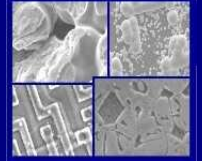




**PUCRS**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E  
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Faculdade de Engenharia  
Faculdade de Física  
Faculdade de Química



**PGETEMA**

## **PREPARAÇÃO DE MICRO E NANOESFERAS DE PLGA COM MENTOL**

**JULIANA PELISOLI HOLZ**  
ENGENHEIRA QUÍMICA

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA  
E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

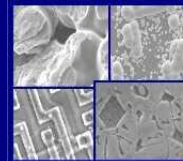
**Porto Alegre**  
**Janeiro, 2011**



PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E  
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Faculdade de Engenharia  
Faculdade de Física  
Faculdade de Química



PGETEMA

## **PREPARAÇÃO DE MICRO E NANOESFERAS DE PLGA COM MENTOL**

**JULIANA PELISOLI HOLZ**

ENGENHEIRA QUÍMICA

ORIENTADOR: Profa. Dra. ROSANE ANGÉLICA LIGABUE

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. SANDRA MARA DE OLIVEIRA EINLOFT

Trabalho realizado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

*Trabalho alcançado em cooperação com a Hewlett-Packard Brasil Ltda. e com recursos provenientes da Lei de Informática (Lei nº 8.248, de 1991).*

**Porto Alegre**

**Janeiro, 2011**

*O único homem que se educa é aquele que aprendeu como aprender; que aprendeu como se adaptar e mudar; que se capacitou de que nenhum conhecimento é seguro, que nenhum processo de buscar conhecimento oferece uma base de segurança.*

*(Carl R. Rogers)*

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Norberto e Isabel, ao meu irmão, Marcelo e ao meu namorado Marcelo, que vêm me ajudando na conquista da realização de meus sonhos, com apoio, incentivo, atenção, compreensão e, sobretudo, pelo amor e carinho que me dedicam estando sempre presentes em minha vida. E aos familiares e amigos que sempre estiveram ao meu lado.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha orientadora Dr<sup>a</sup> Rosane Ligabue pelo incentivo, conhecimento, e oportunidade que me foram oferecidos. A professora Dr<sup>a</sup> Sandra Einloft pelo apoio e co-orientação.

Aos professores, Carlos e Jeane, e amigos do LOR pelos ensinamentos e coleguismo. Ainda agradeço aos professores Carlos, Rubem e Vanusca pela participação nesta banca.

Aos professores e aos funcionários das Faculdades de Engenharia e de Química da PUCRS pelo conhecimento adquirido e auxílio na realização desse trabalho. Em particular ao professor Tiziano que colaborou para realização desta pesquisa. Aos professores do Programa de Pós Graduação pelos novos conhecimentos adquiridos durante a realização desse mestrado. A HP pela bolsa concedida. Aos funcionários e colegas do PGTEMA.

Em especial agradeço a Vanessa, a Viviane, a Camila, a Emanuelli, ao Vinícius, ao Leonardo e ao Vladimir pela amizade e ajuda em todas as horas. E a todos que de alguma forma contribuíram para construção desse trabalho.

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA .....</b>	<b>4</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>5</b>
<b>SUMÁRIO .....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>14</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
2.1. Objetivos Específicos .....	17
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
3.1. Nanotecnologia .....	18
3.2. Nanopartículas .....	19
3.3. Preparação de Micro e Nanopartículas .....	21
3.3.1. Materiais encapsulantes .....	21
3.3.2. Métodos de micro e nanoencapsulação .....	22
3.3.2.1. Emulsificação seguida de evaporação do solvente .....	25
3.3.3. Liofilização .....	27
3.4. Substâncias com aromas .....	27
3.4.1. Mentol .....	31
3.5. Polímeros Biodegradáveis .....	31
3.5.1. Polímeros de ácidos láctico (PLA) e glicólico (PGA) e o copolímero (PLGA) .....	33
3.5.1.1. Caracterização de nanopartículas de PLGA .....	36
3.6. Liberação do agente ativo .....	38
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
4.1. Materiais.....	41

4.1.1. Matérias-primas e solventes .....	41
<b>4.2. Métodos.....</b>	<b>41</b>
4.2.1. Obtenção das nanopartículas de PLGA .....	41
4.2.2. Técnicas de Caracterização .....	46
4.2.2.1. Espectroscopia Vibracional de Infravermelho (IV) .....	46
4.2.2.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	46
4.2.2.3. Análise Termogravimétrica (TGA).....	47
4.2.2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	47
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>5.1. Efeito dos parâmetros de processo na formação das partículas de PLGA/Mentol.....</b>	<b>48</b>
5.1.1. Velocidade de agitação.....	48
5.1.2. Massa molecular do PLGA .....	49
5.1.3. Tempo de evaporação do solvente.....	49
5.1.4. Concentração de surfactante PVA na fase aquosa A2.....	55
5.1.5. Proporção Mentol/PLGA .....	59
5.1.6. Tempo de liofilização .....	62
<b>5.2. Propriedades térmicas das nanopartículas de PLGA/mentol .....</b>	<b>64</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>66</b>
<b>7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>69</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>76</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.....20
- Figura 3.2. (A) microesferas de PCL (aumento 20 X); (B) microesferas de P(3HB) (aumento 20 X); (C) microesfera da blenda P(3HB) /PCL 90/10 (aumento 200 X). Todas têm o pesticida malation retido em seu interior.22
- Figura 3.3. Métodos usuais, empregados na preparação de nanopartículas poliméricas, baseados na utilização de monômeros dispersos (A; B) ou na precipitação de polímeros pré-formados (C).....24
- Figura 3.4. Pirâmide estrutural de um perfume.....28
- Figura 3.5. Estrutura química das moléculas das seis fragrâncias .....29
- Figura 3.6. Representação de nanopartículas com razão mentol/polímero 1:1 preparadas com concentração inicial de 4000 ppm de polímero: (a) MEV (b) MET e (c) MFA.....30
- Figura 3.7. Estruturas químicas dos ácidos láctico e glicólico.....34
- Figura 3.8. Estrutura química de Poli (lactato-co-glicolato) – PLGA .....35
- Figura 3.9. Micrografia eletrônica de varredura mostrando microesferas de PLGA após o preparo (A) e após a liberação do antígeno encapsulado (B). ...36
- Figura 3.10. Curvas de TGA obtidas com fluxo de ar atmosférico de 100 mL/min e aquecimento de 20°C/min das amostras: A) PLGA puro e B) Nanopartículas de PLGA.....38
- Figura 3.11. Modelo esquemático da vacina de dose única (“*singleshot vaccine*”) baseada no encapsulamento de antígenos em microesferas de PLGA.40
- Figura 4.1. Fluxograma do processo por emulsão múltipla e evaporação do solvente para obtenção de nanopartículas de PLGA/mentol. ....43
- Figura 4.2. Liofilizador .....44
- Figura 5.1. Micrografias das nanopartículas NP-1 (a) e NP-2 (b), com o aumento de 4000X.....49



Figura 5.2. Espectro de infravermelho do PLGA puro. ....	51
Figura 5.3. Espectro de infravermelho do mentol puro. ....	52
Figura 5.4. Espectro de infravermelho das nanoesferas NP-3.....	52
Figura 5.5. Espectro de infravermelho (técnica de transmissão) das nanoesferas NP-3. ....	53
Figura 5.6. Micrografias do PLGA puro (a), do mentol (b) e do PVA (c) aumentos de 4000X.....	53
Figura 5.7. Micrografias das nanopartículas NP-10 (a) e NP-11 (b), com o aumento de 4000X.....	54
Figura 5.8. Micrografias das nanoesferas NP-3, com os aumentos de: a) 2000X ; b) 4000X.....	55
Figura 5.9. Micrografias das nanoesferas NP- 6, com o aumento de 4000X.....	55
Figura 5.10. Micrografias das nanocápsulas de policaprolactona estabilizadas com PVA. ....	55
Figura 5.11. Espectro de infravermelho das nanoesferas NP-6 (1% de PVA m/v). ..	56
Figura 5.12. Espectro de infravermelho das nanoesferas NP-7 (0,75% de PVA m/v).57	
Figura 5.13. Espectro de infravermelho das nanoesferas NP-8 (0,5% de PVA m/v).57	
Figura 5.14. Espectro de infravermelho das nanoesferas NP-6, NP-7 e NP-8. ....	58
Figura 5.15. Espectro de infravermelho das nanopartículas NP-9.....	60
Figura 5.16. Espectro de infravermelho das nanoesferas NP-6 e NP-9. ....	60
Figura 5.17. Micrografias das nanopartículas NP-4, com os aumentos de: a) 4000X ; b) 8000X.....	63
Figura 5.18. Micrografias das nanopartículas NP-5, com os aumentos de: a) 8000X ; b) 16000X.....	63
Figura 5.19. Termogramas: a) PLGA b) mentol c) PVA d) NP-5 e) NP-3 f) NP-9. ....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Eficiência de encapsulamento da PRZ nas nanopartículas de PLGA ...	26
Tabela 4.1. Reagentes e solventes utilizados na preparação das nanopartículas ...	41
Tabela 4.2. Parâmetros avaliados na preparação das nanopartículas obtidas a partir da técnica de emulsão múltipla e evaporação do solvente. ....	45
Tabela 5.1. Relação entre alturas dos picos de PLGA e mentol das NP-6, NP-7 e NP-8. ....	58
Tabela 5.2. Relação de altura entre os picos de PLGA e mentol das NP-6 e NP-9. ....	61
Tabela 5.3. Eficiência de incorporação de mentol nas NP-6, NP-7, NP-8 e NP-9. ....	61
Tabela 5.4. Propriedades térmicas obtidas pela técnica de DSC. ....	62

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AA	Agente Ativo
A <sub>1</sub>	primeira fase aquosa
A <sub>2</sub>	solução aquosa de PVA
ABDI	Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial
A <sub>1</sub> /O	emulsão primária
A <sub>1</sub> /O/A <sub>2</sub>	emulsão múltipla
a/o/a	água/óleo/água
a/o/o	água/óleo/óleo
a/o/a/o	água/óleo/ água/óleo
a/o/o/o	água/óleo/óleo/óleo
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial (do inglês, <i>Diferencial Scanning Calorimetry</i> )
FDA	do inglês, <i>Food and Drug Administration of USA</i>
FTIR	Espectroscopia Vibracional de Infravermelho (do inglês, <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> )
h	hora
IV	Infravermelho
m/m	massa/massa
MM	massa molecular (g/mol)
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFA	Microscopia de Força Atômica
m/v	massa/volume
N <sub>2</sub>	nitrogênio
NC	Nanocápsulas
NE	Nanoesferas
NP	Nanopartículas
O	fase oleosa
o/a	óleo/água
o/o	óleo/óleo
PCL	Poli ( $\epsilon$ -caprolactona)

PDLLA	Poli (D, L – ácido láctico)
PGA	Poli (ácido glicólico)
PHA	Poli hidroxialcanoatos
P(3HB)	Poli (3-hidroxibutirato)
P(3HV)	Poli (3-hidroxivalerato)
PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Poli (ácido láctico-co-glicólico)
PRZ	droga praziquantel
PVA	Álcool polivinílico
rpm	rotações por minuto
T <sub>c</sub>	Temperatura de Cristalização (°C)
T <sub>m</sub>	Temperatura de Fusão (°C)
T <sub>g</sub>	Temperatura de Transição Vítreia (°C)
TGA	Análise Termogravimétrica (do inglês, <i>Thermogravometric analysis</i> )

## RESUMO

HOLZ, Juliana Pelisoli. **Preparação de micro e nanoesferas de PLGA com mentol**. Porto Alegre. 2012. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

Uma das áreas da nanotecnologia de grande interesse é a da formação de nanopartículas (nanoesferas e nanocápsulas), pois permite o desenvolvimento de fórmulas de liberação controlada, ou seja, aquelas com a capacidade de liberar os agentes ativos adequadamente. Em tais produtos, o princípio ativo protegido é liberado gradativamente por meio de estímulos adequados. Existe um interesse especial na preparação de nanopartículas de polímeros biodegradáveis, como por exemplo, os poliésteres como ácido poli-láctico e o glicólico, e seus copolímeros, como o ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), considerando sua biocompatibilidade e biodegradação. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo produzir nanoesferas a partir do polímero biodegradável PLGA contendo mentol através da técnica de emulsão múltipla/evaporação do solvente. As micro e nanoesferas de PLGA/mentol preparadas apresentaram, na sua maioria, diâmetros médios entre 217 e 13.103 nm,  $T_g$  41 °C e estabilidade térmica até 260 °C. A presença de mentol nas micro e nanoesferas foi evidenciada através das técnicas de caracterização utilizadas, bem como, pela presença física de aroma característico de mentol perceptível ao olfato. Por último, foi feita uma avaliação preliminar da eficiência de incorporação do aroma, mostrando-se eficaz, uma vez que, as micro e nanoesferas com maior concentração de mentol em sua formulação demonstraram a partir das técnicas utilizadas (relação entre as alturas das bandas do mentol e de PLGA no IV e através da maior perda de massa relativa ao mentol no TGA), apresentarem aproximadamente 60% mais mentol incorporado a matriz polimérica destas micro e nanopartículas em relação às demais.

Palavras-Chaves: Emulsão Múltipla, Mentol, Nanoesferas, Nanopartículas, PLGA.

## ABSTRACT

HOLZ, Juliana Pelisoli. **Preparation of PLGA micro and nanospheres with menthol**. Porto Alegre. 2012. Master Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

One area of nanotechnology of great interest is the formation of nanoparticles (nanospheres and nanocapsules) because it allows the development of controlled release formulations, in other words, those with the ability to properly release the active agents. In such products, the active ingredient protected is gradually released through appropriate stimulus. There is a special interest in the preparation of nanoparticles of biodegradable polymers, for example, polyesters such as polylactic acid and glycolic and its copolymers, such as acid poly(lactic-co-glycolic) (PLGA), considering its biocompatibility and biodegradation. In this context, this study has as objective to produce nanospheres from the PLGA biodegradable polymer containing menthol through the technique of multiple emulsion/solvent evaporation. The prepared PLGA / menthol micro and nanospheres, presented mostly average diameters between 217 and 13,103 nm,  $T_g$  41 °C and thermal stability up to 260 °C. The presence of menthol in the micro and nanospheres was demonstrated by the characterization techniques used, as well as the physical presence of menthol aroma perceptible to the smell. At last, was made a preliminary valuation of the efficiency of incorporation of aroma, showing to be effective, since the micro and nanospheres with a higher concentration of menthol in its formulation demonstrated from the techniques used (relation between the heights of the bands of menthol and PLGA in IR and through the higher mass loss relative to the menthol in the TGA), present approximately 60% more menthol incorporated into the polymer matrix of these micro and nanoparticles in relation to others.

Key Words: Multiple emulsion, Menthol, Nanospheres, Nanoparticles, PLGA.

## 1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia tem atraído o interesse de inúmeros grupos de pesquisa em todo o mundo, devido ao seu enorme potencial de aplicação nos mais variados setores industriais e ao impacto que seus resultados podem dar ao desenvolvimento tecnológico e econômico. Isso se torna possível, pois os materiais em nanoescala podem apresentar novos comportamentos e/ou propriedades diferentes daquelas que geralmente apresentam em escala macroscópica (Durán et al., 2006).

Segundo a Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI, 2011), existem várias previsões para o mercado global da nanotecnologia envolvendo a produção e a comercialização de produtos e equipamentos. Das mais às menos otimistas, todas convergem para o valor de mais de um trilhão de dólares, em 2015. Este tamanho de mercado, juntamente com o potencial multi-industrial da nanotecnologia, tem feito crescer o interesse de governos, corporações, empresas de capital de risco e pesquisadores acadêmicos pela nanotecnologia. Segundo o governo americano, de 1997 a 2005, aproximadamente US\$ 18 bilhões foram investidos globalmente em nanotecnologia. São poucos os negócios no mundo que apresentam números tão elevados. É difícil não se convencer de que a nanotecnologia é além de uma grande plataforma tecnológica, uma interessante oportunidade para as empresas.

Uma das áreas da nanotecnologia que tem tido grande interesse é o da nanoencapsulação, pois permitiu o desenvolvimento de fórmulas de liberação controlada, ou seja, aquelas com a capacidade de liberar os agentes ativos adequadamente. Em tais produtos, o princípio ativo protegido é liberado gradativamente por meio de estímulos adequados, tais como mudança de pH, rompimento físico, intumescimento, dissolução, entre outros (Suave et al., 2006).

Um interesse especial na preparação de nanopartículas de polímeros biodegradáveis ocorre, devido ao fato de existirem poliésteres alifáticos comercialmente disponíveis, como os poliésteres derivados de ácido láctico e glicólico, que são aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para utilização como sistemas de liberação de drogas em clínica humana e por terem uma longa história de segurança e biocompatibilidade (Holland et al., 1986; Soares et al., 2005).

Dentre os poliésteres alifáticos, os homo e copolímeros de lactato e glicolato (PLA, PGA, PLGA), poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) e os polihidroxialcanoatos (PHA) podem ser usados no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para encapsulação e liberação controlada de compostos bioativos. A velocidade de degradação desses polímeros biodegradáveis pode ser modificada e regulada por variações na composição, na massa molecular do polímero e nos métodos de preparação das nanopartículas (Durán et al., 2006).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carregadores de fármacos e outras moléculas que apresentam diâmetro inferior a 1  $\mu\text{m}$  (1.000 nm) e incluem as nanocápsulas (NC) e as nanoesferas (NE). Esses dois sistemas diferem entre si segundo a composição, pela presença ou ausência de óleo em suas composições, e organização estrutural (Melo, 2010; Oliveira, 2009; Santos, Fialho, 2007; Durán et al., 2006; Schaffazick et al., 2003).

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo produzir nanopartículas de PLGA contendo mentol a partir da técnica de emulsificação seguida de evaporação do solvente, que tem sido frequentemente empregada, tendo em vista a simplicidade dos procedimentos envolvidos na obtenção das nanopartículas (Gonnet et al., 2010).



## **2. OBJETIVOS**

Este trabalho tem como objetivo geral estudar um processo (emulsão/evaporação) de produção de nanopartículas de PLGA contendo mentol como aroma para liberação controlada.

### **2.1. Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos deste trabalho são descritos a seguir:

- Preparação de nanopartículas de PLGA contendo mentol via técnica de emulsão/evaporação;
- Caracterização morfológica, estrutural e das propriedades físico-químicas das nanopartículas produzidas;
- Avaliação preliminar da eficiência de incorporação do aroma.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Nanotecnologia**

A nanotecnologia pode ser definida como um campo científico multidisciplinar baseado no desenvolvimento, na caracterização, na produção e na aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas com forma e tamanho na escala nanométrica. Esta ciência tem atraído o interesse de inúmeros grupos de pesquisa em todo o mundo, devido ao seu enorme potencial de aplicação nos mais variados setores industriais e ao impacto que seus resultados podem dar ao desenvolvimento tecnológico e econômico. Isso se torna possível, pois os materiais em nanoescala podem apresentar novos comportamentos e/ou propriedades diferentes daquelas que geralmente apresentam em escala macroscópica (Durán et al., 2006; Santos, Fialho, 2007).

A nanotecnologia é uma área de pesquisa e desenvolvimento muito ampla e interdisciplinar uma vez que está baseada nos mais diversificados tipos de materiais, como por exemplo, polímeros, cerâmicas, metais, semicondutores, compósitos e biomateriais, e uma ciência multidisciplinar onde inclui a interseção de conhecimentos de diferentes áreas, entre elas a biologia, a química, a física, a matemática, as engenharias química e mecânica, a computação, a ciência de materiais e outros ramos da ciência (Santos, Fialho, 2007; Fishbine, 2002; Dutta, 2003; Lee, 1998; Aviram, Ratner, 1998).

A nanotecnologia pode trazer benefícios a diversas áreas, como: medicina e saúde, fármacos, encapsulação de células vivas, vacina de dose única, cosméticos, pigmentos, adesivos, materiais e fabricação, nanoeletrônica e tecnologia de computadores, aeronáutica e exploração espacial, energia e meio ambiente,

biotecnologia e agricultura (agrotóxicos), alimentício, embalagens, etc. (Suave et al., 2006; Lima et al., 2000; Durán et al., 2006).

### **3.2. Nanopartículas**

A tecnologia associada à modificação da liberação de princípios ativos, como fármacos e pesticidas, corantes, aromatizantes etc., é vasta. Entre essas tecnologias, os sistemas matriciais poliméricos são amplamente aplicados na forma de nanopartículas. Dentre os sistemas carregadores de fármacos, as nanopartículas preparadas a partir de polímeros biodegradáveis ocupam posição de destaque. A obtenção desses sistemas coloidais aquosos, com diâmetro de partícula em escala nanométrica, constitui-se em uma estratégia interessante na área de formulação farmacêutica (Suave et al., 2006; Durán et al., 2006).

As vantagens da utilização de nanopartículas incluem a liberação controlada e/ou prolongada da substância nelas incorporadas, a redução de efeitos adversos associados à substância, a proteção de compostos da inativação antes de atingirem o local de ação, o aumento da penetração intracelular e o aumento da atividade farmacológica (Santos, Fialho, 2007).

De acordo com o seu tamanho, as partículas são classificadas como nanopartículas ou micropartículas. As nanopartículas poliméricas são sistemas carregadores de fármacos e outras moléculas que apresentam diâmetro inferior a 1  $\mu\text{m}$  (1.000 nm) e incluem as nanocápsulas (NC) e as nanoesferas (NE). Esses dois sistemas diferem entre si segundo a composição, pela presença ou ausência de óleo em suas composições, e organização estrutural (Melo, 2010; Oliveira, 2009; Santos, Fialho, 2007; Durán et al., 2006; Schaffazick et al., 2003).

As nanocápsulas são vesículas constituídas por um invólucro polimérico disposto em torno de um núcleo oleoso. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica (Magenheim, Benita, 1991).

As formas de associação das substâncias ativas a esses dois sistemas coloidais dependem da natureza química dos fármacos, assim como da composição química dos sistemas. Nas nanocápsulas os fármacos estarão distribuídos no núcleo (figura 3.1.a) ou adsorvidos na parede polimérica (figura 3.1.b) enquanto que nas nanoesferas os fármacos podem encontrar-se retidos (figura 3.1.c) ou molecularmente dispersos na matriz (figura 3.1.d) (Schaffazick et al., 2003).

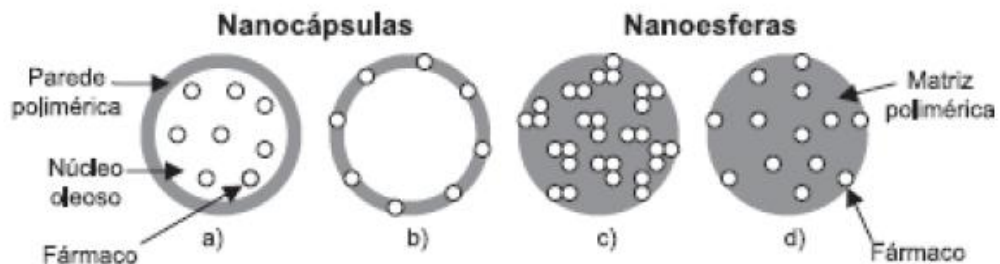


Figura 3.1. Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas

Fonte: Schaffazick et al., 2003.

O conceito de nanocápsula surgiu da idealização do modelo celular. Neste, a membrana que envolve e protege o citoplasma e os demais componentes exerce ao mesmo tempo outras funções, como controlar a entrada e a saída de material na célula. De modo semelhante, a nanocápsula consiste em uma camada de um agente encapsulante, geralmente um material polimérico que atua como um filme protetor, isolando a substância ativa e evitando o efeito de sua exposição inadequada. Essa membrana se desfaz sob estímulo específico, liberando a substância no local em tempo adequado (Ré, 2000).

### 3.3. Preparação de Micro e Nanopartículas

#### 3.3.1. Materiais encapsulantes

O material encapsulante é selecionado em função das propriedades físicas e químicas do agente ativo, da aplicação pretendida e do método utilizado para formar as micro ou nanopartículas. O encapsulante ideal deve apresentar baixa viscosidade em concentrações elevadas e ser de fácil manipulação durante o processo; possuir baixa higroscopicidade, para facilitar a manipulação e evitar aglomeração; não ser reativo com o material a ser encapsulado; ter habilidade de selar e segurar o material ativo dentro da estrutura da cápsula; liberar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação; proporcionar máxima proteção ao material ativo contra condições adversas, tais como luz, pH, oxigênio e ingredientes reativos; ser solúvel em solventes comumente usados; possuir as propriedades desejadas de liberação do material ativo; não apresentar sabor desagradável no caso de consumo oral; e ser econômico (Santos et al., 2000). Segundo Suave et al. (2006), os materiais mais utilizados como encapsulantes incluem:

- Carboidratos: amido, dextrinas, açúcar, xarope de milho, celuloses;
- Gomas: goma arábica, alginato de sódio, carragena;
- Lipídeos: cera, parafina, triestearina, ácido esteárico, monoglicerídeos e diglicerídeos, óleos e gorduras hidrogenadas;
- Polímeros: poli (hidroxialcanoatos), tais como poli (3-hidroxi-butirato) P(3HB), poli (3- hidroxivalerato) P(3HV) e seus copolímeros, poli (D, L-ácido láctico) (PDLLA), poli(acrilatos), copolímeros de polietileno-co-propileno, poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL);
- Proteínas: glúten, caseína, gelatina, albumina;
- Quitosana: fonte alternativa extraída da casca de crustáceos.

Polímeros biodegradáveis e blendas de polímeros biodegradáveis naturais ou sintéticos são muito utilizados na liberação controlada de fármacos (Cerini, 2004; Hayashi, 1994). Os poliésteres, como poli ( $\epsilon$ -caprolactona), poli (ácido láctico) e o poli (3-hidroxi-butirato) e outros polímeros obtidos de fontes naturais, vêm se

destacando na encapsulação de agrotóxicos, em virtude da biodegradabilidade e de os produtos da degradação desses polímeros serem atóxicos. A figura 3.2 mostra microesferas de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), poli (3-hidroxi-butirato) P(3HB) e de uma blenda dos mesmos polímeros contendo o inseticida malation microencapsulado (Suave et al., 2006).

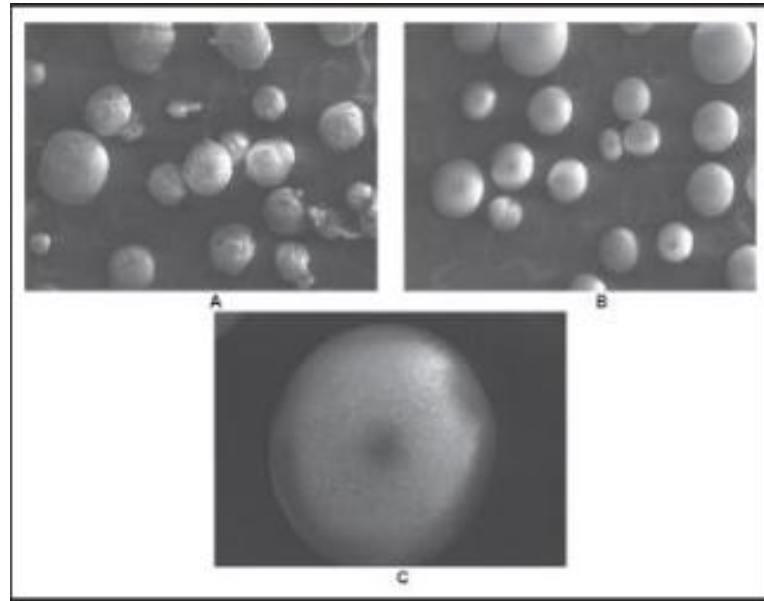


Figura 3.2. (A) microesferas de PCL (aumento 20 X); (B) microesferas de P(3HB) (aumento 20 X); (C) microesfera da blenda P(3HB) /PCL 90/10 (aumento 200 X). Todas têm o pesticida malation retido em seu interior.

Fonte: Suave et al., 2005.

### 3.3.2. Métodos de micro e nanoencapsulação

Existem dois procedimentos gerais para se obter materiais na escala nanométrica. Uma primeira abordagem, o chamado procedimento “de baixo para cima” (*button-up*), consiste em tentar construir o material a partir de seus componentes básicos, da mesma forma que uma criança monta uma estrutura ao conectar peças de um Lego. Por outro lado, é também possível fabricar um objeto nanométrico pela eliminação do excesso de material existente em uma amostra de material, à semelhança da maneira como um artista trabalha os pequenos detalhes em uma escultura. Este procedimento “de cima para baixo” (*top-down*) normalmente se vale das chamadas técnicas de litografia, que correspondem a uma série de etapas de corrosão química seletiva e extremamente precisa (Pimenta, Melo, 2007).

De maneira geral, os processos *top-down* são realizados em sistemas secos, enquanto que os *bottom-up* são realizados em meio aquoso ou solvente orgânico. (ABDI, 2011).

Existe uma grande variedade de métodos de micro e nanoencapsulação patenteados, e é previsível que surjam novas técnicas à medida que forem surgindo novos materiais encapsulantes e novos princípios ativos que requeiram processamentos específicos para a sua micro e nanoencapsulação. A escolha do método mais adequado depende do tipo do material ativo, da aplicação e do mecanismo de liberação desejado para a sua ação. A diferença básica entre os métodos existentes está no tipo de envolvimento ou aprisionamento do material ativo pelo agente encapsulante, visto que a combinação entre o material e o agente ativo pode ser de natureza física, química ou físico-química (Suave et al., 2006). Alguns métodos são citados a seguir:

Métodos físicos: *spray drying*, *spray cooling*, pulverização em banho térmico, leito fluidizado, extrusão centrífuga com múltiplos orifícios, cocristalização e liofilização.

Métodos químicos: inclusão molecular e polimerização interfacial.

Métodos físico-químicos: coacervação ou separação de fases, emulsificação seguida de evaporação do solvente, pulverização em agente formador de reticulação e envolvimento lipossômico (Santos et al., 2000).

Diferentes métodos são encontrados para o preparo de nanopartículas poliméricas, os quais permitem a modulação da sua estrutura, da sua composição e das suas propriedades fisiológicas. A escolha do método de preparo depende do polímero e da solubilidade do fármaco a ser encapsulado. Estes métodos podem ser classificados em duas categorias principais, sendo elas a polimerização de monômeros e a utilização de polímeros pré- formados (Santos, Fialho, 2007). A figura 3.3 apresenta as principais etapas dos diferentes métodos de preparação de nanopartículas (Schaffazick et al., 2003).

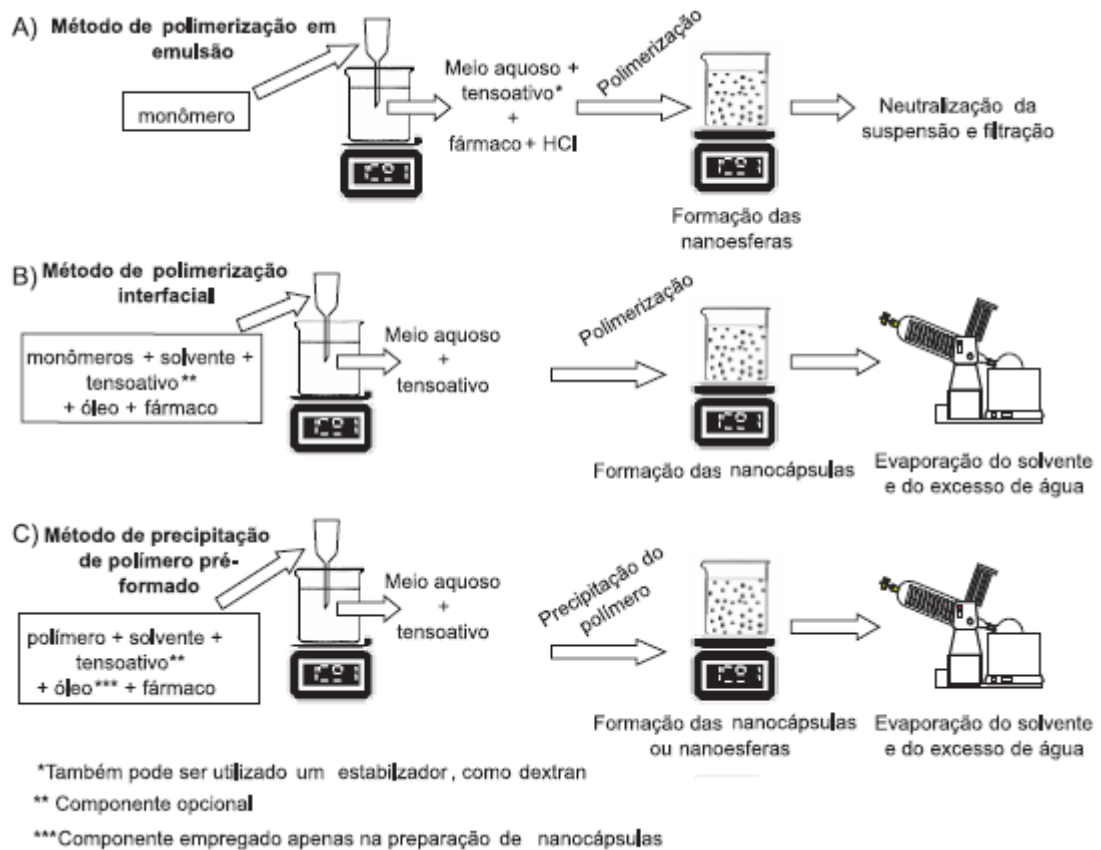


Figura 3.3. Métodos usuais, empregados na preparação de nanopartículas poliméricas, baseados na utilização de monômeros dispersos (A; B) ou na precipitação de polímeros pré-formados (C)

Fonte: Schaffazick et al., 2003.

Para avaliar criticamente as opções, cada método deve ser considerado em termos de quão fácil ele pode ser para a produção, para o impacto na qualidade do princípio ativo, para a biodisponibilidade e para a toxicidade (Santos, Fialho, 2007). O método ideal de micro ou nanoencapsulação deve ser simples, reprodutível, rápido e fácil de transpor à escala industrial (Kissel et al., 2006).

Muitos fármacos têm sido encapsulados por diferentes técnicas. A seleção de uma técnica em particular depende principalmente das características físico-químicas do fármaco de interesse e o parâmetro mais crítico é a solubilidade em água, que influencia diretamente na escolha da fase externa contínua. Além da escolha da técnica adequada, a escolha do polímero apropriado é outro ponto primordial para a microencapsulação (Oliveira, 2009). Como são insolúveis em água, os PLGAs têm sido muito utilizados no desenvolvimento de técnicas baseadas



na evaporação do solvente (Kissel et al., 2006). Outro fator importante foi o fato de ser o único polímero aprovado pela FDA para uso em seres humanos até o momento (Oliveira, 2009). A seguir é descrito apenas o método de emulsão múltipla e evaporação do solvente, pois este método foi o utilizado para preparação de nanopartículas neste trabalho.

#### 3.3.2.1. Emulsificação seguida de evaporação do solvente

Para contornar as limitações dos métodos de polimerização de monômeros, têm sido empregados os métodos de preparo utilizando polímeros pré-formados. Entre os métodos que utilizam polímeros pré-formados, a técnica de dispersão de polímeros pré-formados tem sido a mais empregada. Neste caso, o agente ativo é disperso ou dissolvido com o polímero, que foi anteriormente disperso em um solvente orgânico imiscível com água como o diclorometano e o clorofórmio. A dispersão formada é emulsificada com uma fase aquosa contendo um estabilizante da emulsão (tensoativo), para prevenir a agregação e a coalescência. O solvente orgânico é então removido por evaporação sob agitação, favorecendo a formação de glóbulos poliméricos compactos, nos quais o agente ativo se encontra retido. As partículas formadas passam posteriormente por operações complementares, como separação, lavagem e secagem. Após evaporação completa do solvente orgânico, as nanopartículas são separadas por meio de centrifugação, lavadas para remoção do agente tensoativo residual e podem ser armazenadas como suspensão ou serem liofilizadas. Este método amplamente empregado para a preparação de micro e nanopartículas é a emulsificação seguida de evaporação do solvente. Técnicas de evaporação de solvente não requerem equipamento pesado e são facilmente adaptáveis à escala industrial (Vila Jato, 1999; Zanetti, 2001; Suave et al., 2006; Santos, Fialho, 2007; Gonnet et al., 2010; Costa, 2002; Moura et al., 2010; Lima et al., 2000; Oliveira, 2009; Schaffazick et al., 2003).

Mainardes e colaboradores (2006) prepararam nanopartículas de PLGA contendo a droga praziquantel (PRZ), a partir da técnica descrita. As nanopartículas formadas apresentaram forma esférica, sem qualquer agregação ou aderência. A relação da massa de droga retida nas nanopartículas foi variada de 10 a 30% em relação à massa do polímero. A eficiência de encapsulação das nanopartículas é

ilustrada na tabela 3.1. Não foi observada relação direta entre a eficiência de encapsulação e a carga teórica de droga praziquantel (PRZ) utilizada na formulação. Como pode ser visto, a maior eficiência de encapsulamento (88%) foi obtida com a carga teórica de droga de 10%.

Tabela 3.1. Eficiência de encapsulamento da PRZ nas nanopartículas de PLGA

Quantidade teórica de PRZ (%m/m)	Eficiência de Encapsulamento (%)
10	88 ± 3
20	73 ± 1.5
30	77 ± 3.5

Fonte: Mainardes et al., 2006.

Essa técnica tem sido frequentemente empregada, tendo em vista a simplicidade dos procedimentos envolvidos na obtenção das partículas e as possibilidades de modulação das características físicas e físico-químicas das partículas por meio da escolha dos componentes da formulação e das condições de preparação (Bhardwaj et al., 1995; Khidr et al., 1998; Zanetti, 2001).

A denominação emulsificação-evaporação do solvente é normalmente usada para designar um conjunto de procedimentos nos quais ocorre a formação de uma emulsão que pode ser do tipo óleo/água (o/a) e também óleo/óleo (o/o). Em ambos os casos, a fase chamada interna, onde o polímero se encontra dissolvido, é um solvente orgânico que apresenta uma solubilidade limitada na fase externa da emulsão, a qual pode ser água, formando uma emulsão o/a, ou óleo, formando uma emulsão o/o. Outros procedimentos que utilizam emulsões múltiplas também têm sido reportados na literatura, tais como os processos água/óleo/água (a/o/a), água/óleo/óleo (a/o/o), água/óleo/água/óleo (a/o/a/o) e ainda água/óleo/óleo/óleo (a/o/o/o) (O'donnell, Mcginity, 1997).

### **3.3.3. Liofilização**

Os problemas de estabilidade limitada podem ser minimizados através da secagem das suspensões. A sublimação (liofilização) tem sido bastante utilizada para a desidratação de sistemas coloidais, principalmente lipossomas e nanoesferas. A secagem das suspensões de nanopartículas, empregando-se liofilização, é uma estratégia para aumentar a estabilidade físico-química destes sistemas. A liofilização consiste na remoção da água (sob a forma de gelo) através de sublimação e tem sido amplamente empregada para a secagem de suspensões de nanoesferas. Entretanto, no caso das suspensões de nanocápsulas, poucos trabalhos, utilizando esta operação, têm sido desenvolvidos, pois, após a re-hidratação dos produtos liofilizados, armazenados à temperatura ambiente, mais de 50% do fármaco associado foi liberado. Estes resultados foram atribuídos a mudanças na estrutura da parede das nanocápsulas, bem como, sugerido que durante o estágio de congelamento, as tensões provocadas pela cristalização da água poderiam “quebrar” as nanocápsulas, ocasionando a perda do conteúdo das mesmas para a fase aquosa (Schaffazick et al., 2003).

Uma maneira de encapsular vitaminas lipofílicas em uma partícula matricial é o congelamento a seco da emulsão polímero/água. Neste caso, a vitamina é dispersa em um polímero emulsionado. Gotículas são solidificadas durante a liofilização. Esta técnica é adaptável às condições industriais e compatível com o encapsulamento de moléculas sensíveis. No entanto, o processo de liofilização continua sendo caro e delicado para sua implementação. O tamanho das partículas depende de parâmetros de emulsificação e estabilidade de partículas, no estado de polímeros (Gonnet et al., 2010).

### **3.4. Substâncias com aromas**

A recente tecnologia de encapsulamento faz uso de microcápsulas que agem como pequenos contentores de líquidos para ser liberado a partir do núcleo interno, sob condições controladas para tratar uma finalidade específica (Rodrigues et al., 2009). Para o encapsulamento de compostos que contenham aromas, no caso, que

liberem uma fragrância, é necessário o conhecimento de algumas regras de perfumarias.

Na concepção de perfume, especial atenção deve ser dada para o desempenho dos diferentes componentes do perfume. Os ingredientes do perfume são classificados em três tipos de notas perfumadas de acordo com sua volatilidade: (i) notas de topo: os componentes mais voláteis, que são observados após a aplicação do perfume e duram por um curto período de tempo (30 segundos a alguns minutos). Alguns exemplos são: hortelã e capim limão, (ii) notas médias: estas fragrâncias revelam a originalidade de um perfume, que são detectados logo após o desaparecimento das notas de topo e podem durar algumas horas. Exemplos incluem flores e odores frutados e (iii) notas de fundo: estas fragrâncias podem durar muitas horas e são usadas como fixador de perfumes, pois possuem volatilidades menores do que as notas superiores e médias. Exemplos são aromas lenhosos, almíscar e aromas de baunilha. Sendo que, almíscar e limoneno apresentam valores mais altos de odor, ou seja, esses são os componentes que mais sentimos o cheiro (Rodrigues et al., 2009).

A estrutura da pirâmide de um perfume (Figura 3.4) é dividida em três partes, representando as notas superior, média e de fundo. As razões recomendadas para cada nota são: topo 15-20%; média 30-40%, e base 45-55% (Rodrigues et al., 2009).

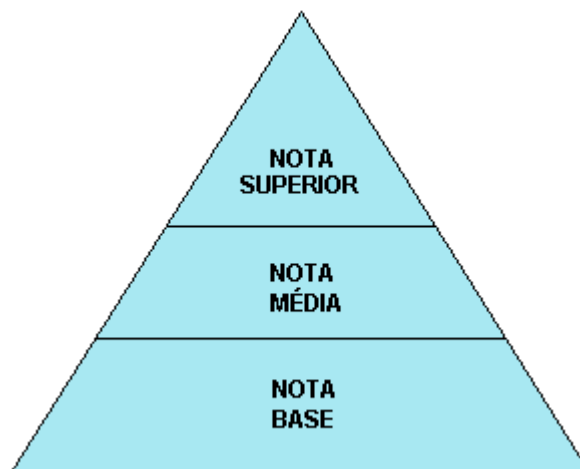


Figura 3.4. Pirâmide estrutural de um perfume.

Fonte: Adaptado de RODRIGUES et al., 2009.

A melhor tecnologia de encapsulamento de aromas é a que faz uso dos polímeros biocompatíveis nanotransportadores que podem encapsular moléculas de perfume de modo eficaz e também dar estabilidade aos produtos encapsulados com uma propriedade de liberação controlada e duradoura. O processo de encapsulamento de fragrâncias pode ser realizado usando uma mistura de polímeros não-tóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis (Sansukcharearnpon et al., 2010).

Sansukcharearnpon et al. (2010) estudou seis moléculas de fragrância, que foram cuidadosamente selecionadas para o encapsulamento, de modo a englobar moléculas de funcionalidades químicas diferentes. Elas consistem em cânfora (cetona), citronelal (aldeído), eucaliptol (éter), mentol (álcool), limoneno (hidrocarbonetos saturados) e acetato de 4-terc-butilciclohexil (éster), suas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 3.5. Estas fragrâncias foram encapsuladas, com uma mistura de polímeros, e seus perfis de liberação foram investigados.

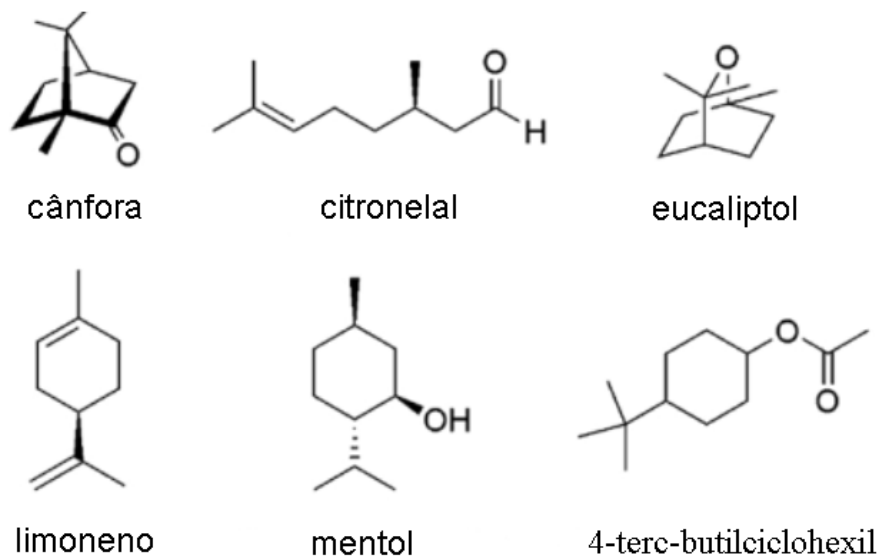


Figura 3.5. Estrutura química das moléculas das seis fragrâncias

Fonte: Adaptado de Sansukcharearnpon et al., 2010.

As análises por MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura), das partículas secas e da suspensão aquosa, revelaram partículas esféricas com morfologias

semelhantes, em que seus tamanhos variaram com a concentração inicial da solução de polímero utilizado. Partículas menores podem ser preparadas em concentrações mais baixas de polímero, enquanto a preparação em concentrações mais elevadas de polímero resultou em micropartículas de diâmetro superior. (Sansukcharearnpon et al., 2010).

As imagens MEV indicaram uma forma esférica semelhante entre as seis fragrâncias encapsuladas em esferas poliméricas (exemplo de esferas de mentol encapsulado na Figura 3.6a). Imagens de MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão) mostraram partículas com núcleo evidente (Figura 3.6b), enquanto as micrografias MFA (Microscopia de Força Atômica) das nanopartículas indicam cápsulas poliméricas, na forma esférica e não rígidas (Figura 3.6c) (Sansukcharearnpon et al., 2010).

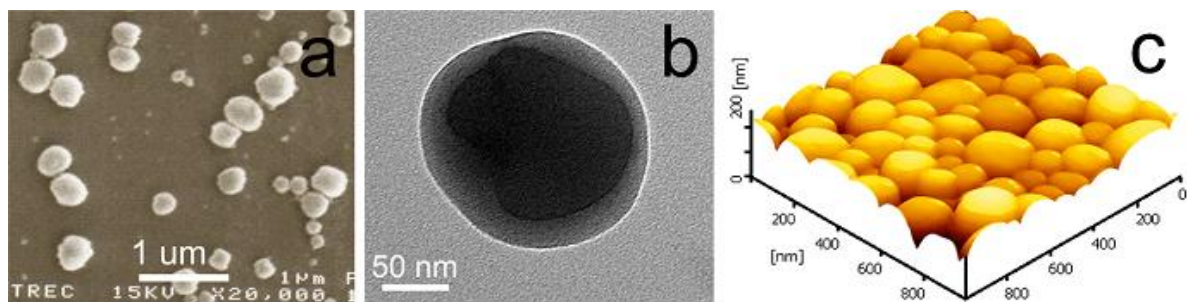


Figura 3.6. Representação de nanopartículas com razão mentol/polímero 1:1 preparadas com concentração inicial de 4000 ppm de polímero: (a) MEV (b) MET e (c) MFA.

Fonte: Sansukcharearnpon et al., 2010.

O processo de encapsulamento foi adequado a todas as seis fragrâncias testadas. Os compostos químicos com funcionalidades diferentes, apresentaram distintos resultados de liberação nas cápsulas poliméricas. O limoneno (um hidrocarboneto insaturado), não apresentou redução significativa no tempo de liberação quando encapsulado. A encapsulação de limoneno nas partículas da mistura de polímeros não pode efetivamente ajudar a prolongar o lançamento da fragrância, uma vez que mostrou o mais rápido lançamento, enquanto mentol e eucaliptol mostraram a liberação mais lenta. Percebeu-se ainda que depois de ser encapsulada, a pressão de vapor e ponto de ebulição da fragrância já não eram os

principais fatores que determinam a taxa de liberação (Sansukcharearnpon et al., 2010).

#### **3.4.1. Mentol**

O mentol é um álcool obtido a partir de extratos de óleos da hortelã ou preparado sinteticamente. Atualmente, o mentol é utilizado como ingrediente de produtos farmacêuticos devido a sua fragrância e sabor, além disso, é amplamente utilizado em alimentos, bebidas, cigarro, pasta de dente e como aromatizante de alimentos devido a seu particular sabor refrescante (Hamasaki et al., 1998).

### **3.5. Polímeros Biodegradáveis**

Além do tamanho submicrométrico, as aplicações de nanopartículas como carregadores coloidais de fármacos também impõem um número de restrições físico-químicas e biológicas quanto aos polímeros usados na preparação desses sistemas, dentre elas, a de que sejam biocompatíveis e biodegradáveis a metabólicos inócuos ao organismo. As nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, têm atraído maior atenção dos pesquisadores em relação aos lipossomas, devido às suas potencialidades terapêuticas, à maior estabilidade nos fluídos biológicos e durante o armazenamento (Durán et al., 2006; Schaffazick et al., 2003).

Os polímeros biodegradáveis podem ser usados para obtenção de nanopartículas, em particular, os poliésteres alifáticos e, dentre eles, os homo e copolímeros de lactato e glicolato (PLA, PGA, PLGA), poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) e os polihidroxialcanoatos, conhecidos como PHA. São polímeros termoplásticos e constituem a classe mais antiga e a mais estudada dos polímeros biodegradáveis. Eles podem ser preparados a partir de uma variedade de monômeros pela abertura do anel e por rotas de polimerização dependendo da unidade monomérica. Os derivados dos ácidos láctico e glicólico foram empregados como material de fios de sutura na década de 1960 e, desde então, outros poliésteres alifáticos foram desenvolvidos como polímeros biodegradáveis e têm despertado bastante atenção

devido a biocompatibilidade e aos perfis de degradação controláveis que apresentam (Durán et al., 2006; Santos, Fialho, 2007).

Polímero biodegradável é o polímero em que a degradação é mediada, total ou parcialmente, por um sistema biológico. O prefixo bio é considerado em fenômenos resultantes do contato com elementos vivos, como tecidos, células, líquidos corporais ou microrganismos, assim como também a água, o oxigênio e as enzimas são considerados elementos biológicos (Durán et al., 2006).

Entende-se por degradação de um polímero toda mudança deletéria nas propriedades desse polímero, devido a alterações na sua estrutura química (Li, 1995). Essa mudança pode ocorrer através do relaxamento da cadeia polimérica, da quebra da unidade monomérica localizada na extremidade da cadeia (erosão) ou ainda através da cisão aleatória de uma ligação em alguma posição ao longo da cadeia polimérica (degradação). Essa cisão pode não ser aleatória, caso seja provocada pela ação de enzimas (Hasirci et al., 2001).

Materiais poliméricos diferem na velocidade e na forma de degradação, determinadas pela energia requerida para a quebra, e pela localização da ligação (Hasirci et al., 2001). Polímeros com fortes ligações covalentes na cadeia principal (C-C) e com grupos não hidrolisáveis requerem longo tempo e/ou catalisadores para sua degradação. Moléculas com grupos hidrolisáveis (isto é, C-O-C, C-N-C) são degradadas mais facilmente e mais rapidamente (Durán et al., 2006).

A maioria dos polímeros biodegradáveis contém grupos hidrolisáveis como amida, éster, uréia e uretano ao longo da cadeia carbônica (Chandra, Rustgi, 1998). Contudo, os polímeros contendo ligação éster e, em particular, poliésteres alifáticos são de interesse da área médica devido às suas propriedades físicas, químicas e biológicas e características de biodegradabilidade (Li, 1995). Alguns dos principais fatores que podem modular a degradação dos poliésteres alifáticos são (Durán et al., 2006):

- Composição química;
- Massa molecular e sua polidispersão;



- Permeabilidade à água e solubilidade (hidrofilicidade / hidrofobicidade);
- Mecanismo de hidrólise (não catalítica, catalítica, enzimática);
- Tipo de estrutura (cristalina, amorfa);
- Porosidade;
- Temperatura de transição vítrea;
- Características físicas (tamanho, forma e relação área/volume da matriz polimérica);
- Fatores físico-químicos (pH, temperatura, força iônica do meio);
- Esterilidade e métodos de esterilização;
- Local de implante no organismo.

### **3.5.1. Polímeros de ácidos láctico (PLA) e glicólico (PGA) e o copolímero (PLGA)**

Os polímeros biodegradáveis mais utilizados atualmente são os poliésteres, tais como a poli( $\epsilon$ -caprolactona), o poli(D,L láctico) (PLA) e os copolímeros derivados dos ácidos láctico e glicólico (PLGA) (Santos, Fialho, 2007). O Poli (ácido láctico) (PLA) e o Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) são poliésteres relativamente hidrofóbicos, instáveis em condições de umidade e biodegradáveis a subprodutos atóxicos (ácido láctico, ácido glicólico, dióxido de carbono e água) e produzidos facilmente e a partir de recursos renováveis (Soares et al., 2005).

A vantagem do PLGA sobre outros polímeros bioreabsorvíveis, como o poli (L-ácido láctico), PLLA, por exemplo, é o fato do copolímero PLGA requerer um menor tempo para sua completa degradação, implicando menor probabilidade de reações adversas, as quais decorrem, muitas vezes, de fragmentos cristalinos liberados por polímeros, cujo tempo de degradação seja excessivamente longo. A estrutura química do PLGA é mais suscetível à reação de hidrólise, já que em sua cadeia polimérica existe o mero proveniente do ácido glicólico, que possui um impedimento menor ao ataque das moléculas de água quando comparado ao PLLA, cuja cadeia polimérica é formada exclusivamente por meros provenientes do ácido láctico (Motta, Duek, 2006).

A copolimerização é um processo que resulta numa grande versatilidade de propriedades e performance que se pode obter dos materiais, via manipulação da relação dos co-monômeros; massa molar e cristalinidade do polímero. No caso do copolímero PLGA tem-se a vantagem de se ter um tempo de degradação intermediário entre o PGA e o PLLA. Enquanto que para PLLA o tempo de reabsorção do material pelo organismo pode levar mais de 36 meses, para o copolímero esse tempo pode ser reduzido para aproximadamente 6 meses, dependendo da proporção existente entre os meros. Essa capacidade de controlar o tempo de degradação no organismo direciona, portanto, para aplicações mais específicas (Motta, Duek, 2006).

A copolimerização do PLGA pode ser realizada basicamente por dois caminhos: 1) policondensação do ácido láctico e do ácido glicólico, obtendo-se copolímero de baixa massa molar. 2) polimerização via abertura dos dímeros cíclicos do ácido láctico e do ácido glicólico, resultando em copolímeros de alta massa molar, e conseqüentemente melhores propriedades mecânicas (Motta, Duek, 2006).

Os polímeros derivados dos ácidos láctico e glicólico têm recebido muita atenção nas pesquisas de polímeros biodegradáveis alternativos, sendo que já são aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para a utilização como sistemas de liberação de drogas, existindo diversos estudos demonstrando sua baixa toxicidade (Soares et al., 2005; Holland et al., 1986). As estruturas do ácido láctico e glicólico estão apresentadas na Figura 3.7.

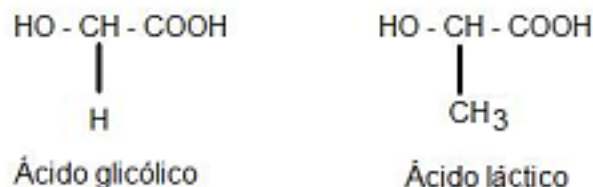


Figura 3.7. Estruturas químicas dos ácidos láctico e glicólico.

Fonte: Durán et al., 2006.

O homopolímero de ácido láctico ou lactato (PLA) é um polímero cuja estrutura química possui isômeros opticamente ativos D e L (PDLA e PLLA) ou uma mistura racêmica de ambos DL (PDLLA). Com a incorporação do glicolato na cadeia, o copolímero resultante é chamado Poli (lactato-co-glicolato) ou PLGA, cuja estrutura é apresentada na Figura 3.8 (Durán et al., 2006). Os homopolímeros de lactato (PLA) e de glicolato (PGA) e copolímeros (PLGA) têm sido empregados na produção de fios cirúrgicos para suturas, que são reabsorvíveis pelo organismo (Porte, Couarraze, 1994), e numa variedade de aplicações em biomateriais, incluindo implantes e materiais de enxertia para órgãos artificiais (Lewis, 1990).

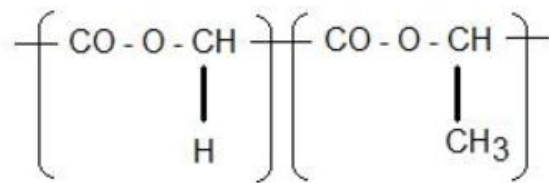


Figura 3.8. Estrutura química de Poli (lactato-co-glicolato) – PLGA

Fonte: Durán et al., 2006

A cinética de degradação *in vitro* e *in vivo* de PLA, PGA e PLGA têm sido bastante estudadas a partir de dispositivos macroscópicos, como suturas, filmes, implantes e de dispositivos em micro e nanoescala, como microcápsulas, microesferas e nanoesferas. Na maioria dos casos estudados, esses polímeros apresentaram comportamentos de degradação *in vitro* e *in vivo* comparáveis. Efeitos de fatores físicos, como temperatura, agitação e pH ou fisiológicos, estão relacionados aos locais de implantação (subcutâneos, intramuscular ou tecidos ósseos) (Durán et al., 2006).

Um estudo realizado por Pitt et al. (1981) define dois estágios nesse processo de degradação: 1) Um primeiro estágio, caracterizado por uma redução da massa molecular causado pela hidrólise aleatória de ligações ésteres do polímero. As cadeias são rompidas pela hidrólise dos grupos ésteres, e os produtos da degradação, ácido láctico e glicólico, inócuos ao organismo, são eliminados por meio do ciclo de Krebs, como CO<sub>2</sub> e também na urina; 2) Um segundo estágio,

caracterizado por perda de massa e uma variação na taxa de cisão da cadeia polimérica.

A velocidade de degradação pode ser modificada variando-se a estrutura e a composição química desses polímeros. Copolímeros e estereopolímeros geralmente se degradam mais rapidamente que os homopolímeros (Li, 1995), e a copolimerização tem se mostrado uma ferramenta útil para manipular a taxa de biodegradação. Os copolímeros podem ser quimicamente diferentes, e a velocidade de hidrólise irá depender da composição química, da proporção dos monômeros, do tamanho da cadeia e do tamanho das partículas. Tais diferenças estão diretamente relacionadas com a degradação, permitindo assim obter diferentes copolímeros de PLGA com tempos de degradação variando de alguns dias a vários meses (Kissel, Koneberg, 1996; Lima et al., 2000). A figura 3.9 apresenta as micrografias de nanoesferas de PLGA antes e após a liberação de um antígeno encapsulado.

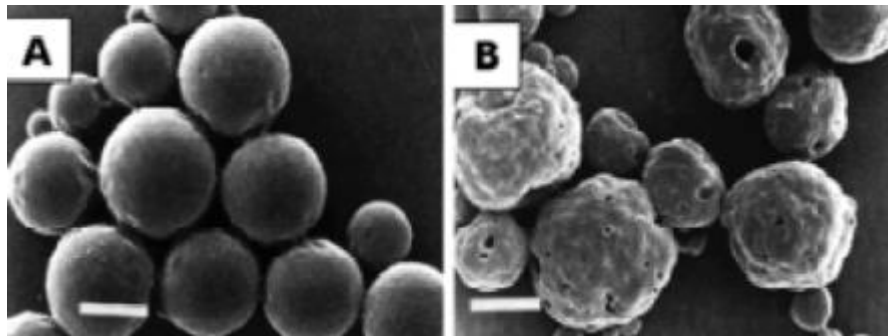


Figura 3.9. Micrografia eletrônica de varredura mostrando microesferas de PLGA após o preparo (A) e após a liberação do antígeno encapsulado (B).

Fonte: Lima et al., 2000.

#### 3.5.1.1. Caracterização de nanopartículas de PLGA

A mobilidade de uma cadeia polimérica determina as características físicas do produto final. A mobilidade é função da agitação dos átomos nas moléculas, sendo diretamente proporcional à temperatura. Portanto, o conhecimento das características físico-químicas de um polímero é fundamental para compreender o seu desempenho termomecânico (Canevarolo, 2002).

As absorções características dos polímeros obtidos a base de ácido láctico são três fortes bandas devidas a vibrações do grupo CCOOC. Ou seja, a banda devido ao estiramento do C=O de ésteres alifáticos saturados ocorre em  $1751\text{ cm}^{-1}$ , a banda devido ao estiramento assimétrico do CO em  $1195\text{ cm}^{-1}$  e em  $1110\text{ cm}^{-1}$  ao estiramento simétrico COC. A presença da deformação axial do éster comprova as ligações características destes poliésteres. E ainda, observam-se bandas de absorção na região de  $2997\text{ cm}^{-1}$  e  $2965\text{ cm}^{-1}$  características de ligação C-H de  $\text{CH}_2$  e de  $\text{CH}_3$  (Motta, Duek, 2006; Soares et al., 2005; Silverstain et al., 1994).

Métodos termoanalíticos, como o DSC, são de grande utilidade para a análise de polímeros, e eles foram também usados para investigar as interações entre o polímero e as drogas em diversas formulações de micro e nanopartículas. Informações úteis podem ser obtidas em relação à cristalinidade morfológica do polímero e o estado da dispersão molecular da droga associada a estes sistemas poliméricos (Mainardes et al., 2006; Magenhein, Benita, 1991; Schaffazick et al., 2003).

Também é possível investigar reações químicas, tais como polimerização e degradação. Em particular, a técnica DSC permite uma avaliação rápida de possíveis incompatibilidades, revelando mudanças na aparência, ou o desaparecimento de picos de fusão ou outros processos endotérmicos e/ou exotérmicos, e/ou variações nas entalpias de reações correspondentes (Schaffazick et al., 2003). Informações adicionais sobre os efeitos de armazenamento a altas temperaturas pode também ser obtido. O desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas é facilitado pelo uso de métodos térmicos para a caracterização de novos produtos farmacêuticos preparados com aplicação direta ao controle de qualidade dos mesmos (Mainardes et al., 2006).

A análise de DSC para o copolímero PLGA puro exhibe um evento endotérmico em  $60\text{ }^\circ\text{C}$  referindo-se ao pico de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ). Nenhum ponto de fusão é observado, porque PLGA é de natureza amorfa (Motta, Duek, 2006; Mainardes et al., 2006). Os picos exotérmicos que aparecem em  $370$ ,  $400$  e  $500\text{ }^\circ\text{C}$  estão relacionados com a decomposição térmica do polímero. A

decomposição, caracterizada por um evento endotérmico, começou em aproximadamente 320 °C (Mainardes et al., 2006).

A TGA do PLGA puro, bem como, das nanopartículas de PLGA estão apresentadas na figura 3.10. A TGA do PLGA puro mostra que o polímero apresenta estabilidade térmica até 250 °C. A perda de peso de PLGA puro, atribuído à decomposição térmica, ocorre em dois períodos (390 °C - 96,60% e 470 °C - 3,18%). A decomposição térmica de nanopartículas de PLGA inicia em uma temperatura mais baixa (220 °C) do que o polímero puro (320 °C). As nanopartículas estão mais expostas à degradação térmica, devido a sua dimensão nanométrica, que faz com que a área superficial de troca térmica seja maior, em relação ao polímero. Logo, as nanopartículas de PLGA apresentam menor estabilidade térmica do que o polímero puro e por isso, degradam mais facilmente (Mainardes et al., 2006).

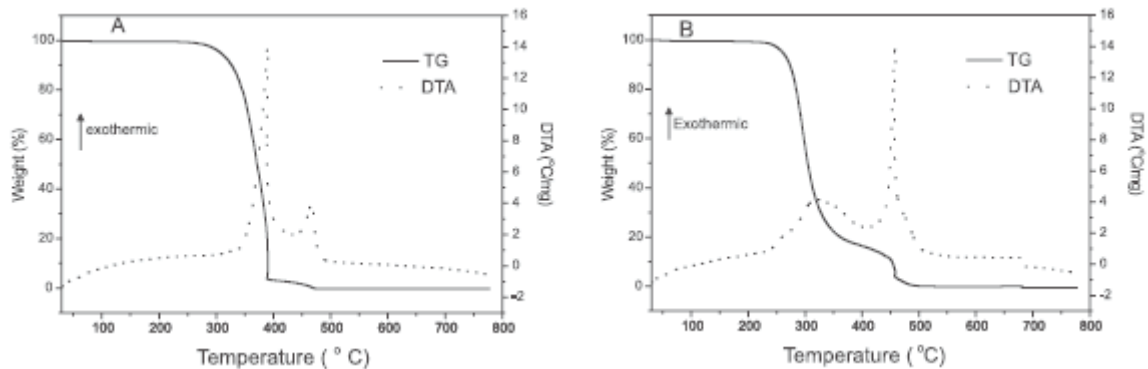


Figura 3.10. Curvas de TGA obtidas com fluxo de ar atmosférico de 100 mL/min e aquecimento de 20°C/min das amostras: A) PLGA puro e B) Nanopartículas de PLGA.

Fonte: Mainardes et al., 2006.

### 3.6. Liberação do agente ativo

A liberação do agente ativo (AA) pode ocorrer através da ruptura mecânica, mediante ação da temperatura e do pH, por meio da biodegradação, pela solubilidade no meio e também por difusão. A difusão do AA na matriz polimérica é definida como um processo de transferência de massa de moléculas individuais de uma substância por intermédio de um movimento molecular aleatório e associado a um gradiente de concentração (Martin, 1993).

Um fator importante a ser considerado no processo de difusão de um AA é a sua solubilidade na matriz polimérica. Quando um AA se encontra disperso na matriz, a difusão acontecerá à medida que ocorrer sua solubilização no polímero. Já num sistema em que o AA se encontra solubilizado na matriz polimérica, essa etapa será suprimida, permitindo uma difusão mais rápida (Suave et al., 2006).

A capacidade de intumescimento de um polímero também influencia diretamente na difusão do AA (Santos et al., 2000). Quando o sistema de microencapsulação entra em contato com a água, por exemplo, podem ocorrer a hidratação do material e a progressiva gelificação das cadeias poliméricas, formando uma camada de alta viscosidade na interface água-polímero. Essa camada viscosa aumenta de espessura à medida que a hidratação ou o intumescimento progride. Por consequência, a difusão do AA é determinada pela velocidade de intumescimento do polímero (Suave et al., 2006).

Embora não exista um único tipo de curva de liberação do AA que satisfaça todas as necessidades, quatro modelos teóricos de curva de liberação podem ser definidos. O primeiro considera um mecanismo de disparo, que inicia a liberação. O segundo mecanismo assume que a parede da microcápsula atua como um reservatório, supondo-se que a taxa de liberação seja constante. O terceiro pressupõe a migração através da parede da microcápsula. O quarto modelo considera a parede como uma membrana semipermeável e seletiva para diferentes massas molares (Santos et al., 2000).

A combinação da difusão através de poros e da erosão da matriz polimérica permite controlar a taxa de liberação do antígeno retido em micro e nanoesferas. Esta propriedade permitiu a criação do conceito de vacina de dose única onde uma formulação composta por micro e nanoesferas de tamanho, porosidade e composição polimérica diferentes, liberaria o antígeno em intervalos de tempo substituindo as doses de reforço de uma vacina convencional (Figura 3.10) (Lima et al., 2000).

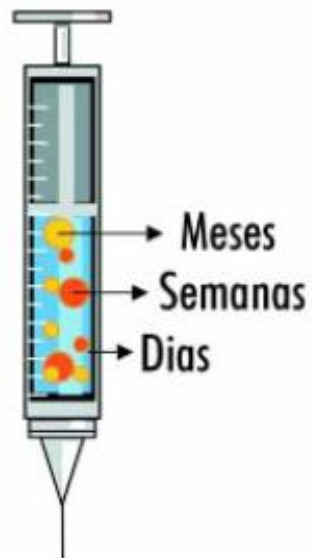


Figura 3.11. Modelo esquemático da vacina de dose única (“*singleshot vaccine*”) baseada no encapsulamento de antígenos em microesferas de PLGA.

Fonte: Lima et al., 2000.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

#### 4.1.1. Matérias-primas e solventes

Na tabela 4.1 são apresentados dados sobre os reagentes e solventes utilizados nos procedimentos experimentais.

Tabela 4.1. Reagentes e solventes utilizados na preparação das nanopartículas

Produto	Origem	Pureza
PLGA Sintetizado	Sintetizado no LOR* (50:50 L-lactíde:glicolíde)	-
PLGA Comercial	PURAC (PLG 8523; 85:15 L-lactíde:glicolíde)	99,39%
Mentol	Vetec	99,95%
Álcool Polivinílico (PVA)	Vetec	86,5-89,5% de hidrólise
Clorofórmio	Vetec	99,8%
Diclorometano	Nuclear	99,5%

\* Laboratório de Organometálicos e Resinas, através de uma reação de policondensação direta, conforme técnica descrita na literatura (LUNT et al., 1998).

### 4.2. Métodos

#### 4.2.1. Obtenção das nanopartículas de PLGA

A preparação das nanopartículas foi realizada nos Laboratórios de Organometálicos/FAQUI e Produtos Naturais/FAQUI, e as caracterizações das mesmas foram feitas nos Laboratórios de Caracterização de Materiais/FAQUI e de Espectroscopia/FAQUI e Centro de Microscopia da FENG/PUCRS.

As nanopartículas foram obtidas a partir de um polímero biodegradável (PLGA) contendo uma substância com aroma (mentol) através da técnica de emulsão múltipla e evaporação do solvente. O fluxograma com as etapas do processo utilizado é apresentado na figura 4.1.

Nesse método, inicialmente, solubilizou-se o polímero (PLGA) em uma quantidade suficiente de solvente orgânico (clorofórmio/diclorometano), originando a fase oleosa (O). A primeira fase aquosa ( $A_1$ ) foi obtida dissolvendo-se o mentol em água destilada, ou apenas água destilada (quando o mentol já havia sido dissolvido com o PLGA). Foram utilizadas quantidades variadas de mentol em relação à massa de polímero PLGA. A fase aquosa ( $A_1$ ) é adicionada à fase oleosa (O) sob agitação em um emulsificador ultra-turrax<sup>®</sup> (modelo IKA<sup>®</sup> T18 basic) (3.600 rpm) por um minuto, para formação da emulsão primária ( $A_1/O$ ).

A emulsão primária  $A_1/O$  é adicionada a uma solução aquosa de PVA ( $A_2$ ), sob agitação (7.000 rpm / 24.000 rpm) utilizando um emulsificador ultra-turrax<sup>®</sup> por 5 minutos, originando a emulsão múltipla ( $A_1/O/A_2$ ), e a formação das nanopartículas. O solvente orgânico utilizado foi eliminado sob agitação pela difusão e evaporação do mesmo a temperatura ambiente e pressão atmosférica por 12h, ou com pressão reduzida utilizando-se um rotaevaporador, na temperatura de 40 °C por 1h.

As nanopartículas formadas foram isoladas por centrifugação (centrífuga modelo CT-5000, Cientec), e lavadas por três vezes com água destilada para remoção do excesso de PVA. Por fim, as nanopartículas foram congeladas em nitrogênio líquido e submetidas ao processo de liofilização, para secagem e estabilização da nanopartícula formada, por um período de, no mínimo, 24h, e armazenadas em um dessecador. O liofilizador, apresentado na figura 4.2, é dotado de um condensador Helmut Saur Laborbedarf acoplado a uma bomba Edwards Model RV5.

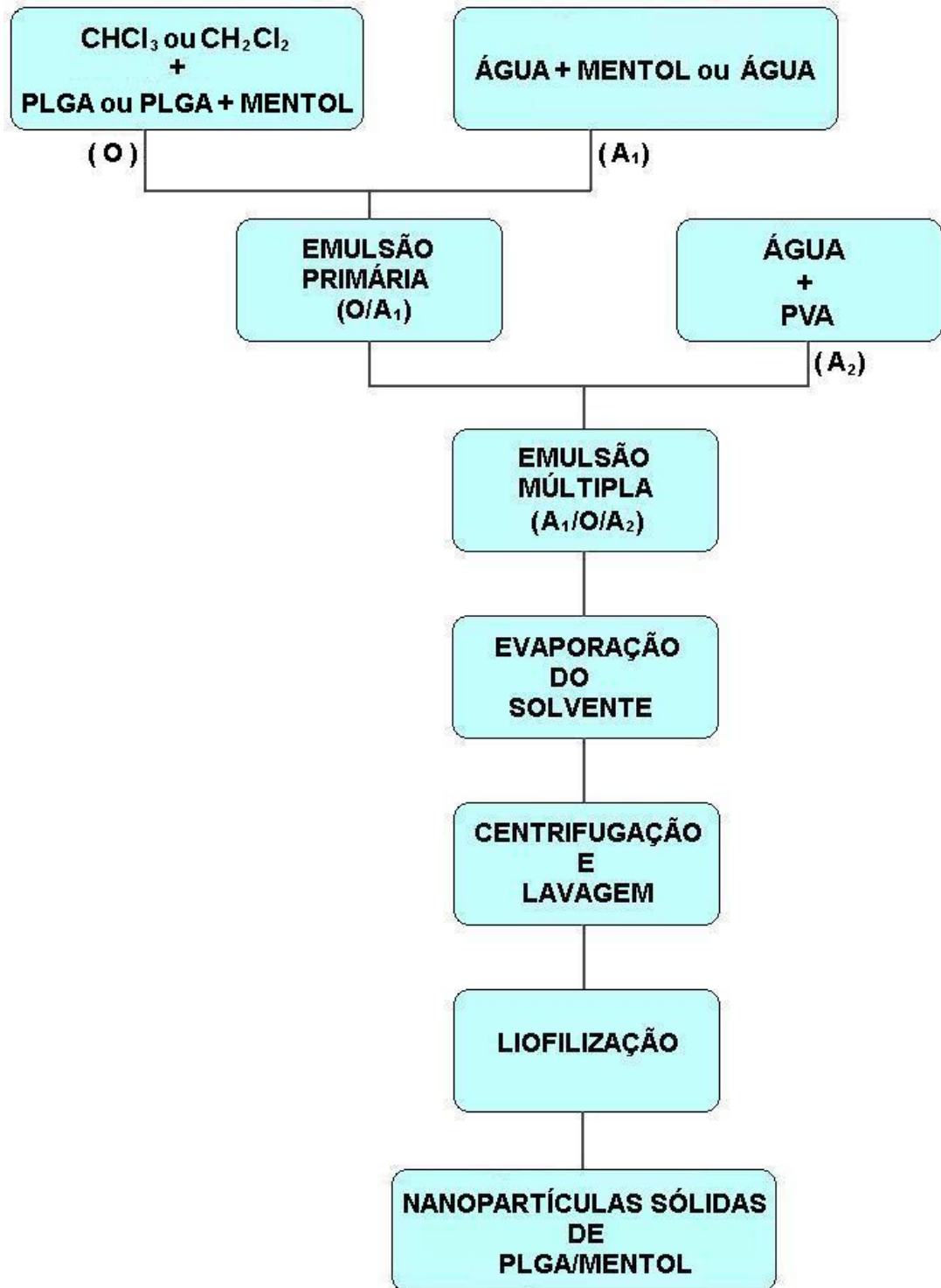


Figura 4.1. Fluxograma do processo por emulsão múltipla e evaporação do solvente para obtenção de nanopartículas de PLGA/mentol.

(adaptado de Lima et al., 2000; Suave et al., 2006)



Figura 4.2. Liofilizador

Fonte: do autor.

As variações nas condições de obtenção das nanopartículas foram estudadas buscando a formação das mesmas com distribuição de tamanho regular e não agregadas, com morfologia e tamanho uniforme, e levando-se em consideração o potencial aumento da eficiência de incorporação. As condições de preparo para as nanopartículas de PLGA/mentol, bem como, para as nanopartículas de PLGA puro e de mentol puro, estão apresentadas na tabela 4.2.

Tabela 4.2. Parâmetros avaliados na preparação das nanopartículas obtidas a partir da técnica de emulsão múltipla e evaporação do solvente.

Etapa do Processo	Primeira Emulsificação (A <sub>1</sub> /O)					Segunda Emulsificação (A <sub>1</sub> /O/A <sub>2</sub> )		Evaporação	Secagem	Nanopartículas
Sistema	MM <sub>PLGA</sub> (g/mol)	Proporção Mentol/PLGA (m/m)	Solvente Orgânico	Fase Oleosa (O)	Fase Aquosa (A <sub>1</sub> )	Fase Aquosa (A <sub>2</sub> )	Velocidade de agitação (rpm)	Tempo de evaporação do solvente (h)	Tempo de Liofilização (h)	
01	10 <sup>3</sup>	1:10	CHCl <sub>3</sub>	PLGA	H <sub>2</sub> O destilada + Mentol	PVA 1%	7.000	12	24	NP-1
02	10 <sup>3</sup>	1:5	CHCl <sub>3</sub>	PLGA	H <sub>2</sub> O destilada + Mentol	PVA 1%	24.000	12	24	NP-2
03	10 <sup>5</sup>	1:5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	PLGA+Mentol	H <sub>2</sub> O destilada	PVA 1%	24.000	13*	24	NP-3
04	10 <sup>5</sup>	1:5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	PLGA+Mentol	H <sub>2</sub> O destilada	PVA 0,5%	24.000	1	72	NP-4
05	10 <sup>5</sup>	1:5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	PLGA+Mentol	H <sub>2</sub> O destilada	PVA 0,5%	24.000	1	24	NP-5
06	10 <sup>5</sup>	1:5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	PLGA+Mentol	H <sub>2</sub> O destilada	PVA 1%	24.000	12	24	NP-6
07	10 <sup>5</sup>	1:5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	PLGA+Mentol	H <sub>2</sub> O destilada	PVA 0,75%	24.000	12	24	NP-7
08	10 <sup>5</sup>	1:5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	PLGA+Mentol	H <sub>2</sub> O destilada	PVA 0,5%	24.000	12	24	NP-8
09	10 <sup>5</sup>	1:2,5	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	PLGA+Mentol	H <sub>2</sub> O destilada	PVA 1%	24.000	12	24	NP-9
10	10 <sup>5</sup>	-	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	PLGA	H <sub>2</sub> O destilada	PVA 1%	24.000	12	24	NP-10
11	-	-	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Mentol	H <sub>2</sub> O destilada	PVA 1%	24.000	12	24	NP-11

\* O solvente foi eliminado sob agitação a temperatura ambiente e pressão atmosférica por 12h e com pressão reduzida na temperatura de 40 °C por 1h.

O solvente orgânico utilizado para formar nanopartículas de PLGA, conforme a literatura (Suave et al., 2006; Santos, Fialho, 2007; Gonnet et al., 2010; Costa, 2002; Moura et al., 2010; Lima et al., 2000; Oliveira, 2009; Schaffazick et al., 2003), deve ser imiscível com água como o diclorometano e o clorofórmio. Os sistemas 01 e 02 foram preparados com clorofórmio, já os demais sistemas foram preparados com diclorometano, pois este apresenta melhor potencial de solubilidade para o PLGA com maior massa molecular. E ainda, o diclorometano apresenta menor ponto de ebulição, sendo mais volátil do que o clorofórmio, tornando-se mais fácil de remover na etapa de evaporação do solvente.

#### **4.2.2. Técnicas de Caracterização**

As caracterizações das nanopartículas foram feitas utilizando-se técnicas de espectroscopia vibracional de infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise termogravimétrica (TGA) a fim de verificar as propriedades térmicas, morfológicas e aplicações das nanopartículas obtidas.

##### **4.2.2.1. Espectroscopia Vibracional de Infravermelho (IV)**

As nanopartículas de PLGA contendo mentol foram caracterizadas segundo sua estrutura química por técnica de infravermelho empregando um espectrômetro Perkin Elmer Instruments Spectrum One FT-IR Spectrometer Hair Sampling Accessory, no intervalo de 4.000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ . Para análise das amostras sólidas foram feitos filmes ou pastilhas com KBr. Para a obtenção de filmes as amostras sólidas foram solubilizadas em THF, e depois analisadas com o auxílio do acessório de ATR para líquidos.

##### **4.2.2.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

Os eventos térmicos, temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), temperatura de fusão ( $T_m$ ) e temperatura de cristalização ( $T_c$ ), do polímero e/ou do aroma, foram obtidos através da análise de DSC em um equipamento TA Instruments, modelo

Q20, com ciclos de aquecimento (10°C/min) e resfriamento (10°C/min) em atmosfera de N<sub>2</sub>. As análises foram feitas em duplicata.

#### 4.2.2.3. Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas foram realizadas em um equipamento Q 600 TA Instruments utilizando uma rampa de aquecimento de 20°C/min da temperatura ambiente até 1200°C. As análises foram feitas em duplicata.

#### 4.2.2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Essa técnica tem por objetivo a análise detalhada da morfologia e da superfície da amostra. As caracterizações por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), PHILIPS modelo XL30 com resolução de 3,5 nm (no modo elétron secundário) e faixa de magnificação foi de 500 a 16.000 vezes, tensão de aceleração de 20 kV, utilizando ouro para metalização das amostras. A faixa de diâmetro das partículas, foi obtida utilizando o software ImageJ.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos neste trabalho, utilizando a técnica de emulsão múltipla e evaporação do solvente, conforme descrito anteriormente na metodologia. As nanopartículas, NP-3, NP-6, NP-7, NP-8 e NP-9, apresentaram aroma característico de mentol perceptível ao olfato.

### **5.1. Efeito dos parâmetros de processo na formação das partículas de PLGA/Mentol**

#### **5.1.1. Velocidade de agitação**

As micrografias obtidas por MEV das nanopartículas NP-1 e NP-2, mostraram que, uma maior velocidade de agitação durante o processo de emulsificação (24.000 rpm) produziu micropartículas de PLGA/mentol com tamanho menor (figura 5.1b), e com diâmetro médio das partículas de 1.116 a 2.747 nm numa distribuição mais homogênea com forma esférica e com superfície lisa. Enquanto que para as NP-1 (emulsificação feita em 7.000 rpm) o diâmetro médio foi de 5.603 a 13.103 nm como mostra a figura 5.1a apresentando uma estrutura aglomerada e certa irregularidade e, ainda, percebe-se que algumas estão rompidas, possivelmente por não estarem completamente formadas. Contudo é possível observar que as partículas obtidas são densas mostrando a formação de microesferas. Estes resultados estão de acordo com a literatura (Oliveira, 2009), confirmando que quanto maior a velocidade de agitação menor o tamanho de partícula obtido, mostrando ter grande influência no processo de emulsificação, sendo fundamental seu ajuste correto para a otimização da metodologia de preparação das nanopartículas.



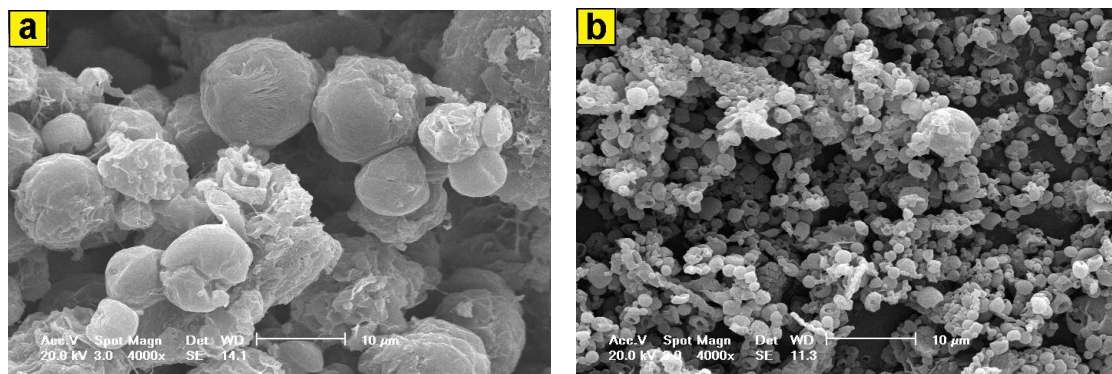


Figura 5.1. Micrografias das nanopartículas NP-1 (a) e NP-2 (b), com o aumento de 4000X.

### 5.1.2. Massa molecular do PLGA

As microesferas NP-1 e NP-2 foram preparadas com um PLGA sintetizado no LOR (Laboratório de Organometálicos e Resinas), através de uma reação de policondensação direta, obtendo-se um copolímero com razão 50:50 L-lactíde:glicolíde e de baixa massa molecular ( $10^3$  g/mol). Os demais sistemas foram preparados com um PLGA comercial da PURAC (PLG 8523 com 85:15 L-lactíde:glicolíde), com massa molecular  $10^5$  g/mol. Optou-se por utilizar um polímero com maior massa molecular, pois as NP-1 e NP-2 resultaram em micropartículas sem aroma aparente, mas posteriormente foi identificada pequena quantidade de mentol incorporado nas mesmas pela técnica de infravermelho. As nanoesferas NP-3 foram obtidas com o polímero comercial PLG 8523 da mesma forma que as anteriores, apresentando aroma característico, comprovando a necessidade de usar-se um polímero com massa molecular maior.

### 5.1.3. Tempo de evaporação do solvente

O solvente orgânico utilizado foi eliminado sob agitação pela difusão e evaporação do mesmo a temperatura ambiente e pressão atmosférica por 12h, ou com pressão reduzida utilizando-se um rotaevaporador, na temperatura de 40 °C por 1h. Os sistemas onde o solvente orgânico foi removido em apenas 1h geraram nanoesferas sem aroma característico aparente. Os demais sistemas apresentados

na tabela 4.2, onde o solvente orgânico foi removido lentamente (12h), resultaram em nanoesferas com aroma.

As nanoesferas NP-3 foram preparadas conforme o sistema 03, onde o solvente foi evaporado lentamente por 12h e em seguida, a emulsão obtida, passou por um rotaevaporador por 1h, com pressão reduzida, para verificar se havia algum solvente residual. A não presença de solvente residual mostrou a eficácia na eliminação do solvente pela evaporação lenta (12h), optando-se pela retirada de solvente sempre desta maneira. Desta forma, devido ao tempo de evaporação do solvente, que foi removido rapidamente (1h) as nanopartículas NP-4 e NP-5, não apresentaram aroma característico de mentol.

A técnica de infravermelho possibilitou analisar a presença do mentol incorporado na matriz de PLGA das nanoesferas, desta forma, foi usada a referida técnica para análise das nanoesferas produzidas com PLGA e mentol, comparando com os espectros do PLGA puro e do mentol puro.

A figura 5.2 mostra o espectro de infravermelho do PLGA puro, onde se observou bandas de absorção na região de  $2982\text{ cm}^{-1}$  e  $2876\text{ cm}^{-1}$  característica do estiramento da ligação C-H de  $\text{CH}_3$ . E ainda, três fortes bandas devidas a vibrações do grupo  $\text{C}(\text{CO})\text{OC}$ , ou seja, devido ao estiramento do  $\text{C}=\text{O}$  em  $1757\text{ cm}^{-1}$ , ao estiramento assimétrico do CO em  $1183\text{ cm}^{-1}$  e em  $1090\text{ cm}^{-1}$  ao estiramento simétrico COC. As atribuições das bandas de absorção características do PLGA apresentadas estão em acordo com a literatura (Motta, Duek, 2006; Soares et al., 2005; Silverstain et al., 1994).

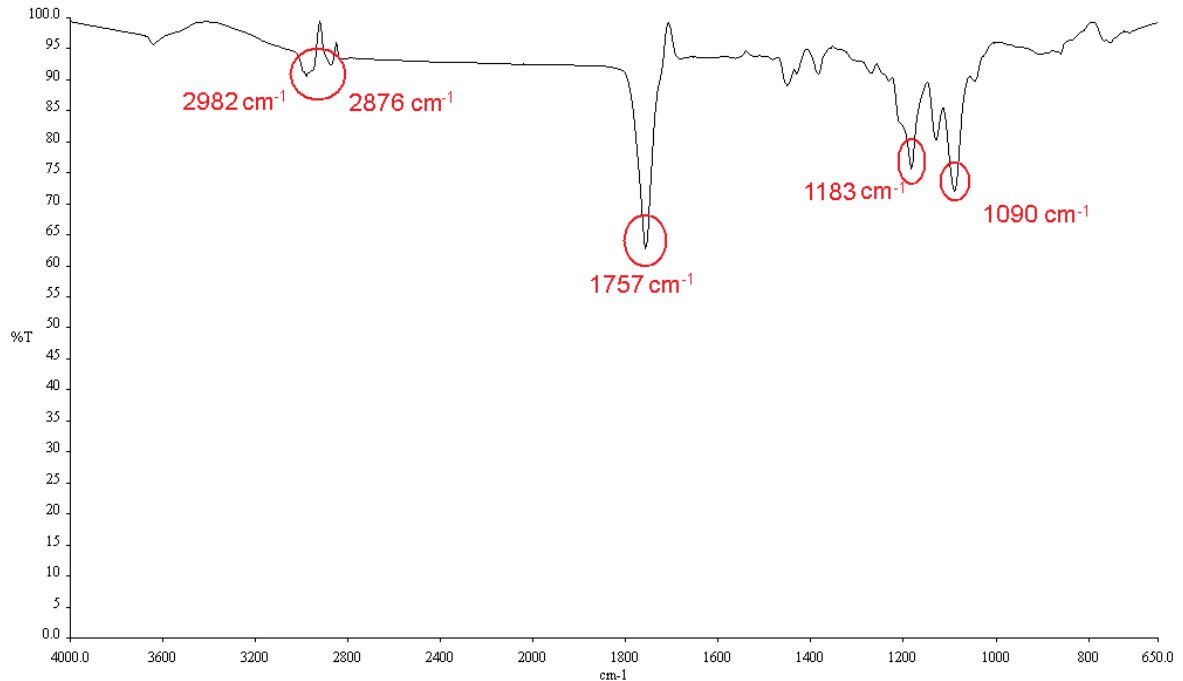


Figura 5.2. Espectro de infravermelho do PLGA puro.

O espectro de infravermelho do mentol puro (figura 5.3) apresenta a banda característica ao estiramento da ligação O-H em  $3276\text{ cm}^{-1}$  e ainda quatro fortes bandas em  $1044\text{ cm}^{-1}$  atribuída a álcool secundário alicíclico (anel de 6 átomos),  $919\text{ cm}^{-1}$  atribuída às vibrações de deformação angular assimétrica no plano do grupo isopropila (Silverstain et al., 1994),  $876\text{ cm}^{-1}$  e  $769\text{ cm}^{-1}$ . A figura 5.4 mostra o espectro de infravermelho das nanoesferas NP-3, que apresentaram aroma característico de mentol, a presença da banda de absorção característica do grupo C=O de éster ( $1757\text{ cm}^{-1}$ ) comprova que as nanoesferas obtidas foram efetivamente formadas pelo polímero PLGA e as bandas em  $911\text{ cm}^{-1}$  atribuída às vibrações de deformação angular assimétrica no plano do grupo isopropila,  $870\text{ cm}^{-1}$ ,  $804\text{ cm}^{-1}$  e  $755\text{ cm}^{-1}$ , evidenciam a presença de mentol nas nanoesferas. Para confirmar inequivocamente a presença de mentol também foi analisado o espectro de infravermelho das NP-3 obtido pelo modo de transmissão (figura 5.5), onde se pode observar a banda intensa de OH em torno de  $3400\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento da ligação O-H do mentol, e as bandas em  $869\text{ cm}^{-1}$  e  $756\text{ cm}^{-1}$  atribuídas ao mentol.

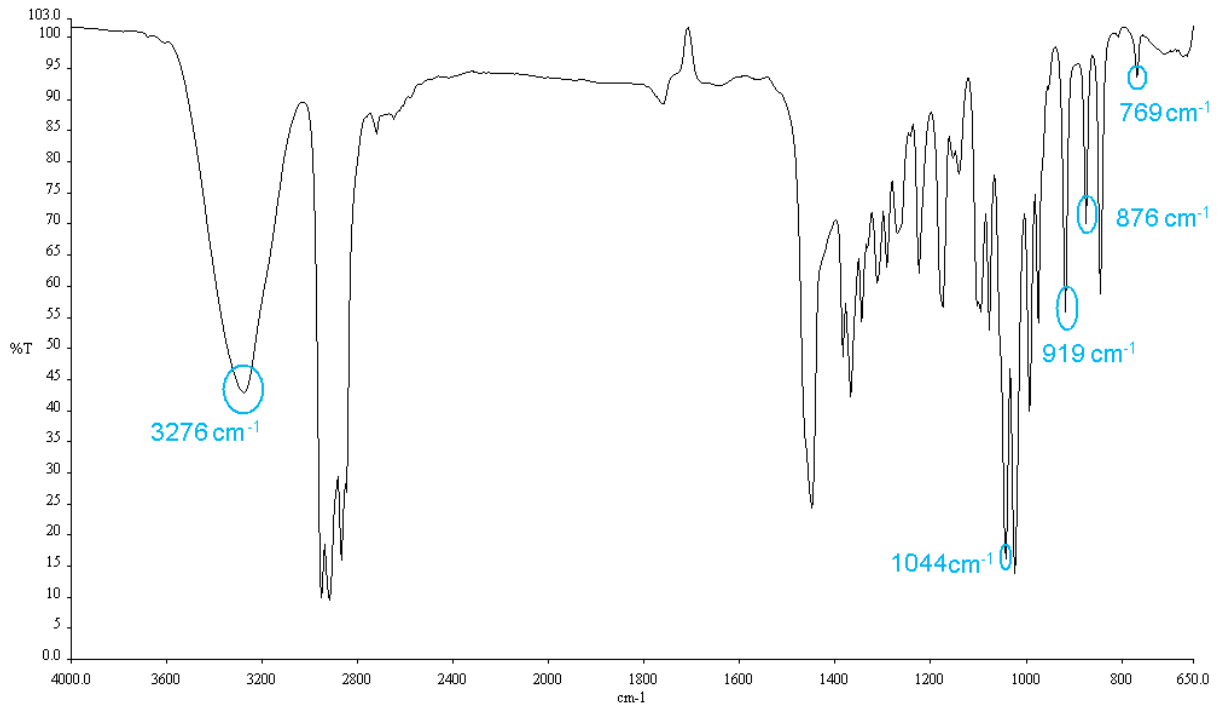


Figura 5.3. Espectro de infravermelho do mentol puro.

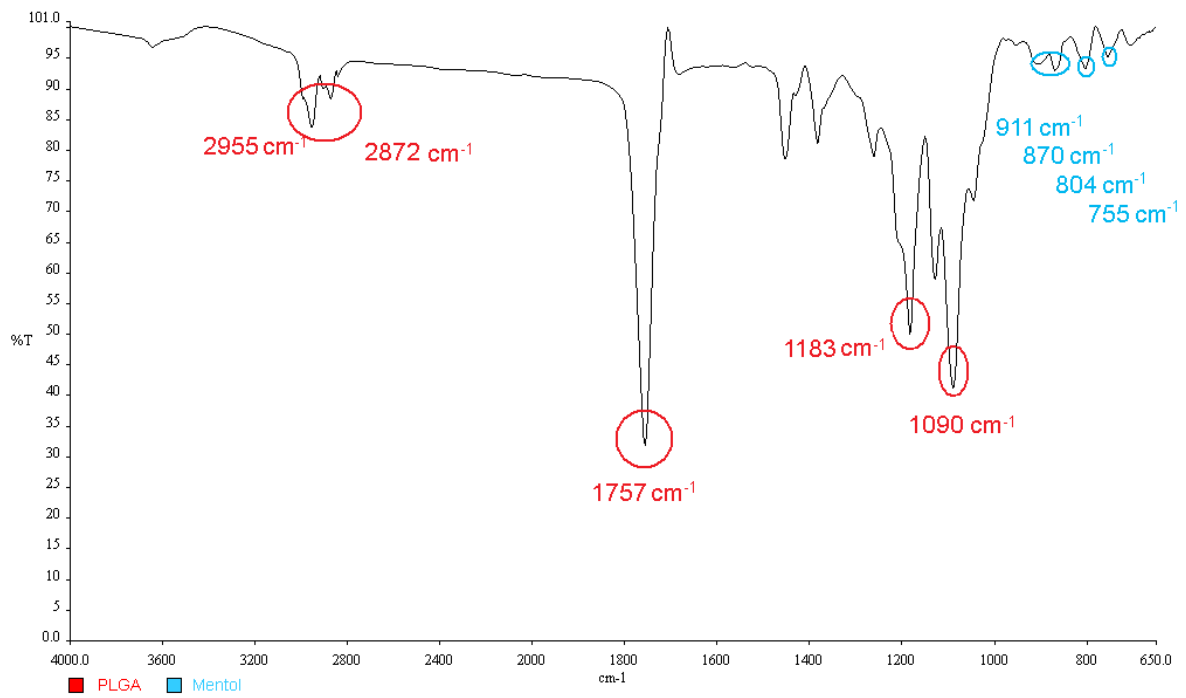


Figura 5.4. Espectro de infravermelho das nanoesferas NP-3.

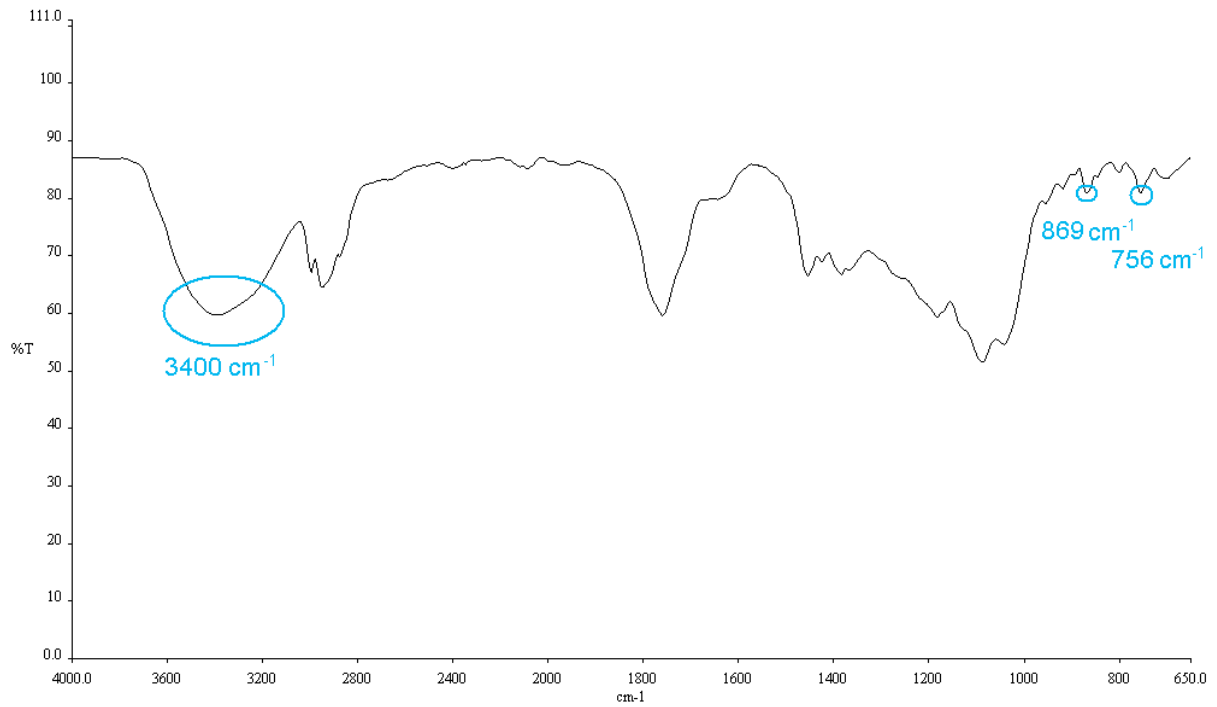


Figura 5.5. Espectro de infravermelho (técnica de transmissão) das nanoesferas NP-3.

A seguir são apresentadas as micrografias obtidas por MEV do PLGA, do mentol e do PVA (Figura 5.6. a, Figura 5.6. b e Figura 5.6. c, respectivamente).

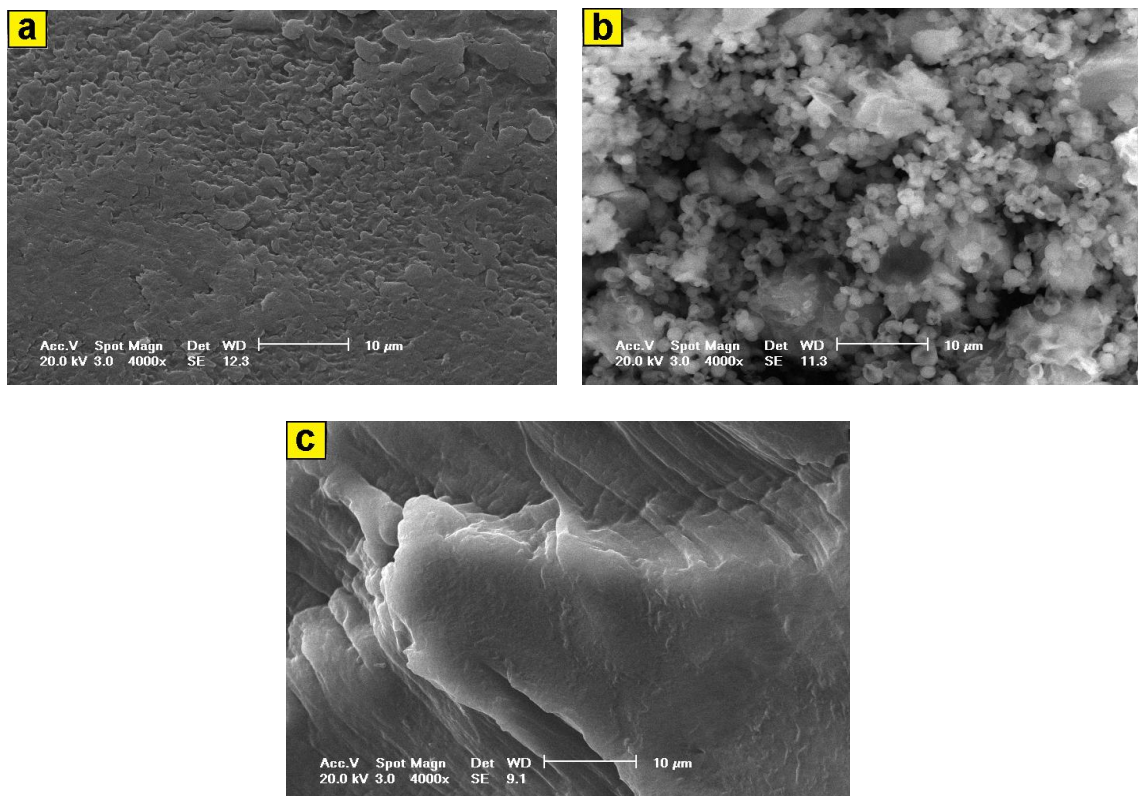


Figura 5.6. Micrografias do PLGA puro (a), do mentol (b) e do PVA (c) aumentos de 4000X.

Na tentativa de se verificar se as nanoesferas formadas com PLGA/mentol também seriam formadas se fosse utilizado apenas PLGA ou mentol preparou-se as NP-10 (PLGA) e NP-11 (mentol) cujas micrografias são mostradas nas Figura 5.7. a e b. No caso da NP-10 obtiveram-se nanoesferas com forma esférica, porém agregadas e com heterogeneidade de tamanho, e para NP-11 não houve a formação de nanopartículas de mentol corroborando com o fato de que as nanoesferas preparadas com PLGA/mentol são distintas como conseqüência da incorporação do mentol na matriz polimérica.

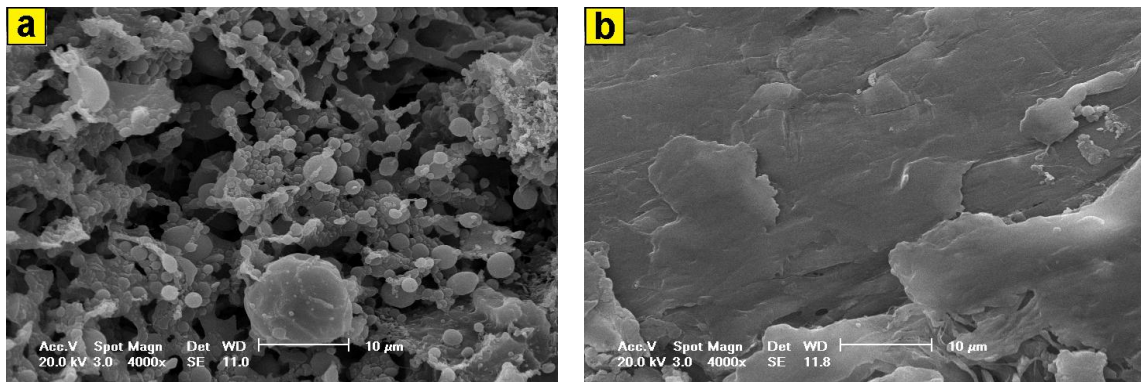


Figura 5.7. Micrografias das nanopartículas NP-10 (a) e NP-11 (b), com o aumento de 4000X.

As micrografias das nanopartículas que apresentaram aroma característico, figuras 5.8 (NP-3) e 5.9 (NP-6), revelaram partículas com formato oval e uma estrutura de partículas agregadas como se fossem contas unidas. Deve-se levar em conta que a forma de preparação para análise pode influenciar a morfologia do material. O diâmetro médio para as NP-3 foi de 1.897 a 5.776 nm. Nanopartículas poliméricas são freqüentemente definidas como partículas na faixa de 10 a 1000 nm, este termo abrange nanoesferas e nanocápsulas. Neste trabalho, foram preparadas micro e nanoesferas, que são partículas com estrutura matricial, ou seja, cuja massa inteira é sólida e as moléculas podem ser adsorvidas na superfície esférica ou incorporadas dentro da partícula. Em geral, as nanoesferas, são esféricas, mas "nanoesferas" com uma forma não esférica, são também descritas na literatura (Prasad Rao and Geckeler, 2011). E ainda, nanopartículas de policaprolactona semelhantes foram obtidas por Abdelwahed et al. (2006), mostrado na figura 5.10, que atribuem esta particularidade morfológica ao surfactante utilizado (PVA).

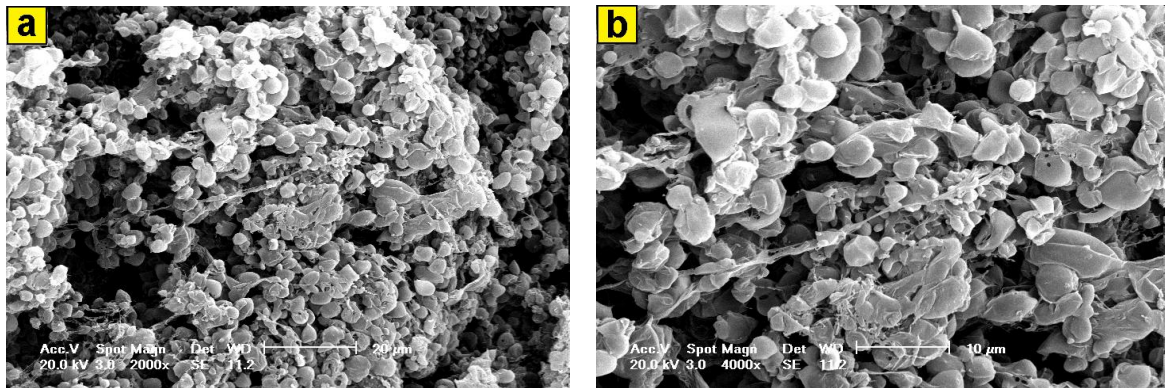


Figura 5.8. Micrografias das nanoesferas NP-3, com os aumentos de: a) 2000X ; b) 4000X.

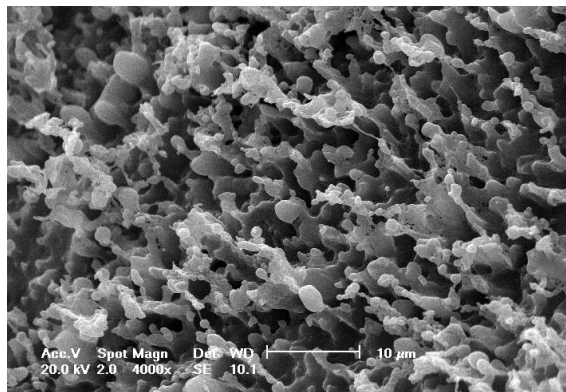


Figura 5.9. Micrografias das nanoesferas NP- 6, com o aumento de 4000X.

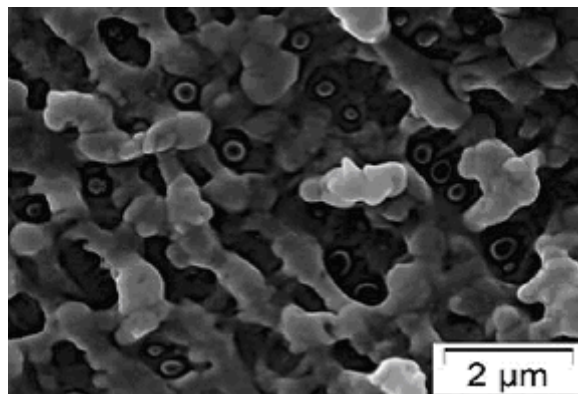


Figura 5.10. Micrografias das nanocápsulas de policaprolactona estabilizadas com PVA.

Fonte: Abdelwahed et al., 2006.

#### 5.1.4. Concentração de surfactante PVA na fase aquosa A2

Os espectros de infravermelho a seguir, figuras 5.11, 5.12 e 5.13, são relativos às nanopartículas que diferem na concentração de surfactante PVA na fase aquosa A<sub>2</sub>. A fase aquosa A<sub>2</sub> foi preparada nas concentrações de 1% (NP-6), 0,75%

(NP-7) e 0,5 % (NP-8) de PVA (m/v). A partir da análise dos espectros, observa-se que, a intensidade das bandas referentes ao mentol é inversamente proporcional a concentração de PVA utilizada nos sistemas, ou seja, quanto menor a concentração de PVA maior a intensidade das bandas em torno de  $1047\text{ cm}^{-1}$ ,  $910\text{ cm}^{-1}$ ,  $870\text{ cm}^{-1}$  e  $755\text{ cm}^{-1}$ , associadas ao aroma utilizado.

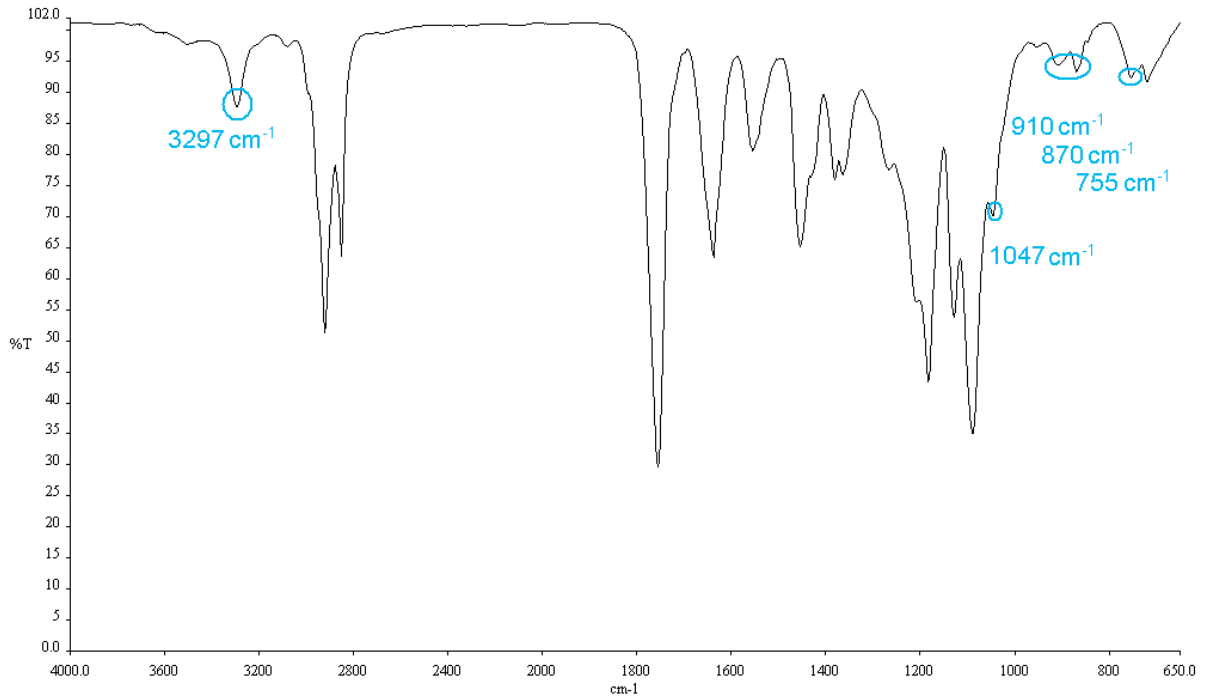


Figura 5.11. Espectro de infravermelho das nanoesferas NP-6 (1% de PVA m/v).



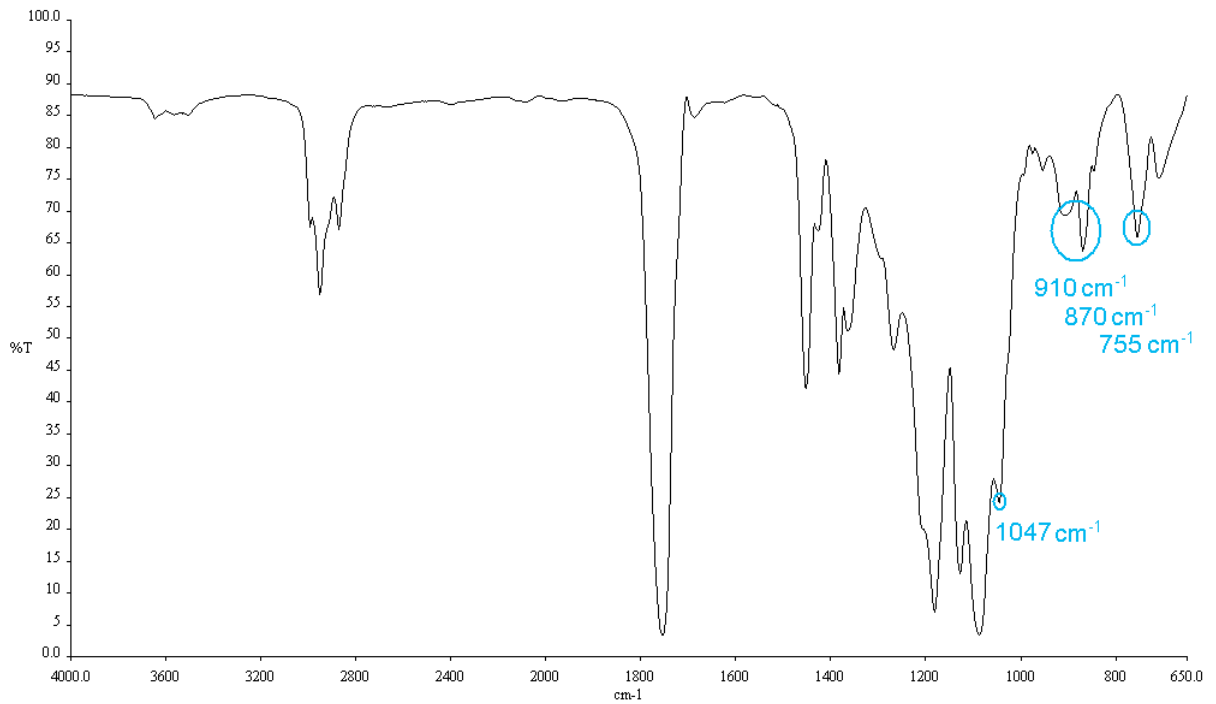


Figura 5.12. Espectro de infravermelho das nanoesferas NP-7 (0,75% de PVA m/v).

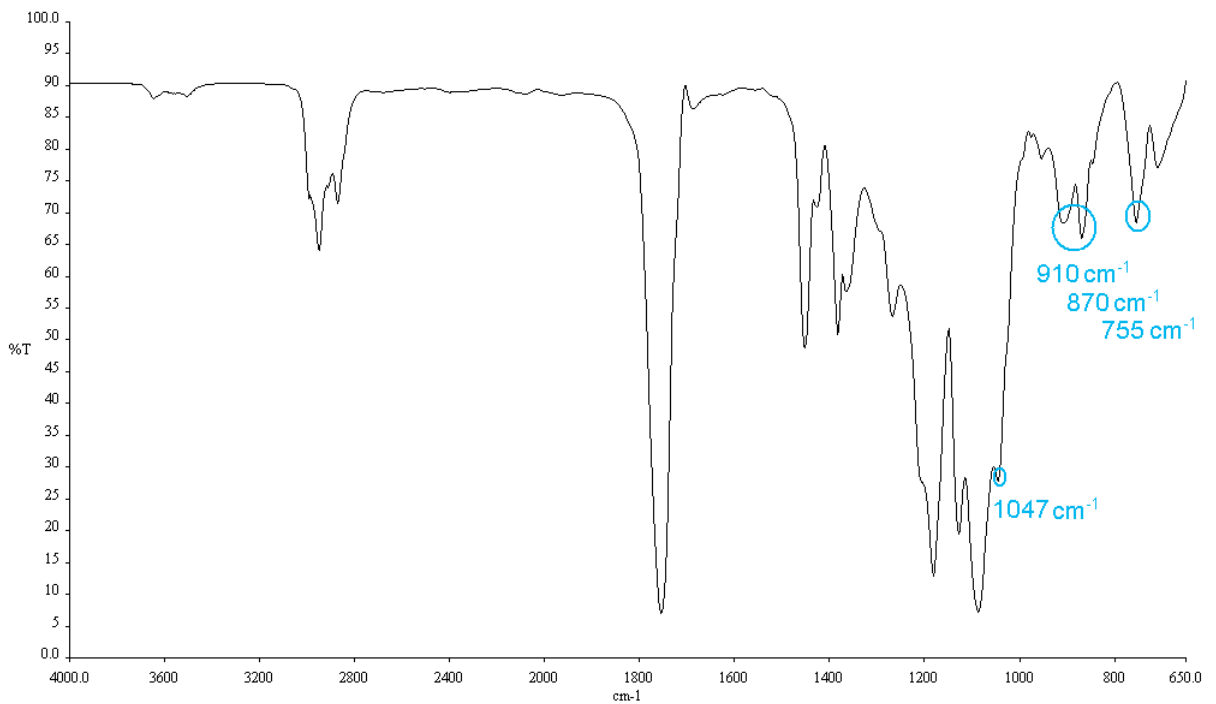


Figura 5.13. Espectro de infravermelho das nanoesferas NP-8 (0,5% de PVA m/v).

A fim de confirmar, a afirmação feita anteriormente, obtiveram-se os espectros de infravermelho no modo absorbância (figura 5.14), posteriormente

mediram-se as alturas relativas às bandas do PLGA em aproximadamente  $1754\text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento do C=O, e do mentol em  $1044\text{ cm}^{-1}$  atribuída a álcool secundário alicíclico (anel de 6 átomos) e  $919\text{ cm}^{-1}$  atribuída às vibrações de deformação angular assimétrica no plano do grupo isopropila. A tabela 5.1, apresenta as alturas normalizadas das bandas de mentol, isto é, a relação entre as alturas das bandas do mentol e de PLGA, utilizando a banda de  $1754\text{ cm}^{-1}$  respectivo ao PLGA como referencia, confirmando-se desta forma, a relação de que quanto maior a concentração de PVA menor a quantidade de mentol incorporada na matriz de PLGA.

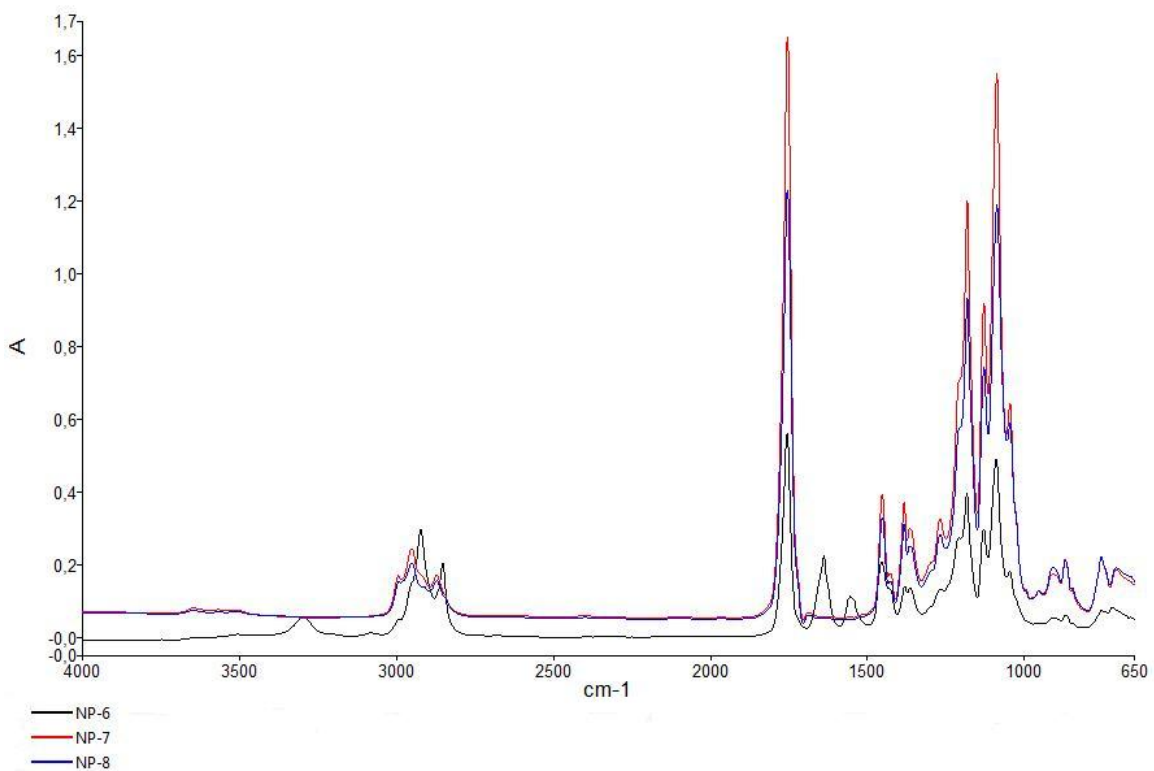


Figura 5.14. Espectro de infravermelho das nanoesferas NP-6, NP-7 e NP-8.

Tabela 5.1. Relação entre alturas dos picos de PLGA e mentol das NP-6, NP-7 e NP-8.

Sistema	% PVA (m/v)	$h_{1754}$	$h_{1044}$	$h_{919}$	$h_{1044}/h_{1754}$	$h_{919}/h_{1754}$
NP-6	1	0,5597	0,0172	0,0186	0,0307	0,0332
NP-7	0,75	1,6535	0,6475	0,1770	0,3916	0,1070
NP-8	0,5	1,2325	0,5923	0,1957	0,4806	0,1588

Abdelwahed et al. (2006), investigaram o efeito da variação na concentração do estabilizador PVA nas nanopartículas de policaprolactona onde observaram que o tamanho das nanopartículas diminui à medida que a concentração de PVA aumenta. Existindo um valor limite onde, um pequeno aumento no tamanho de partícula é observado. O aumento no tamanho das partículas, quando a concentração de PVA está acima de um valor limite é resultado do aumento na viscosidade. No nosso caso, não se observou variação significativa do tamanho de partícula com a variação da concentração de PVA na fase aquosa A<sub>2</sub>, provavelmente por que não se atingiu um limite de concentração de PVA.

#### **5.1.5. Proporção Mentol/PLGA**

O sistema 02 (NP-2) difere do sistema 01 (NP-1) em dois aspectos: proporção mentol/PLGA e velocidade de agitação. A maior proporção de mentol utilizada no sistema 02, não apresentou variação significativa na eficiência de incorporação, uma vez que os dois sistemas não apresentaram aroma aparente.

No espectro das nanopartículas NP-9 (figura 5.15), observam-se bandas na região de  $3506\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao grupo OH do PLGA e em  $3300\text{ cm}^{-1}$  (OH),  $1067\text{ cm}^{-1}$ ,  $908\text{ cm}^{-1}$  e  $755\text{ cm}^{-1}$  características do mentol. A variação no número de onda das bandas referentes aos OH de PLGA e mentol indicam possível interação entre as mesmas através de ligações de hidrogênio.

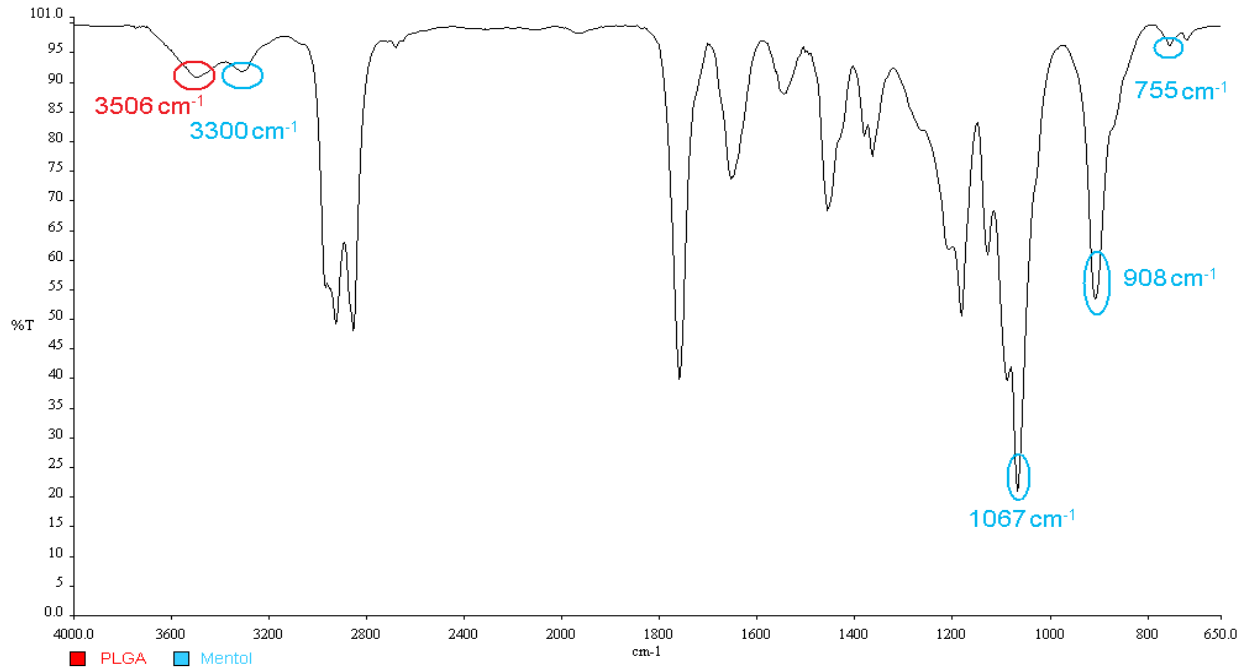


Figura 5.15. Espectro de infravermelho das nanopartículas NP-9.

A Figura 5.16 mostra os espectros de infravermelho no modo absorvância das nanopartículas NP-6 e NP-9. Conforme procedimento explicado anteriormente (seção 5.1.4) construiu-se a tabela 5.2 a partir das alturas relativas entre mentol e PLGA para confirmar o aumento de mentol incorporado na matriz polimérica como consequência da maior proporção de mentol/PLGA utilizado.

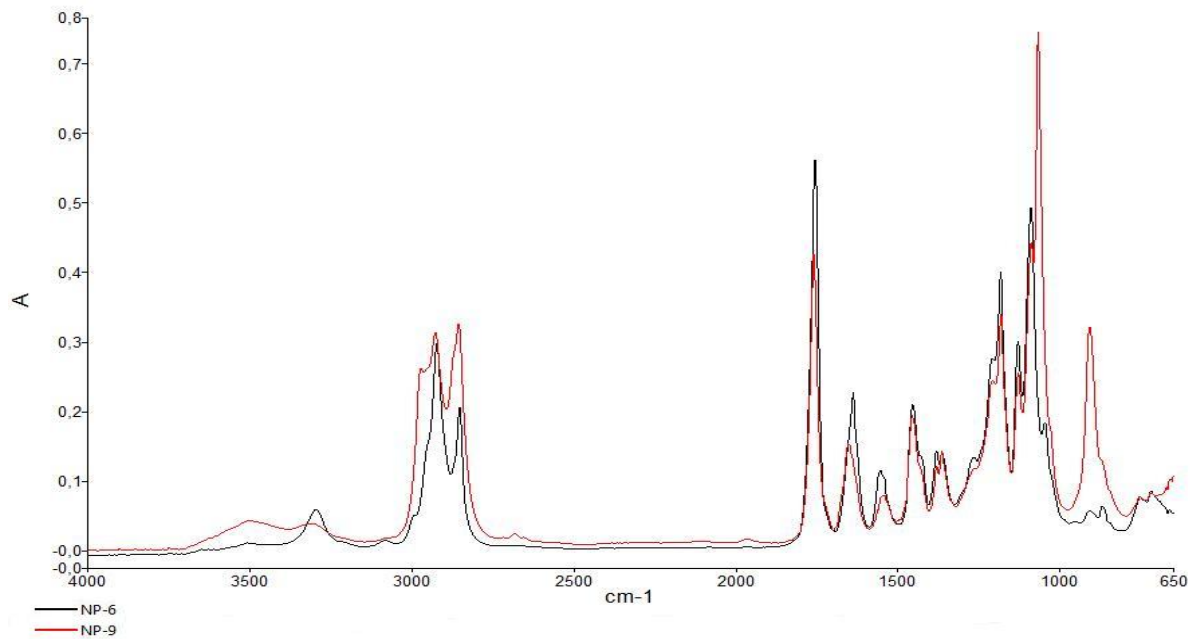


Figura 5.16. Espectro de infravermelho das nanoesferas NP-6 e NP-9.

Tabela 5.2. Relação de altura entre os picos de PLGA e mentol das NP-6 e NP-9.

Proporção mentol/PLGA (m/m)	$h_{1754}$	$h_{1044}$	$h_{919}$	$h_{1044}/h_{1754}$	$h_{919}/h_{1754}$
1:5 (NP-6)	0,5597	0,0172	0,0186	0,0307	0,0332
1:2,5 (NP-9)	0,4277	0,7476	0,3232	1,7480	0,7550

Foi realizada uma avaliação preliminar da eficiência de incorporação de mentol nas nanoesferas, apresentada na tabela 5.3. Observou-se que um maior percentual de mentol foi incorporado (até 30% na NP-8, Tabela 5.3) à medida que se reduziu a concentração do surfactante (PVA). Este resultado já foi discutido na seção 5.1.4. Da mesma forma, houve um aumento de até 60% de incorporação de mentol (NP-9, Tabela 5.3) na medida em que se dobrou a quantidade de mentol utilizado na preparação das nanoesferas em comparação com outras preparadas sob mesmas condições (NP-6, Tabela 5.3).

Tabela 5.3. Eficiência de incorporação de mentol nas NP-6, NP-7, NP-8 e NP-9.

Nanoesferas	% PVA (m/v)	% de mentol teórico (m/m)	$h_{1754}$	$h_{1044}$	$h_{919}$	Eficiência <sub>1044</sub> (%)	Eficiência <sub>919</sub> (%)
NP-6	1	20	0,5597	0,0172	0,0186	2,98%	3,22%
NP-7	0,75	20	1,6535	0,6475	0,1770	28,14%	9,67%
NP-8	0,5	20	1,2325	0,5923	0,1957	32,46%	13,7%
NP-9	1	40	0,4247	0,7476	0,3232	63,77%	43,21%

A tabela 5.4 apresenta as propriedades térmicas obtidas pela técnica de DSC para o PLGA puro, mentol puro, PVA puro e para as nanoesferas preparadas com PLGA/mentol (as curvas de DSC encontram-se no ANEXO A). A análise de DSC para o PLGA puro exibe um evento endotérmico em 53 °C referindo-se ao pico de temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), nenhum ponto de fusão é observado, porque este copolímero é de natureza amorfa, confirmando a literatura de referência (Motta, Duek, 2006; Mainardes et al., 2006). O mentol apresenta temperatura de fusão ( $T_m$ ) de 32,45 °C e de cristalização ( $T_c$ ) de 18,15 °C, o PVA apresenta as temperaturas

de fusão e cristalização de: 175,25 °C e 116,23 °C, e também a temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), em torno de 35 °C.

As NP-3 apresentaram aroma característico de mentol e as temperaturas de fusão (151 °C), cristalização (154 °C) e de transição vítrea (41 °C), em contrapartida as nanoesferas NP-4 que não apresentaram o aroma de mentol perceptível ao olfato, apresentaram somente temperatura de transição vítrea em 48 °C. As nanopartículas NP-6, NP-7 e NP-8 apresentaram as seguintes temperaturas de transição vítrea: 37 °C, 46 °C e 41 °C, todas encontram-se em uma faixa intermediária entre a  $T_g$  do polímero e do agente tensoativo. As NP-6 e NP-9 apresentaram eventos térmicos muito semelhantes, apesar de conterem em suas formulações proporções diferentes de mentol em relação à massa de polímero.

Tabela 5.4. Propriedades térmicas obtidas pela técnica de DSC.

<b>Amostra</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>c</sub> (°C)</b>	<b>T<sub>g</sub> (°C)</b>	<b>ΔH<sub>m</sub>(J/g)</b>
PLGA (comercial)	-	-	52,87	-
Mentol	32,45	18,15	-	45,01
PVA	175,25	116,23	35,00	17,87
NP-3	151,82;189,22	154,09	41,53	3,35;3,17
NP-4	-	-	48,26	-
NP-6	178,51	124,60	37,20	2,20
NP-7	-	151,82	45,87	-
NP-8	181,74	129,56	40,56	2,90
NP -9	181,36	128,58	39,84	1,88

#### 5.1.6. Tempo de liofilização

As nanopartículas NP-4 foram obtidas com um sistema semelhante ao das NP-5, exceto pelo tempo de liofilização que, para a primeira foi de 72h e para a última foi de 24h. Observou-se que com um maior tempo de liofilização obteve-se,

um sistema de nanopartículas mais heterogêneo, onde as nanopartículas obtidas apresentaram forma esférica de aparência uniforme, porém ora agregadas na forma de cadeias como mostra a figura 5.17a e em outros pontos como esferas soltas (Figura 5.17b). A figura 5.18 mostra as micrografias para a liofilização em um período de 24h, estas apresentaram um material homogêneo e nanopartículas menores (intervalo de diâmetro médio de 217 a 783 nm para NP-5) quando comparadas com as obtidas com maior tempo de liofilização (intervalo de diâmetro médio de 476 a 2.424 nm para NP-4), onde estão presentes micro e nanoesferas. A faixa de diâmetro das partículas NP-4 (fig. 5.17b) e NP-5 (fig. 5.18b), foi obtida utilizando o software ImageJ.

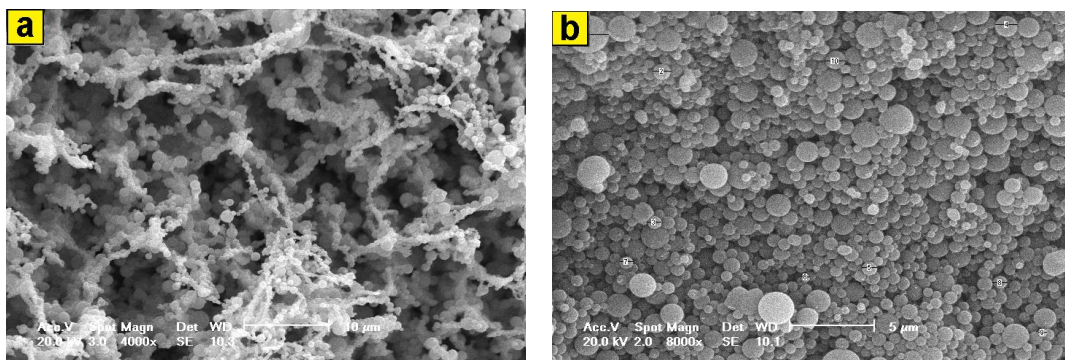


Figura 5.17. Micrografias das nanopartículas NP-4, com os aumentos de: a) 4000X ; b) 8000X.

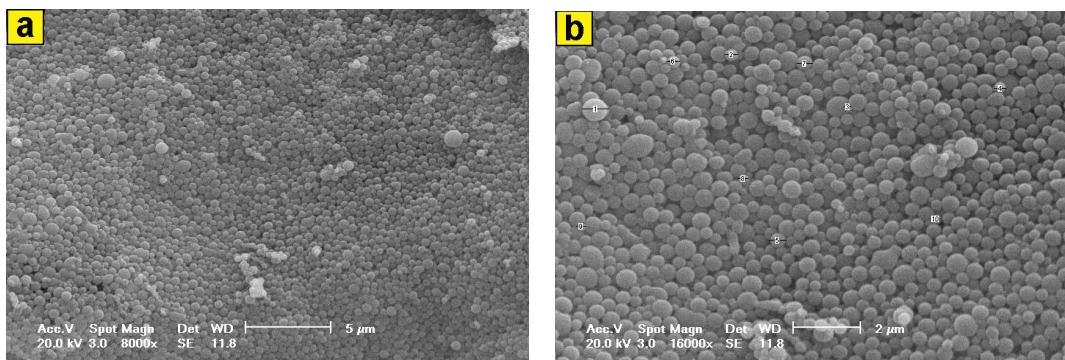


Figura 5.18. Micrografias das nanopartículas NP-5, com os aumentos de: a) 8000X ; b) 16000X.

## 5.2. Propriedades térmicas das nanopartículas de PLGA/mentol

A curva de TGA do PLGA (figura 5.19a), mostra que o polímero apresenta estabilidade térmica até 260 °C. A perda de peso, atribuído à decomposição térmica do polímero, ocorre em uma única etapa, entre 267 °C e 402 °C (99,14%), os dados obtidos através da análise térmica são compatíveis com os valores, de estabilidade térmica até 250 °C e perda de peso de PLGA atribuído à decomposição térmica entre 320 e 390 °C (96,60%), citados na literatura de referência (Mainardes et al., 2006). No termograma do mentol (figura 5.19b), observou-se apenas uma etapa de degradação térmica definida entre 55 °C e 175 °C, com perda de peso de 99,72%. A degradação térmica do PVA (figura 5.19c) ocorreu em três etapas distintas.

As nanopartículas NP-5 (não apresentaram aroma perceptível ao olfato), apresentaram duas etapas de degradação térmica (figura 5.19d), sendo a etapa com maior perda de massa (91,50%), entre 267 °C e 390 °C, característico da degradação do polímero. As nanopartículas NP-3 (apresentaram aroma perceptível ao olfato), apresentaram quatro etapas de degradação térmica (figura 5.19e), sendo que, a etapa característica da degradação térmica do mentol, ocorre de 65 °C a 156 °C, com perda de massa de 2,443%.

O termograma das nanopartículas com maior concentração de mentol em sua formulação (NP-9), apresentado na figura 5.19f, mostrou-se semelhante ao das nanopartículas NP-3. Contudo, estas apresentaram maior perda de massa relativa ao mentol (3,875%), ou seja, aproximadamente 60% mais mentol foi incorporado a estas nanopartículas em relação as NP-3.



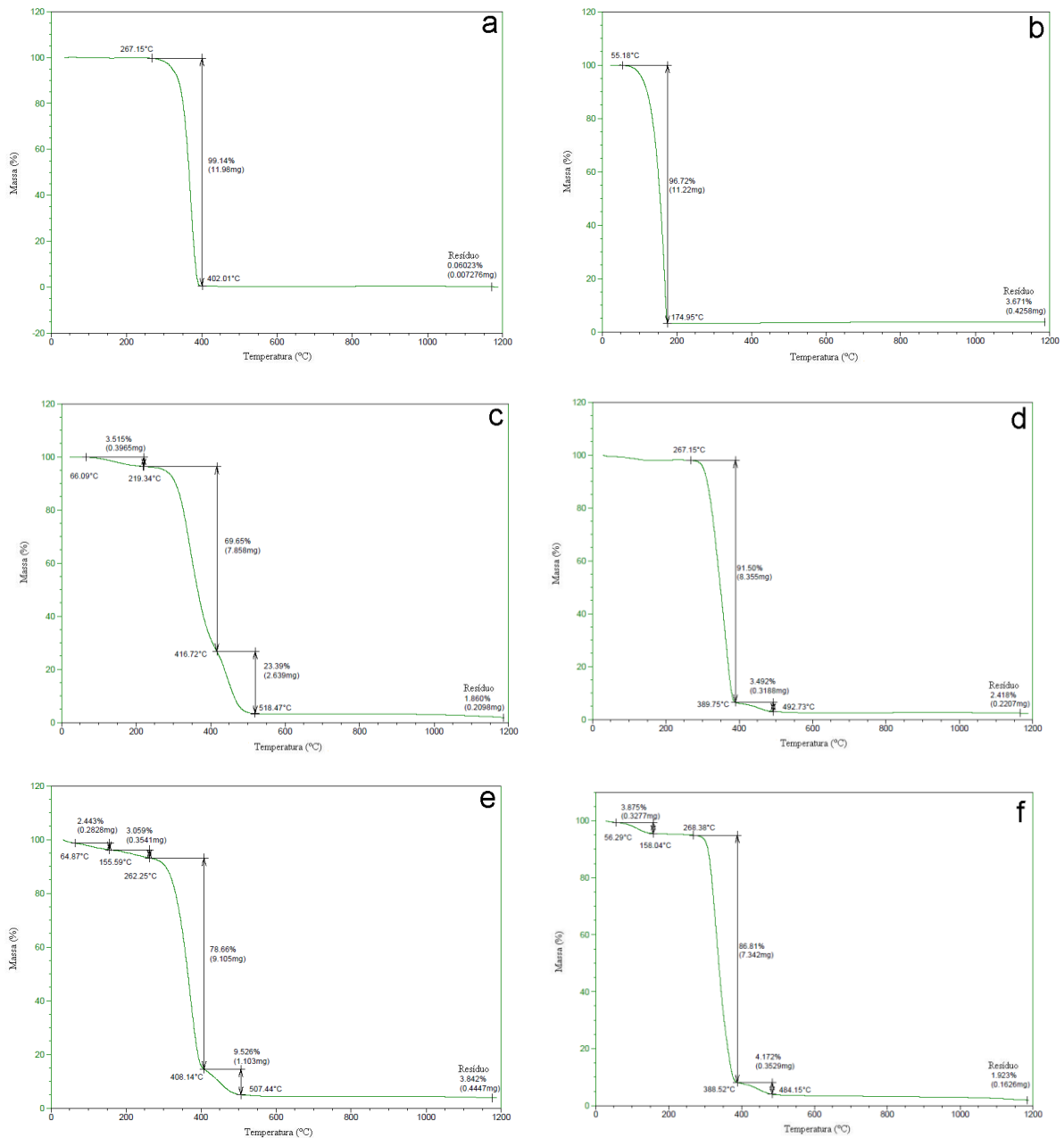


Figura 5.19. Termogramas: a) PLGA b) mentol c) PVA d) NP-5 e) NP-3 f) NP-9.

\*Termogramas ampliados encontram-se no ANEXO B.

Apesar de que as curvas das nanoesferas (NP-5, NP-3 e NP-9, Figura 5.19) apresentam uma etapa de degradação característica do PLGA, a decomposição térmica das mesmas não iniciaram em uma temperatura mais baixa do que a do polímero puro, contradizendo a literatura (Mainardes et al., 2006). As nanopartículas, a princípio, deveriam estar mais expostas à degradação térmica, devido a sua dimensão nanométrica, que faz com que a área superficial de troca térmica seja maior, em relação ao polímero. Logo, as nanopartículas de PLGA/mentol deveriam apresentar menor estabilidade térmica do que o polímero puro e com isso, degradarem mais facilmente (Mainardes et al., 2006).

## 6. CONCLUSÕES

Através da técnica de emulsão múltipla e evaporação do solvente, foi possível produzir micro e nanoesferas a partir do copolímero biodegradável PLGA com mentol, onde se concluiu que:

- A variável agitação, mostrou ter grande influência no processo de emulsificação, sendo fundamental seu ajuste correto para a otimização da metodologia de preparação das nanopartículas, pois quanto maior a velocidade de agitação menor o tamanho de partícula obtido;
- O tempo de evaporação do solvente revelou que os sistemas, onde o solvente orgânico foi removido em apenas 1h, geraram nanoesferas sem aroma característico aparente, já os sistemas onde o solvente orgânico foi removido lentamente (12h), resultaram em nanoesferas com aroma;
- O espectro de infravermelho das nanoesferas, que apresentaram aroma característico de mentol, mostrou a presença de bandas de absorção características do polímero PLGA e do mentol;
- As micrografias das nanopartículas que apresentaram aroma característico revelaram partículas com formato oval e uma estrutura de partículas agregadas como se fossem contas unidas, atribui-se esta particularidade morfológica ao surfactante utilizado (PVA). O diâmetro médio para as microsferas foi de 1.897 a 5.776 nm;
- Na sua grande maioria as nanoesferas obtidas apresentaram uma faixa de tamanho próxima a 1.000 nm. Neste trabalho, foram preparadas micro e nanoesferas, que são partículas com estrutura matricial, ou seja, cuja massa

inteira é sólida e as moléculas de mentol podem estar adsorvidas na superfície esférica ou incorporadas dentro da partícula, e que apresentaram uma faixa de tamanho entre 217 e 13.103 nm;

- A quantidade de mentol incorporada nas nanoesferas diminui com o aumento da concentração do surfactante PVA e aumenta com o aumento da relação mentol/PLGA utilizado na preparação das nanopartículas;

- A partir da avaliação preliminar da eficiência de incorporação de mentol nas nanoesferas observou-se que dobrando a proporção mentol/PLGA, para as mesmas condições houve um aumento de até 60% na eficiência de incorporação de mentol nas nanoesferas;

- As nanoesferas que apresentaram aroma característico de mentol, tiveram em suas curvas de DSC as temperaturas de fusão (151 °C), cristalização (154 °C) e de transição vítrea (41 °C), em contrapartida as nanoesferas que não apresentaram o aroma de mentol perceptível ao olfato, apresentaram somente temperatura de transição vítrea em 48 °C;

- Para as nanopartículas obtidas em diferentes tempos de liofilização (72h e 24h), observou-se que com um maior tempo de liofilização obteve-se, um sistema de nanopartículas mais heterogêneo, onde as nanopartículas obtidas apresentaram forma esférica de aparência uniforme, porém ora agregadas na forma de cadeias e em outros pontos como esferas soltas. As nanopartículas obtidas em um período menor de liofilização apresentaram um material homogêneo e nanopartículas menores (intervalo de diâmetro médio de 217 a 783 nm) quando comparadas com as obtidas com maior tempo de liofilização (intervalo de diâmetro médio de 476 a 2.424 nm), onde estão presentes micro e nanoesferas;

- A TGA do PLGA puro, mostra que o polímero apresenta estabilidade térmica até 260 °C. A perda de peso, atribuído à decomposição térmica do polímero, ocorre em uma única etapa, entre 267 °C e 402 °C (99,14%). No termograma do mentol,

observou-se apenas uma etapa de degradação térmica definida entre 55 °C e 175 °C, com perda de peso de 99,72%;

- As nanopartículas que não apresentaram aroma perceptível ao olfato, mostraram duas etapas de degradação térmica, sendo que entre 267 °C e 390 °C a perda de massa foi de 91,50%, característico da degradação do polímero. As nanopartículas que apresentaram aroma perceptível ao olfato, apresentaram quatro etapas de degradação térmica, sendo que, a etapa característica da degradação do mentol, ocorre de 65 °C a 156 °C, com perda de massa de 2,443%;

- O termograma das nanopartículas com maior concentração de mentol em sua formulação, mostrou-se semelhante ao das nanopartículas com menor concentração. Contudo, estas apresentaram maior perda de massa relativa ao mentol (3,875%), ou seja, aproximadamente 60% mais mentol foi incorporado a estas nanopartículas em relação às demais.

Por último, a partir da técnica de emulsão múltipla e evaporação do solvente, foi possível produzir micro e nanoesferas de PLGA com mentol incorporado, onde a presença de mentol nas mesmas foi evidenciada através das técnicas de caracterização utilizadas (MEV, IV, DSC, TGA), bem como, pela presença física de aroma característico de mentol perceptível ao olfato. E ainda, foi feita uma avaliação preliminar da eficiência de incorporação do aroma, mostrando-se eficaz, uma vez que, as partículas com maior concentração de mentol em sua formulação demonstraram a partir das técnicas utilizadas (IV, TGA), apresentarem aproximadamente 60% mais mentol incorporado a estas em relação às demais.

## 7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Na continuidade deste trabalho poder-se-ia:

- Estudar outra técnica de obtenção de nanopartículas, como por exemplo, a precipitação em fluido supercrítico, que é uma técnica mais limpa de obtenção de nanopartículas (sem ou com reduzida quantidade de solvente orgânico), comparada com técnicas mais tradicionais, como emulsão múltipla e evaporação do solvente;
- Utilizar uma modelagem matemática visando a otimização do processo utilizado para obtenção das nanopartículas em meio supercrítico;
- Utilizar substâncias aromáticas originárias da biodiversidade brasileira e regional para a preparação destas nanopartículas;
- Avaliar outros métodos para verificação da eficiência de encapsulação;
- Definir uma técnica para avaliar o perfil de liberação do aroma das mesmas;
- Otimizar a taxa de associação e compreender os fatores que influenciam o perfil de liberação dos fármacos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELWAHED, W., DEGOBERT, G. FESSI, H. A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): Formulation and process optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, p. 178-188, 2006.

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL (ABDI). Cartilha sobre Nanotecnologia. Brasília, DF, 2011. 60 p.

AVIRAM, A., RATNER, M. (eds.) Molecular electronics: Science and technology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Vol. 852. New York: New York Academy of Sciences, 1998.

BHARDWAJ, S. B.; SHUKLA, A. J.; COLLINS, C. C. Effect of varying drug loading on particle size distribution and drug release kinetics of verapamil hydrochloride microspheres prepared with cellulose esters. **Journal of Microencapsulation**, v. 12, 1, p. 71-81, 1995.

CANEVAROLO, S.V. **Ciências dos polímeros**. São Paulo: Artliber, 2002. 183 p.

CHANDRA, R., RUSTGI, R. Biodegradable Polymers. **Prog. Polym. Sci.**, v. 23, p. 1273-1335, 1998.

CERINI, A. **Estudo in vitro da liberação de vancomicina encapsulada em blendas de poli (ácido láctico) / poli (óxido de etileno)**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

COSTA, R. M. R. **Preparação de Microesferas de PLGA para Vetorização do Ácido Úsnico e Estudo *In Vitro* e *In Vivo* da Atividade Terapêutica**. Projeto de Tese. Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2002. Disponível em: <[http://www2.ee.ufpe.br/codec/gslc/Projeto\\_Tese\\_Roseane.PDF](http://www2.ee.ufpe.br/codec/gslc/Projeto_Tese_Roseane.PDF)>. Acesso em: 20 novembro 2010.

DURÁN, N., MATTOSO, L. H. C., MORAIS, P. C. **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. 1ªed. São Paulo: Artliber Editora Ltda, 2006, p. 208.

DUTTA, J., HOFMANN. **Nanomateriales**. Swiss Federal Institute of Technology, 2003.

FISHBINE, G. **The inventor's guide to nanotechnology & micromachines**. John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2002.

GONNET, M., LETHUAUT, L., BURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. **Journal of Controlled Release**, v. 146, p. 276-290, 2010.

HAMASAKI, K., KATO, K., WATANABE, T., YOSHIMURA, Y., NAKAZAWA, H., YAMAMOTO, A., MATSUNAGA, A. Determination of *l*-menthol in pharmaceutical products by high performance liquid chromatography with polarized photometric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 16, p. 1275-1280, 1998.

HASIRCI, V., LEWANDROWSKI, K., GRESSER, J. D., WISE, D. L., TRANTOLO, D. J. Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and *in vivo* application. **Journal of Biotech**. v. 86, p. 135-150, 2001.

HAYASHI, T. Biodegradable polymers for biomedical uses. **Progress in Polymer Science**, v. 19, p. 663-702, 1994.

HOLLAND, S. J., TIGHE, B. J., GOULD, P. L. Polymers for biodegradable medical devices, I. Potential of polyesters as controlled macromolecular release systems. **J. Control. Rel.**, v. 4, p. 155-180, 1986.

KHIDR, S. H., NIAZY, E. M., EL-SAYED, Y. M. Development and in vitro evaluation of sustained release meclofenamic acid microspheres. **Journal of Microencapsulation**, , v. 15, 2, p. 153-162, 1998.

KISSEL, T., MARETSCHKEK, S., PACKHÄUSER, C., SCHINIEDERS, J., SEIDEL, N. Microencapsulation techniques for parenteral depot systems and their application in the pharmaceutical industry. In: BENITA, S. **Microencapsulation: methods and industrial applications**. 2 ed., Boca Raton: CRC Press- Taylor & Francis Group, 2006, 741 p. Capitulo 14, p. 98-122.

KISSEL, T., KONEBERG, R. Injectable biodegradable microspheres for vaccine delivery, In: Cohen, C., Bernstein (eds), **Microparticulate Systems For the Delivery of proteins and Vaccines**. Marcel Dekker, 1996, New York, p. 51-88.

LEE, S. C. The nanobiological strategy for construction of nanodevices. In Lee, S. C. and L. Savage (eds.). **Biological molecules in nanotechnology: the convergence of biotechnology, polymer chemistry and materials science**: 1998. Southborough: IBC Press.

LEWIS, D. H. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: Chasin, M., Langer, R. (eds) **Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems**: 1990. Marcel Dekker, New York, p. 1-42.

LI, S. M., VERT, M. Biodegradation of aliphatic polyesters. In: Scott, G., Gilead, D. (eds.), **Degradable Polymers**. **Chapman and Hall**: 1995, Cambridge, p. 43-87.

LIMA, K. M., SILVA C. L., RODRIGUES JÚNIOR J. M. Microesferas Biodegradáveis. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Ano 2, Número 12, Janeiro/Fevereiro, 2000.



LUNT, J., Large-scale Production, Properties and Commercial Applications of Polylactic Acid Polymers, **Polym. Degrad. Stab**, v. 59, p. 145-152, 1998.

MAGENHEIM, B., BENITA, S. Nanoparticle Characterization: A Comprehensive Physicochemical Approach. **STP Pharma Sciences**, v.1, 4, p. 221-241, 1991.

MAINARDES, R. M., GREMIÃO, M. P. D., EVANGELISTA, R. C. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, 4, p. 523-530, out./dez. 2006.

MARTIN, A. N. **Physical pharmacy: Physical chemical principles in the pharmaceutical sciences**. Ed. Lea & Febiger, USA, 1993.

MELO, N. F. S., GRILLO, R., ROSA, A. H., FRACETO, L. F., FILHO, N. L. D., PAULA, E., ARAÚJO, D. R. Desenvolvimento e Caracterização de Nanocápsulas de Poli (L-Lactídeo) Contendo Benzocaína. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 1, p. 65-69, 2010.

MOTTA, A. C., DUEK, E. A. R., Síntese, Caracterização e Degradação “*in vitro*” do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico), **Revista Matéria**, v.11, n. 3, p. 340-350, 2006.

MOURA, L. A., AIELLO, T. B., DUEK, E. A. R. Preparo e Caracterização de Microesferas de PLGA para Liberação Controlada de Doxiciclina para o Tratamento de Periodontites. **COLAOB, The 6th Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials**. Disponível em: <<http://sec.adevento.com.br/tribecaeventos/cdrom/resumos/TC0202-1.pdf>>. Acesso em: 20 novembro 2010.

O'DONNELL, P. B.; MCGINITY, J. W. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, p. 25-42, 1997.

OLIVEIRA, S. S. A. M. **Preparação e caracterização in vitro de micropartículas de heparina fracionada potencialmente aplicáveis ao tratamento da trombose**

**venosa profunda.** Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 2009, p. 82.

PIMENTA, M. A., MELO, C. P. **Nanociência e Nanotecnologia**, 3º Escola de Inverno de Física da Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

PITT, C. G., GRATZI, M. M., KIMMEL, G. L. SURLES, J., SCHINDLER, A. Aliphatic polyesters. 2. The degradation of poly (D, L-lactide, poly( $\alpha$ -caprolactone) and their copolymers *in vivo*. **Biomaterials**, v. 2, p. 215-220, 1981.

PORTE, H., COUARRAZE, G. Microencapsulation processes for the manufacture of systems providing modified release of the active constituent. In: Chulia, D., Delail, M., Purcelot, Y. (eds) **Powder Technology and Pharmaceutical Processes**: 1994, Els. Science. Amsterdam, p. 513-543.

PRASAD RAO, J., GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 887-913, 2011.

RÉ, M. I. **Microencapsulação: Em busca de produtos inteligentes.** *Ciência Hoje* v. 27, 162, p. 24-29, 2000.

RODRIGUES, S. N., MARTINS, I. M., FERNANDES, I. P., GOMES, P. B., MATA, V. G., BARREIRO, M. F., RODRIGUES, A. E. Microencapsulated perfumes for textile application. **Chemical Engineering Journal**, v. 149, p. 463-472, 2009.

SANSUKCHAREARNPON, A., WANICHWECHARUNGRUANG, S., LEEPIPATPAIBOON, N., KERDCHAROEN, T., ARAYACHUKEAT, S. High loading fragrance encapsulation based on a polymer-blend: Preparation and release behavior. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 391, p. 267-273, 2010.

SANTOS, A. B., FERREIRA, V. P., GROSSO, C. R. F. Microcapsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-resina de páprica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, 16, p. 26-30, 2000.

SANTOS, R. M. M., FIALHO, S. L. Nanopartículas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Ano 10, Número 37, Janeiro/Fevereiro, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S. S., FREITAS, L. L. POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, v. 26, 5, p. 726-737, 2003.

SILVERSTAIN, R. M., BASSLER, G.C., MORRIL, T. C., **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 1994, 360 p.

SOARES, A. Q., OLIVEIRA, L. F., RABELO, D., SOUZA, A. R., Polímeros Biodegradáveis: Novas perspectivas para as ciências farmacêuticas, **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 202-205, 2005.

SUAVE, J., D'ALLAGNOLL, E. C., PEZZIN, A. P. T., SILVA, D. A. K., SOLDI, V., MEIER, M. Microencapsulação do pesticida malathion em polímeros biodegradáveis: Caracterização e ensaios de liberação, p. 375-376. **8.º Congresso Brasileiro de Polímeros**, Águas de Lindóia, SP, 2005.

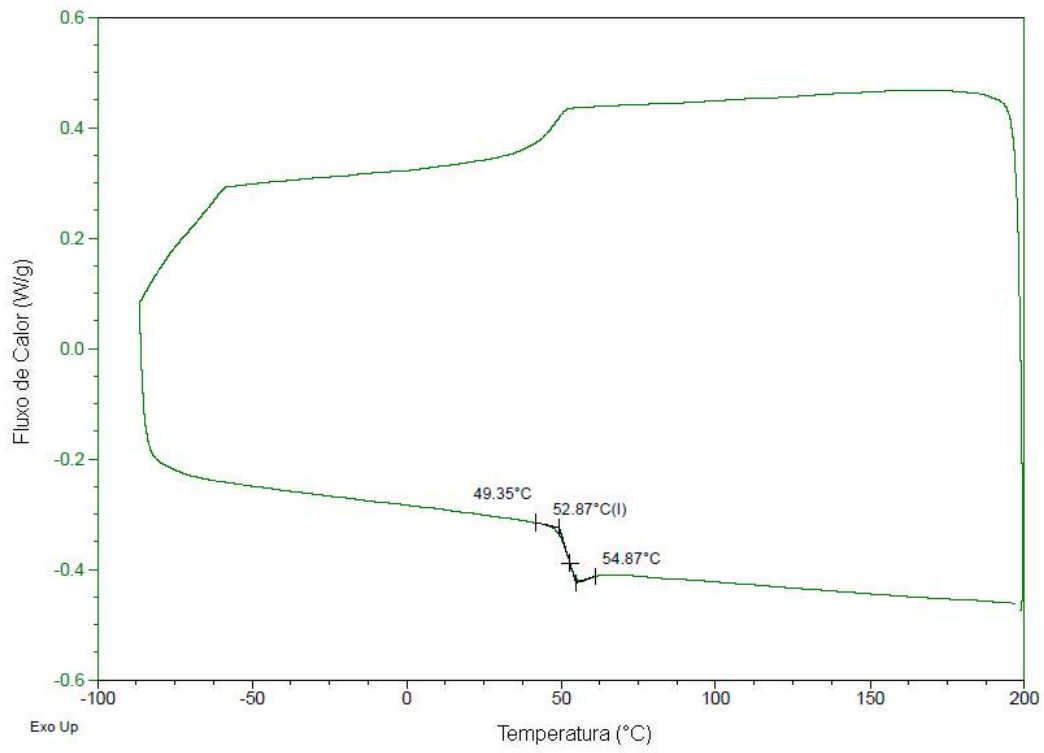
SUAVE, J., DALL'AGNOL, E. C., PEZZIN, A. P. T., SILVA, D. A. K., MEIER, M. M., SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, p. 12-20, dez. 2006.

VILA JATO, J. L. **Tecnologia farmacéutica: Aspectos fundamentais de los sistemas farmacêuticos y operaciones básicas**. V. 1. Ed. Sintesis Editorial, Madrid, Espanha, 1999.

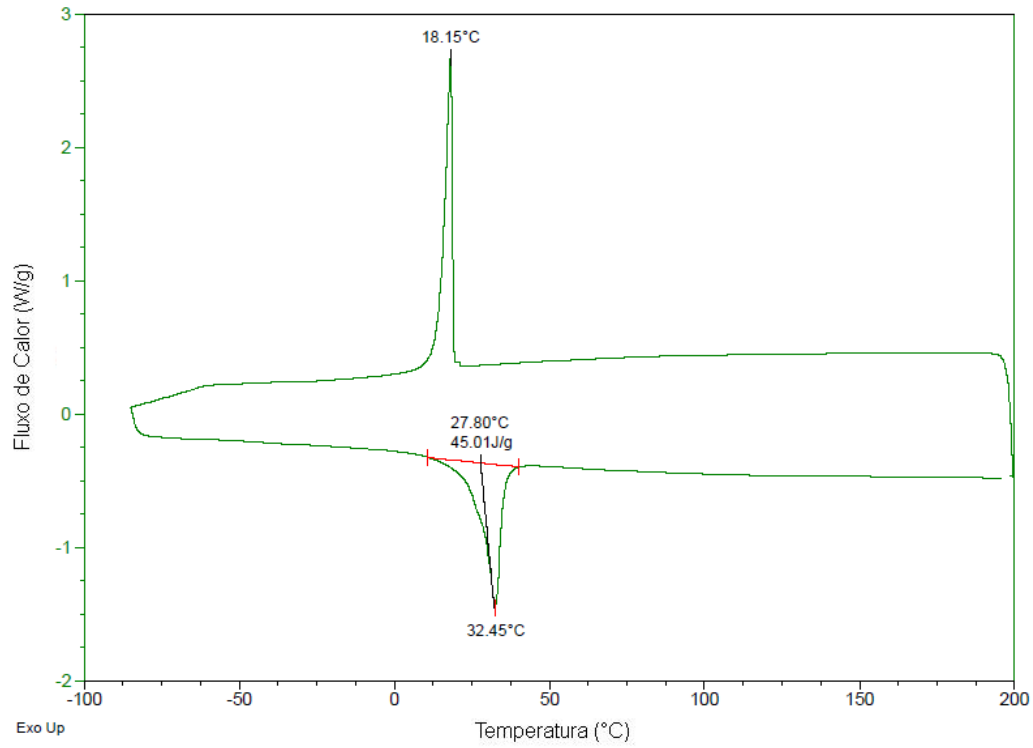
ZANETTI, B. G. **Desenvolvimento de microesferas de carbamazepina visando ao prolongamento da liberação do fármaco**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2001, p.100.

## ANEXOS

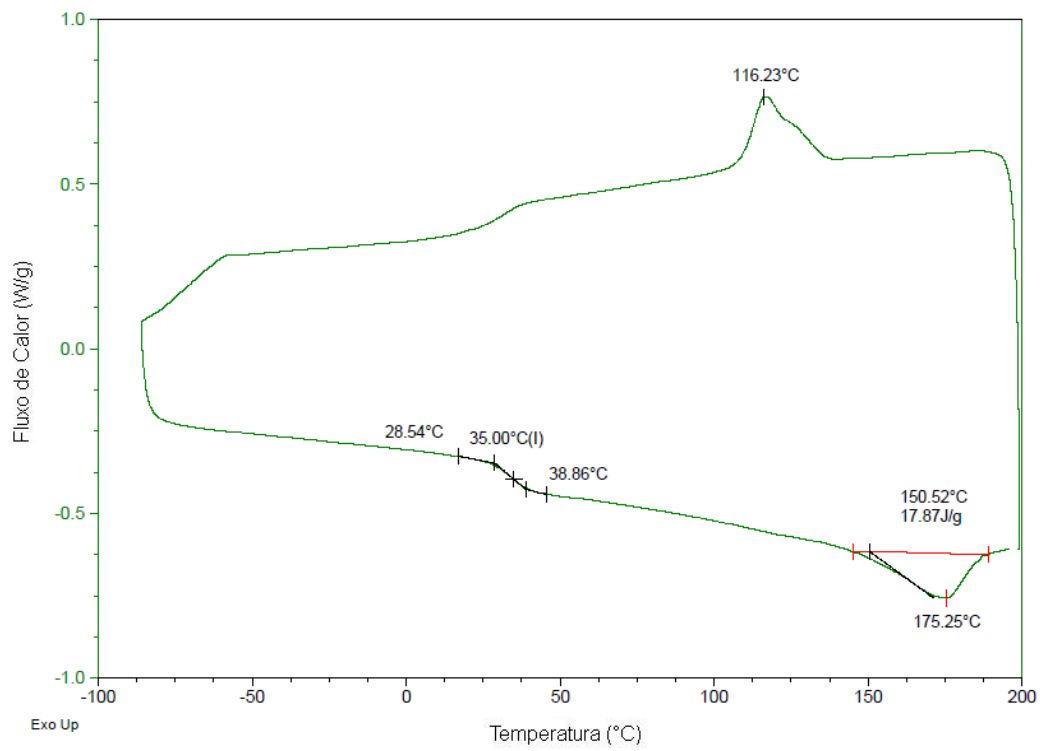
### ANEXO A: Curvas de DSC



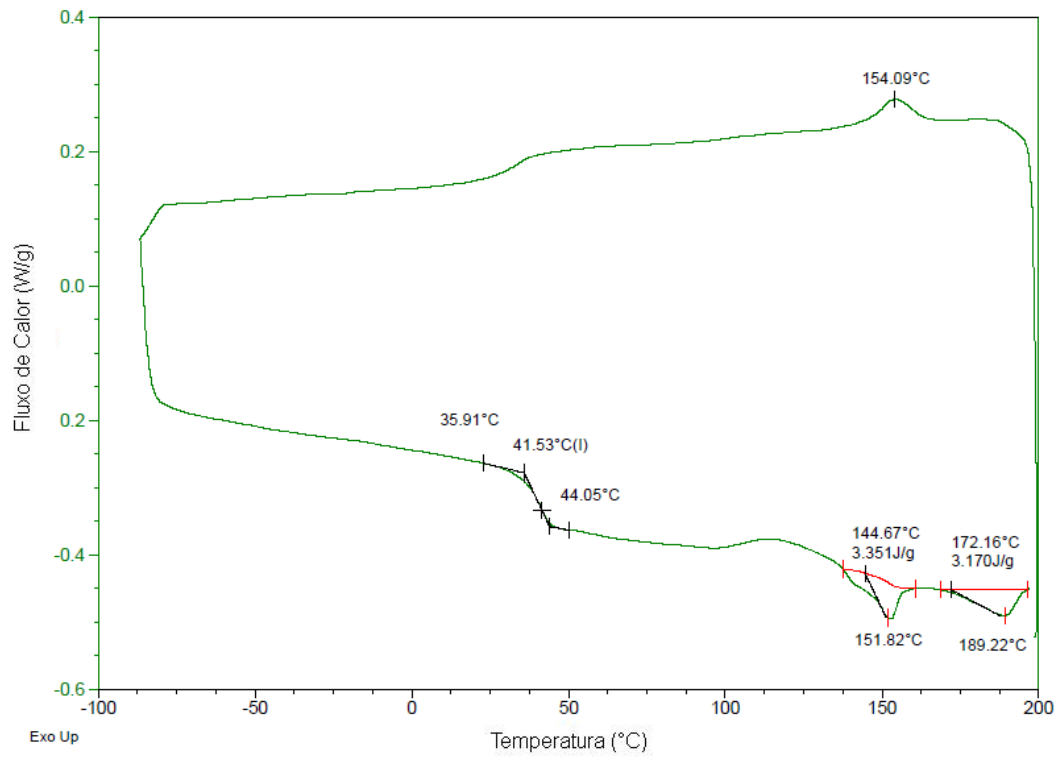
Anexo A1. Curva de DSC do PLGA.



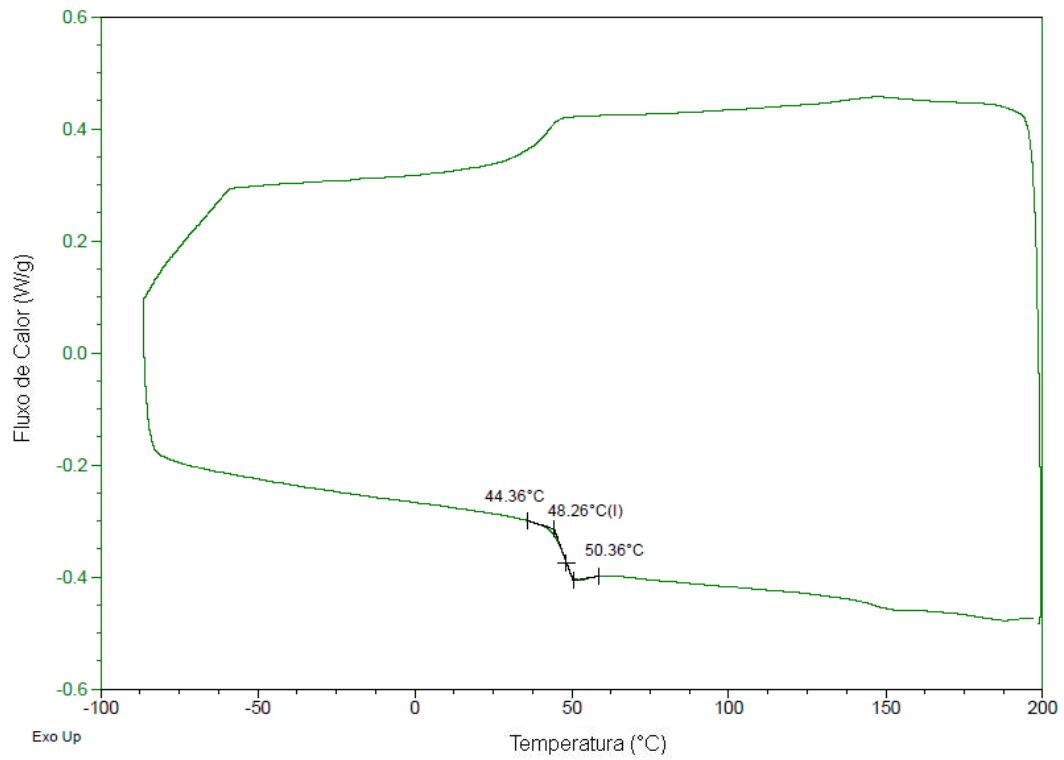
Anexo A2. Curva de DSC do mentol.



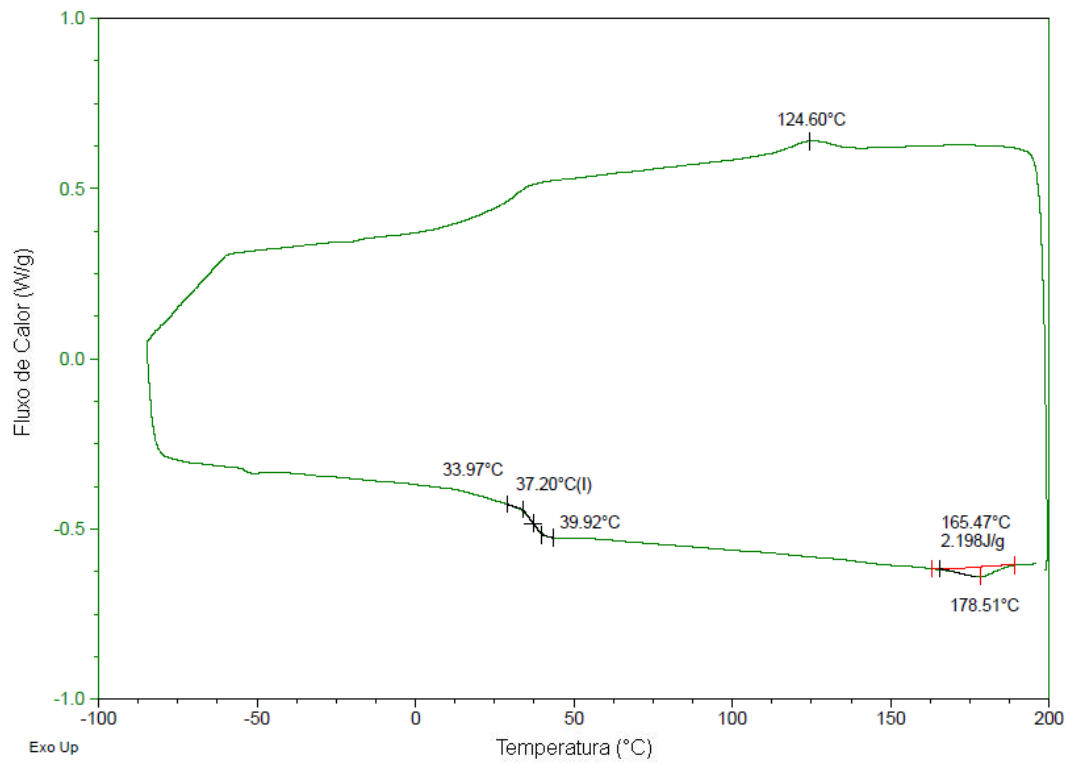
Anexo A3. Curva de DSC do PVA.



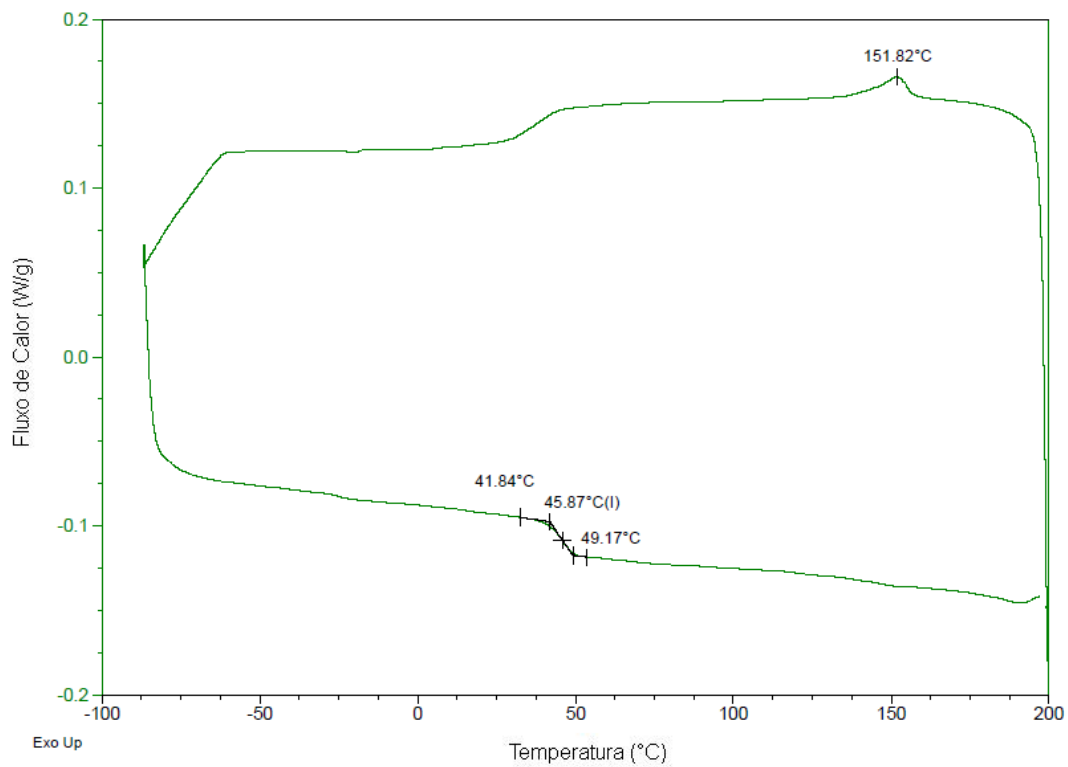
Anexo A4. Curva de DSC das NP-3.



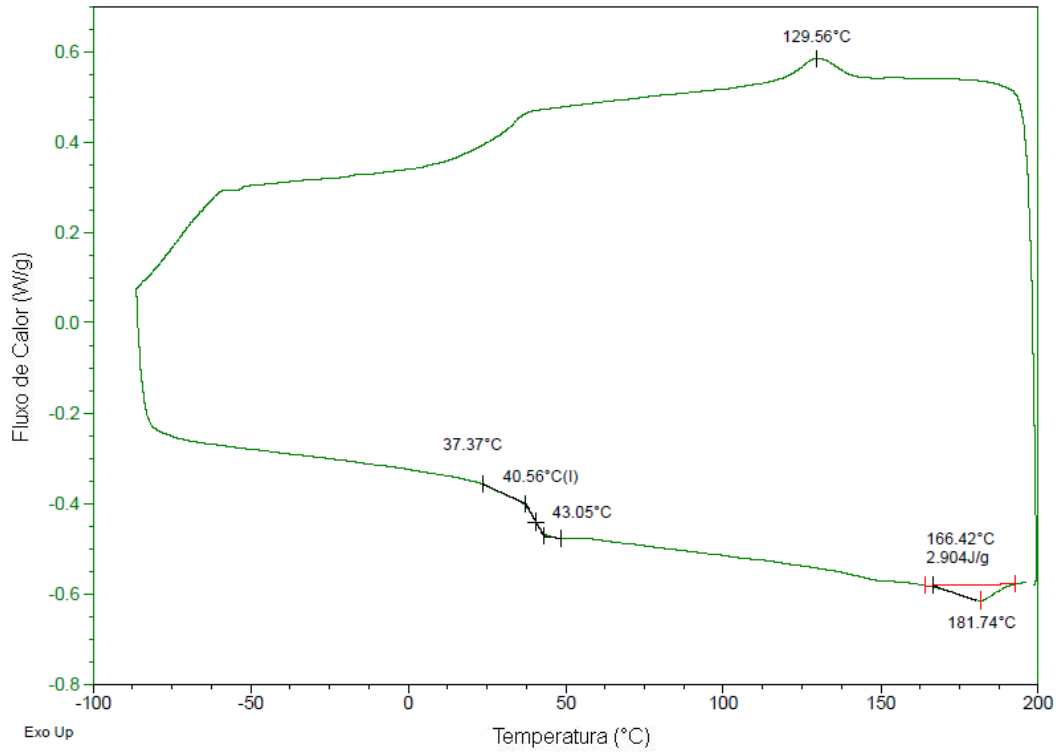
Anexo A5. Curva de DSC das NP-4.



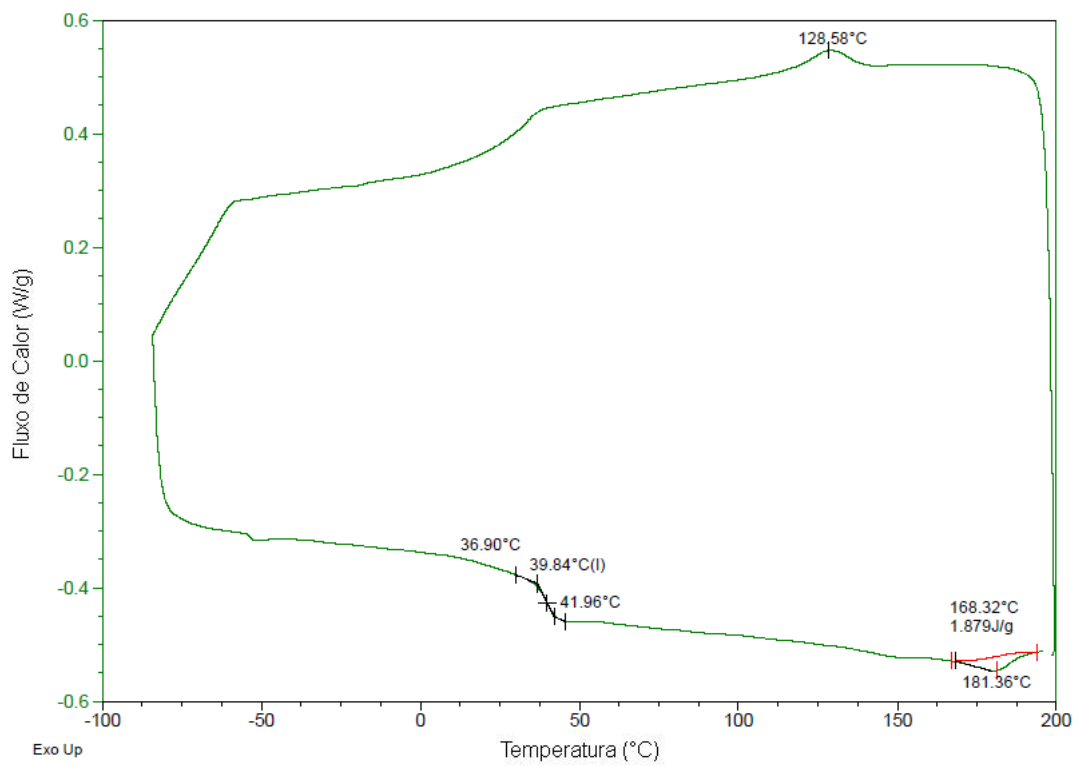
Anexo A6. Curva de DSC das NP-6.



Anexo A7. Curva de DSC das NP-7.



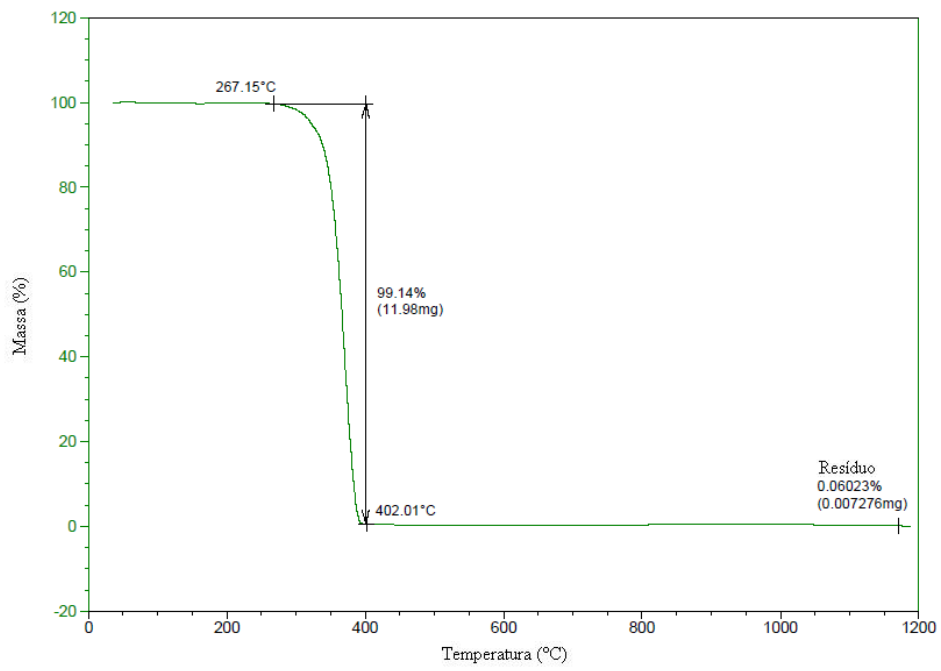
Anexo A8. Curva de DSC das NP-8.



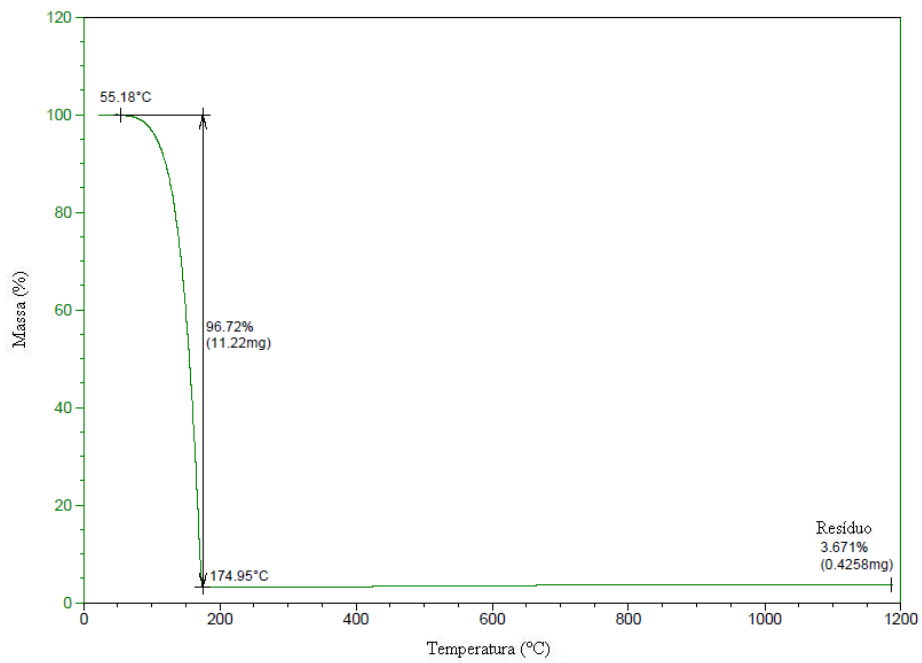
Anexo A9. Curva de DSC das NP-9.



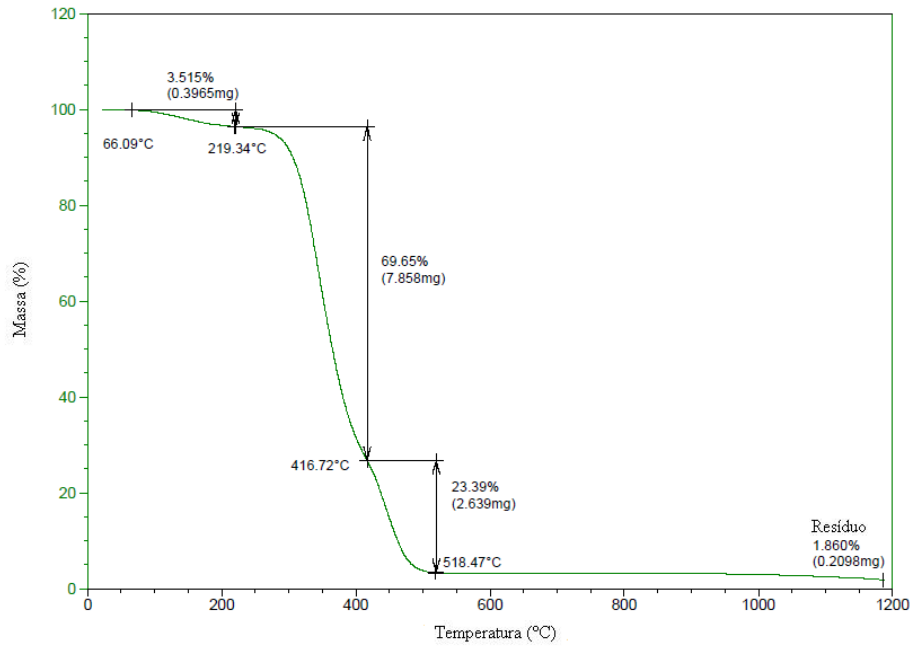
## ANEXO B: Termogramas ampliados



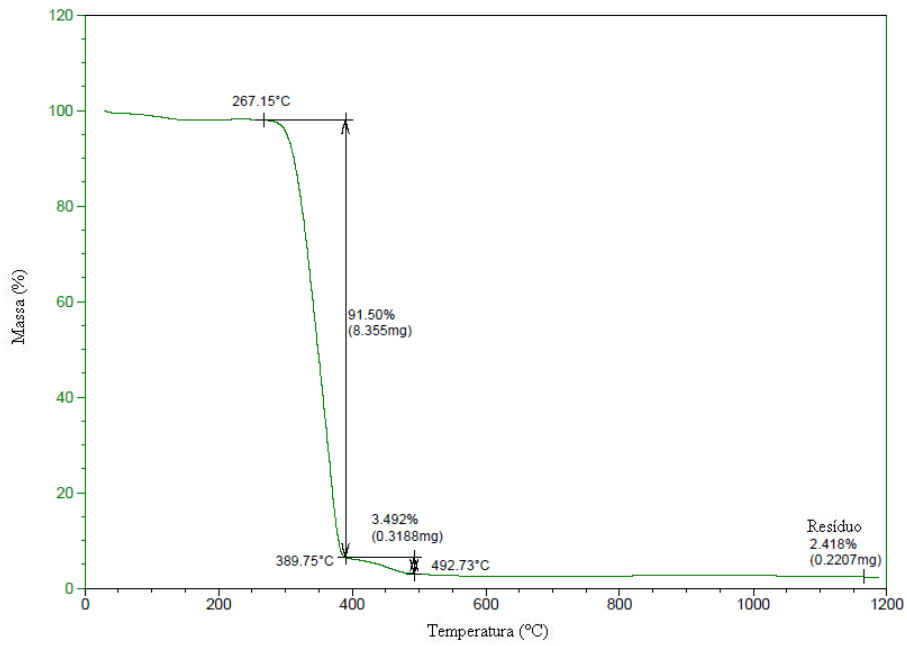
Anexo B1. Termograma do PLGA.



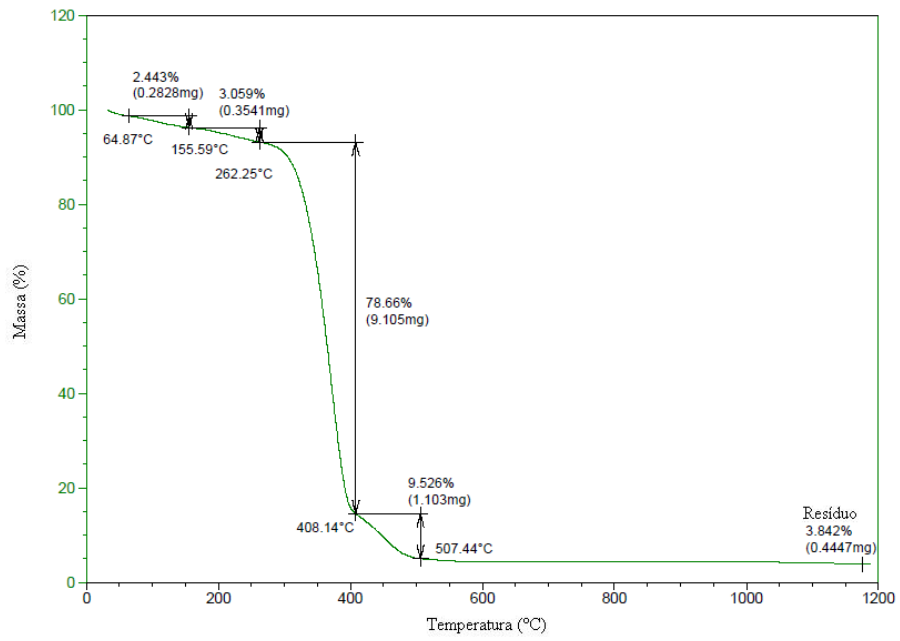
Anexo B2. Termograma do mentol.



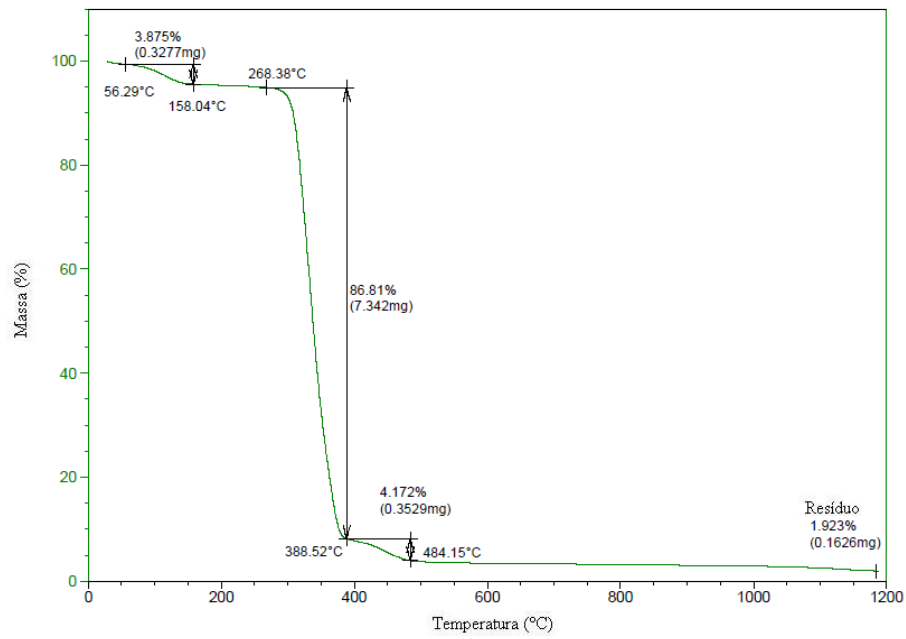
Anexo B3. Termograma do PVA.



Anexo B4. Termograma das nanopartículas NP-5.



Anexo B5. Termograma das nanopartículas NP-3.



Anexo B6. Termograma das nanopartículas NP-9.