOL, P.; KHULLER, G. K. Lung specific stealth liposomes: stability, biodistribution and toxicity of liposomal antitubercular drugs in mice. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1334, n. 2-3, p. 161–72, 15 mar. 1997.

DEOL, P.; KHULLER, G. K.; JOSHI, K. Therapeutic efficacies of isoniazid and rifampin encapsulated in lung-specific stealth liposomes against *Mycobacterium tuberculosis* infection induced in mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 6, p. 1211–4, jun. 1997.

DONALD, P. R.; MARITZ, J. S.; DIACON, A H. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of rifampicin in adults and children in relation to the dosage recommended for children. **Tuberculosis**, v. 91, n. 3, p. 196–207, maio 2011.

DUTT, M.; KHULLER, G. K. Liposomes and PLG microparticles as sustained release antitubercular drug carriers--an in vitro-in vivo study. **International journal of antimicrobial agents**, v. 18, n. 3, p. 245–52, set. 2001.

EVORA, C. et al. Relating the phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages to surface chemistry: the effect of 1, 2-dipalmitoylphosphatidylcholine. **Journal of controlled release**, v. 51, p. 143–152, 1998.

FONTENOTT, K.; SCHORK, F. J. Sensitivities of Droplet Size and Stability in Monomeric Emulsions. p. 373–385, 1993.

GARLOTTA, D. A literature review of poly (lactic acid). **Journal of Polymers and the Environment**, v. 9, n. 2, p. 63–84, 2001.

GAUMET, M.; GURNY, R.; DELIE, F. Fluorescent biodegradable PLGA particles with narrow size distributions: preparation by means of selective centrifugation. **International journal of pharmaceutics**, v. 342, n. 1-2, p. 222–30, 5 set. 2007.

HAMDI, G.; PONCHEL, G. Enzymatic degradation of epichlorohydrin crosslinked starch microspheres by alpha-amylase. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 6, p. 867–875, 1999.

HAMDI, G.; PONCHEL, G.; DUCHÊNE, D. An original method for studying in vitro the enzymatic degradation of cross-linked starch microspheres. **Journal of Controlled Release**, v. 55, n. 2-3, p. 193–201, 1998.

HANS, M. L.; LOWMAN, A. M. B iodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. v. 6, n. September, p. 319–327, 2002.

HELBERT, W.; SCHÜLEIN, M.; HENRISSAT, B. Electron microscopic investigation of the diffusion of *Bacillus licheniformis* α -amylase into corn starch granules. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 19, n. 3, p. 165–169, out. 1996.

HERRERA, V. et al. Effect of in-Situ-Produced Block Copolymer on Latex Particle Morphology. **Macromolecules**, v. 39, n. 20, p. 6969–6974, out. 2006.

HUANG, H. E. et al. Miniemulsion Copolymerization of Styrene and Butyl Acrylate Initiated by Redox System at Lower Temperature- Preparation and Polymerization of Miniemulsion. p. 2029–2039, 1997.

HUREAUX, J. et al. Lipid nanocapsules: ready-to-use nanovectors for the aerosol delivery of paclitaxel. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V**, v. 73, n. 2, p. 239–46, out. 2009.

- IBIAPINA, C. C.; CRUZ, A. A; CAMARGOS, P. A M.
[Hydrofluoroalkane as a propellant for pressurized metered-dose inhalers: history, pulmonary deposition, pharmacokinetics, efficacy and safety]. **Jornal de pediatria**, v. 80, n. 6, p. 441–6, 2004.
- ITO, F.; MAKINO, K. Preparation and properties of monodispersed rifampicin-loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 39, n. 1-2, p. 17–21, 25 nov. 2004.
- JOHNSTON, D. A; MUKERJEA, R.; ROBYT, J. F. Preparation and characterization of new and improved soluble-starches, -amylose, and - amylopectin by reaction with benzaldehyde/zinc chloride. **Carbohydrate research**, v. 346, n. 17, p. 2777–84, 13 dez. 2011.
- KIM, H.-Y. et al. Characterization of nanoparticles prepared by acid hydrolysis of various starches. **Starch - Stärke**, v. 64, n. 5, p. 367–373, 19 maio 2012.
- KIM, M. D. et al. Segmented polyurethane-based microparticles: Synthesis, properties, and isoniazid encapsulation and kinetics of release. **Polymer Science Series A**, v. 48, n. 12, p. 1257–1262, dez. 2006.
- KLEINSTREUER, C.; ZHANG, Z.; DONOHUE, J. F. Targeted drug-aerosol delivery in the human respiratory system. **Annual review of biomedical engineering**, v. 10, p. 195–220, jan. 2008.
- KOHANE, D. S. Microparticles and Nanoparticles for Drug Delivery. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 203–209, 2007.
- KORHONEN, H.; HELMINEN, A.; SEPPA, J. V. Synthesis of polylactides in the presence of co-initiators with different numbers of hydroxyl groups. **Polymer**, v. 42, p. 7541–7549, 2001.
- KREUTER, J. Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery. **Journal of anatomy**, v. 189 (Pt 3, p. 503–5, dez. 1996.
- KUKIZAKI, M. Microbubble formation using asymmetric Shirasu porous glass (SPG) membranes and porous ceramic membranes—A comparative study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 340, n. 1-3, p. 20–32, maio 2009.

KUKIZAKI, M.; NAKASHIMA, T. Acid Porous Leaching Process in the from Preparation of Glass Glass Membranes in the Na₂O-CaO-MgO-Al₂O₃-B₂O₃-SiO₂ System. **Membrane**, v. 29, n. 5, p. 301–308, 2004.

KULYGIN, O. et al. Subcompartmentalized polymer hydrogel capsules with selectively degradable carriers and subunits. **Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 6, n. 14, p. 1558–64, 19 jul. 2010.

LAI, M.-K. et al. Application of gold nanoparticles to microencapsulation of thioridazine. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 111, n. 3, p. 352–61, abr. 2006.

LANDFESTER, K. et al. Formulation and Stability Mechanisms of Polymerizable Miniemulsions. **Macromolecules**, v. 32, n. 16, p. 5222–5228, ago. 1999.

LANDFESTER, K. Preparation of polymer and hybrid colloids by miniemulsion for biomedical application. In: ELAISSARI, A. (Ed.). **Colloidal Polymers Synthesis and Characterization**. [s.l.] CRC Press, 2003. v. 20036129.

LANDFESTER, K. Synthesis of Colloidal Particles in Miniemulsions. **Annual Review of Materials Research**, v. 36, n. 1, p. 231–279, ago. 2006.

LE CORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Starch nanoparticles: a review. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 5, p. 1139–1153, 10 maio 2010.

LEIMANN, F. V. et al. Hydrolysis of poly(hydroxybutyrate- co - hydroxyvalerate) nanoparticles. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 128, n. 5, p. 3093–3098, 5 jun. 2013.

LIECHTY, W. B. et al. Polymers for drug delivery systems. **Annual review of chemical and biomolecular engineering**, v. 1, p. 149–73, jan. 2010.

LIMOUZIN, C. et al. Anionic Polymerization of n-Butyl Cyanoacrylate in Emulsion and Miniemulsion. **Macromolecules**, v. 36, p. 667–674, 2003.

LORENCEAU, E. et al. Generation of polymerosomes from double-emulsions. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 21, n. 20, p. 9183–6, 27 set. 2005.

- MA, G.; NAGAI, M.; OMI, S. Preparation of uniform poly(lactide) microspheres by employing the Shirasu Porous Glass (SPG) emulsification technique. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 153, p. 383–394, 1999.
- MANCA, M. L. et al. Release of rifampicin from chitosan, PLGA and chitosan-coated PLGA microparticles. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 67, n. 2, p. 166–70, 1 dez. 2008.
- MISRA, A. et al. Inhaled drug therapy for treatment of tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 91, n. 1, p. 71–81, jan. 2011.
- MOHAMAD, S.; IBRAHIM, P.; SADIKUN, A. Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to isoniazid and its derivative, 1-isonicotinyl-2-nonanoyl hydrazine: investigation at cellular level. **Tuberculosis**, v. 84, n. 1-2, p. 56–62, jan. 2004.
- MUKERJEA, R.; SLOCUM, G.; ROBYT, J. F. Determination of the maximum water solubility of eight native starches and the solubility of their acidic-methanol and -ethanol modified analogues. **Carbohydrate research**, v. 342, n. 1, p. 103–10, 15 jan. 2007.
- NAZIR, A.; SCHROËN, K.; BOOM, R. Premix emulsification: A review. **Journal of Membrane Science**, v. 362, n. 1-2, p. 1–11, out. 2010.
- NGUYEN, Q. D.; KRISTENSEN, P. G. Experimental and modelling studies of the flow properties of maize and waxy maize starch pastes. v. 70, p. 165–171, 1998.
- OH, D. H. et al. Effect of process parameters on nanoemulsion droplet size and distribution in SPG membrane emulsification. **International journal of pharmaceutics**, v. 404, n. 1-2, p. 191–7, 14 fev. 2011.
- PALEOS, C. M. et al. Formation of artificial multicompartment vesosome and dendrosome as prospected drug and gene delivery carriers. **Journal of controlled release**, v. 170, n. 1, p. 141–52, 28 ago. 2013.
- PANDEY, R. et al. Nanoparticle encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 83, n. 6, p. 373–378, jan. 2003.

PANDEY, R.; AHMAD, Z. Nanomedicine and experimental tuberculosis: facts, flaws, and future. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, v. 7, n. 3, p. 259–72, jun. 2011.

PANDEY, R.; KHULLER, G. K. Nanotechnology based drug delivery system(s) for the management of tuberculosis. **Indian journal of experimental biology**, v. 44, n. 5, p. 357–66, maio 2006.

PARK, S.-J.; KIM, K.-S. Influence of hydrophobe on the release behavior of vinyl acetate miniemulsion polymerization. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 46, n. 1, p. 52–6, 25 nov. 2005.

PARK, T. G. Degradation of poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres : effect of copolymer composition. **Biomaterials**, v. 16, n. 15, p. 1123–1130, 1995.

PASQUALI, R. C.; TAUROZZI, M. P.; BREGNI, C. Some considerations about the hydrophilic-lipophilic balance system. **International journal of pharmaceutics**, v. 356, n. 1-2, p. 44–51, 22 maio 2008.

RAHMOUNI, M. et al. Enzymatic degradation of cross-linked high amylose starch tablets and its effect on in vitro release of sodium diclofenac. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 51, n. 3, p. 191–198, maio 2001.

RAMACHANDRA, L. et al. Phagosomal processing of Mycobacterium tuberculosis antigen 85B is modulated independently of mycobacterial viability and phagosome maturation. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 1097–1105, 2005.

ROMIO, A. P. et al. Nanocapsules by Miniemulsion Polymerization with Biodegradable Surfactant and Hydrophobe. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 210, n. 9, p. 747–751, maio 2009.

ROMIO, A. P. et al. Encapsulation of magnetic nickel nanoparticles via inverse miniemulsion polymerization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 129, n. 3, p. 1426–1433, 5 ago. 2013.

ROSENBAUER, E.-M.; LANDFESTER, K.; MUSYANOVYCH, A. Surface-active monomer as a stabilizer for polyurea nanocapsules synthesized via interfacial polyaddition in inverse miniemulsion.

- Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 25, n. 20, p. 12084–91, 20 out. 2009.
- RUI-HE et al. A study on grafting poly(1,4-dioxan-2-one) onto starch via 2,4-tolylene diisocyanate. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, n. 1, p. 28–34, jul. 2006.
- SARIKAYA, E. et al. Comparison of degradation abilities of α - and β -amylases on raw starch granules. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 7, p. 711–715, fev. 2000.
- SHUM, H. C. et al. Multicompartment Polymersomes from Double Emulsions. **Angewandte Chemie**, v. 123, n. 7, p. 1686–1689, 11 fev. 2011.
- SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 70, n. 1-2, p. 1–20, 29 jan. 2001.
- STÄDLER, B. et al. Polymer hydrogel capsules: en route toward synthetic cellular systems. **Nanoscale**, v. 1, n. 1, p. 68–73, out. 2009.
- STAUDT, T. et al. Magnetic Polymer/Nickel Hybrid Nanoparticles Via Miniemulsion Polymerization. **Macromolecular Chemistry and Physics**, p. n/a–n/a, 24 jul. 2013.
- STEINMACHER, F. R. et al. Kinetics of MMA and VAc Miniemulsion Polymerizations Using Miglyol and Castor Oil as Hydrophobe and Liquid Core. **Chemical Engineering & Technology**, v. 33, n. 11, p. 1877–1887, 5 nov. 2010.
- TIARKS, F.; LANDFESTER, K.; ANTONIETTI, M. Preparation of Polymeric Nanocapsules by Miniemulsion Polymerization. **Langmuir**, v. 17, n. 3, p. 908–918, fev. 2001.
- TOMODA, K.; MAKINO, K. Effects of lung surfactants on rifampicin release rate from monodisperse rifampicin-loaded PLGA microspheres. v. 55, p. 115–124, 2007.

TYAGI, A. K.; NANGPAL, P.; SATCHIDANANDAM, V. Development of vaccines against tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 91, n. 5, p. 469–78, set. 2011.

VALÉRIO, A.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Preparation of Poly (Urethane-urea) Nanoparticles Containing Açai Oil by Miniemulsion Polymerization. **polímeros**, v. 23, n. 4, p. 451–455, 2013.

VERT, M. et al. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 3, p. 432–446, 1992.

VLADISAVLJEVIĆ, G. et al. Glass membrane emulsification: Characterisation of membrane structure by high-resolution X-ray microtomography and microscopic observation of droplet formation. **Journal of Membrane ...**, 2007.

VLADISAVLJEVIĆ, G. T.; KOBAYASHI, I.; NAKAJIMA, M. Production of uniform droplets using membrane, microchannel and microfluidic emulsification devices. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 13, n. 1, p. 151–178, 18 fev. 2012.

VLADISAVLJEVIĆ, G. T.; SHIMIZU, M.; NAKASHIMA, T. Production of multiple emulsions for drug delivery systems by repeated SPG membrane homogenization: Influence of mean pore size, interfacial tension and continuous phase viscosity. **Journal of Membrane Science**, v. 284, n. 1-2, p. 373–383, 1 nov. 2006.

VRIGNAUD, S.; BENOIT, J.-P.; SAULNIER, P. Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 33, p. 8593–604, nov. 2011.

WAGH, S. J.; DHUMAL, S. S.; SURESH, A. K. An experimental study of polyurea membrane formation by interfacial polycondensation. **Journal of Membrane Science**, v. 328, n. 1-2, p. 246–256, fev. 2009.

WILSON, R.; VAN SCHIE, B. J.; HOWES, D. Overview of the preparation, use and biological studies on polyglycerol polyricinoleate (PGPR). **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 36, n. 9-10, p. 711–8, 1998.

ZANETTI-RAMOS, B. G. et al. Polyurethane nanoparticles from a natural polyol via miniemulsion technique. **Polymer**, v. 47, n. 24, p. 8080–8087, nov. 2006.

ZANETTI-RAMOS, B. G. Biopolymers Employed in Drug Delivery. In: KALIA, S.; AVÉROUS, L. (Eds.). **Biopolymers: Biomedical and Environmental Applications**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011. p. 559–573.

ZENG, X.; MARTIN, G.; MARRIOTT, C. The controlled delivery of drugs to the lung. **International journal of pharmaceutics**, n. 124, p. 149 – 164, 1995.

ZYDOWICZ, N.; CHAUMONT, P.; SOTO-PORTAS, M. Formation of aqueous core polyamide microcapsules obtained via interfacial polycondensation Optimization of the membrane formation through pH control. **Journal of Membrane Science**, v. 189, p. 41–58, 2001.