

Desenvolvimento de um Método de Nanoprecipitação para o Aprisionamento de Fármaco em Nanopartículas de Poli-ε-Caprolactona

Bruna C. S. Pinto, Vitor L. M. Marmo, Jéssica A. R. Ambrosio, Andreza R. Simioni & Milton B. Junior

Neste trabalho foi averiguado as melhores condições de síntese para o desenvolvimento de nanopartículas (NPs) poliméricas de poli-ε-caprolactona (PCL) por meio do processo de nanoprecipitação para o encapsulamento de compostos fotossensíveis. Para tal objetivo foi avaliado a influência dos parâmetros de síntese, como o efeito do solvente e não solvente, no tamanho do sistema nanoparticulado. As nanopartículas obtidas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por espalhamento dinâmico de luz (DLS) para avaliação da superfície e do formato da formulação desenvolvida. Os resultados mostraram que o tamanho médio das nanopartículas está intimamente relacionado ao tipo de não solvente utilizado conforme análise por MEV e DLS. As nanopartículas obtidas variaram de cerca de 264 a 650 nm de tamanho.

Palavras-chave: *polímero; nanoprecipitação; poli-caprolactona.*

In this manuscript, the best synthesis conditions for the development of nanoparticles through the nanoprecipitation process for the encapsulation of photosensitive compounds were investigated. For this purpose, the influence of synthesis parameters, such as the effect of solvent and non-solvent, on the size of the nanoparticle system was evaluated. The nanoparticles obtained were characterized by scanning electron microscopy and dynamic light scattering to evaluate the surface and shape of the developed formulation. The results showed that the average size of nanoparticles is closely related to the type of non-solvent used as analysed by scanning electron microscopy and size distribution measured by DLS. The obtained nanoparticles ranged from about 264 to 650 nm in size.

Keywords: *polymer; nanoprecipitation; polycaprolactone.*

Introdução

O método de nanoprecipitação também conhecido como método de deslocamento de solvente, descrito inicialmente por Fessi e colaboradores, é utilizado para o desenvolvimento de sistemas nanoparticulados e destaca-se por ser uma técnica de execução rápida e simplista¹.

O processo de formação das nanopartículas ocorre em uma etapa única e de maneira instantânea. Para a aplicação da tecnologia de nanoprecipitação são necessários dois solventes miscíveis. A fase polimérica juntamente com o fármaco compõe a fase chamada de solvente. E uma segunda fase chamada de não solvente é adicionada ao sistema, sendo o polímero e fármaco insolúveis na mesma².

Ocorre o processo de dessolvatação polimérica pela adição do polímero na fase não solvente, onde acontece a dispersão do polímero na solução, o qual precipita e incorpora o fármaco em uma espécie de armadilha³. A produção instantânea do sistema nanoparticulado é descrita pelo efeito Marangoni, que corresponde ao resultado da difusão, turbulência interfacial e transferência de massa de solvente e não solvente, resultando na precipitação do soluto⁴. A nanoprecipitação permite a produção de nanopartículas com distribuição unimodal na faixa de 100 a 300 nm sendo aplicável a uma ampla gama de polímeros, como ácidos poli(d,l-láctico-co-glicólicos), derivados de celulose ou policaprolactonas⁵.

Este método não requer taxas de cisalhamento/agitação estendidas, sonicação ou temperaturas muito altas, e é caracterizada por ausência de interfaces óleo-água⁷.

Sendo assim, o trabalho propõe comparar e investigar o efeito do não solvente no desenvolvimento de uma formulação nanoparticulada de poli-ε-caprolactona. As amostras desenvolvidas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espalhamento dinâmico de luz (DLS) para caracterização em relação ao seu tamanho e formato.

Materiais e Métodos

As nanopartículas de poli-ε-caprolactona (PCL) foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, conforme mencionado em Lino, R.C. e colaboradores (2020)⁷ e com adaptações baseadas em Schubert, S. e colaboradores (2011)⁸ (Figura 1). O polímero PCL, cedido pelo Instituto Granado de Tecnologia da Poliacrilonitrila - IGTPAN, foi previamente pesado e solubilizado em acetona em banho ultrassônico. Os componentes da fase solúvel (fase orgânica – FO) foram solubilizados em agitador magnético de maneira lenta. Em sequência, a FO foi adicionada, de maneira controlada com auxílio de um conta-gotas, sob a fase aquosa (fase insolúvel – FA – água ou metanol) na presença de um estabilizante de fase (Tween 80). A evaporação do solvente ocorreu *overnight*. Após este procedimento, a amostra foi submetida ao processo de centrifugação a 15000 rpm e lavada com água destilada para remoção das impurezas. As proporções utilizadas em cada grupo estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Especificações dos grupos sintetizados. Fonte: O Autor

| Formulação | Não solvente | Solvente |
|------------|--------------|----------|
| 1 | Metanol | Acetona |
| 2 | Água | Acetna |

As análises de MEV foram realizadas em um equipamento EVO-MA10 (Zeiss, Alemanha). A técnica de DLS foi executada em um equipamento Zetasizer (ZetaSizer Nano ZS90, Malvern). O Fluxograma de síntese e testes é representado na Figura 1.

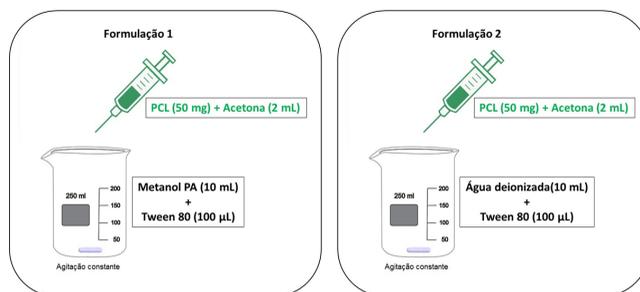
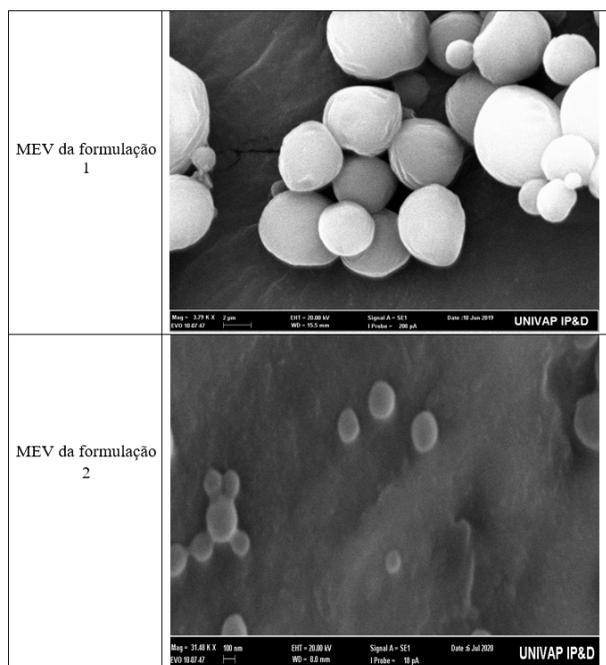


Figura 1. Fluxograma de síntese e caracterização. Fonte: O Autor

Resultados e Discussões

Todos os sistemas poliméricos nanoparticulados de PCL foram desenvolvidos pela técnica de nanoprecipitação. As micrografias obtidas para cada formulação sintetizada estão representadas no Quadro 1.

Quadro 1. Micrografias das nanopartículas de PCL sintetizadas por nanoprecipitação. Fonte: O Autor



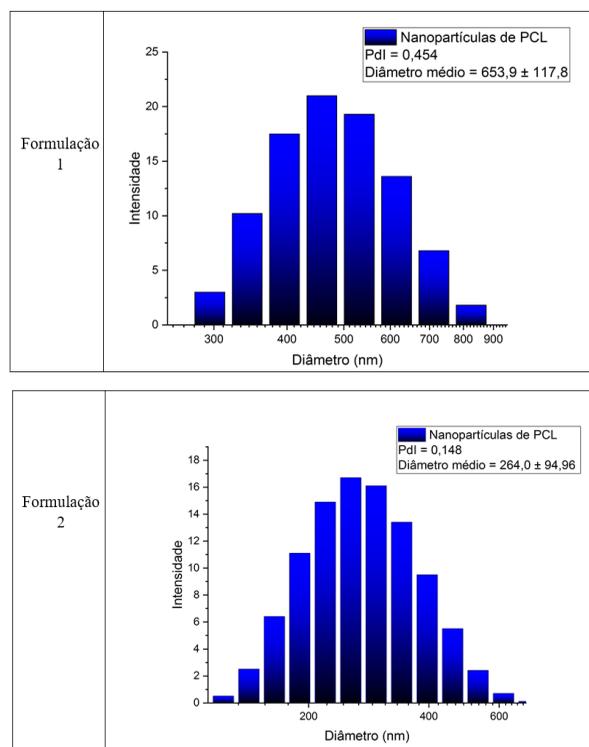
A análise do MEV mostra claramente a formação de nanopartículas uniformes, de formato esférico, com superfície regular e lisa para a formulação 2, sendo essas as características desejáveis para o sistema proposto neste estudo⁹. Já a formulação 1, apresenta partículas com tamanho na escala micrométrica e distribuição heterogênea e não regular, fatores estes que não agregam positivamente para um sistema nanoparticulado.

Uma vez que a razão de volume solvente/não solvente e a concentração de polímero foi mantida constante (ou seja, 0,2 mL e 50 mg, respectivamente), o tamanho das

partículas aumentou gradualmente em quando foi usado álcool (metanol) como não solvente. A este respeito, foi demonstrado anteriormente que a taxa de difusão do solvente no não solvente deve certamente ser considerado, uma vez que quanto maior a taxa de difusão, menor as nanopartículas¹⁰.

O Quadro 2 mostra os resultados das medições por espalhamento dinâmico de luz, que permite a determinação do raio hidrodinâmico da suspensão nanoparticulada.

Quadro 2. Distribuição de tamanho medido por DLS para o sistema nanoparticulado. Fonte: O Autor



A partir das análises do DLS, verificou-se que as nanopartículas desenvolvidas utilizando água como não-solvente possuem um diâmetro hidrodinâmico médio de volume de $264,0 \pm 94,96$ nm. Elas também mostraram uma distribuição de tamanho estreita (Índice de Polidispersidade (PDI) = 0,148).

Já as nanopartículas sintetizadas pelo uso de metanol como não solvente apresentaram tamanho médio de $653,9 \pm 117,8$ nm com PDI igual a 0,454. A água levou a formação de nanopartículas menores que o metanol, conforme medida de DLS (Quadro 2). Esses tamanhos foram obtidos com reprodutibilidade muito alta (menos de 4% de desvio entre triplicatas) e com índices de polidispersidade que mostram suspensões nanoparticuladas homogêneas (no caso da formulação 2).

Muitos fatores podem influenciar o tamanho das NPs poliméricas, como a composição quali-quantitativa das fases utilizadas no processo de síntese, relacionada a variáveis como tensão superficial, viscosidade e hidrofobicidade¹¹.

O valor numérico de PDI varia de 0,0 (para uma amostra perfeitamente uniforme em relação ao tamanho de partícula) a 1,0 (para uma amostra altamente polidispersa com populações de vários tamanhos de partícula). Valores de 0,2 e abaixo são mais comumente considerados aceitáveis na prática para materiais de nanopartículas à base de polímeros. O tamanho de partícula é um atributo muito crítico de nanocarreadores, que afeta a estabilidade, a eficiência de encapsulamento, o perfil de liberação do fármaco, a biodistribuição, e captação celular¹².

As medidas de DLS permitiram analisar o tamanho médio do sistema nanoparticulado proposto e demonstrar a sua constância no intervalo de tempo com $PDI < 0,2$ sendo considerado significativa neste estudo.

Sendo assim, o estudo permitiu estabelecer uma rota de síntese para nanopartículas de PCL com condições otimizadas visando o futuro encapsulamento de compostos fotossensíveis ou outros bioativos.

Conclusão

A nanoprecipitação é um método rápido, simples e econômico para a preparação de nanocápsulas que produz nanopartículas monodispersas com tamanhos na escala nanométrica. Além disso, a nanoprecipitação é escalável e os parâmetros envolvidos na nanoprecipitação podem ser facilmente ajustados para controlar o tamanho das nanopartículas produzidas com resultados reproduzíveis.

Referências

1. FESSI, H.; DEVISSAGUET, J.-P.; PUISIEUX, F.; THIES, C., **1992**. Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanoparticles. US Patent 593 522.
2. SOUTO, E. B.; SEVERINO P., SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. Polímeros, v. 22, p. 101-106, **2012**. <https://www.scielo.br/j/po/a/MQ8KgmbmVvvgxg75jjmx4DLK/?format=pdf&lang=pt>.
3. SALATIN, S.; BARAR, J.; BARZEGAR-JALALI, M.; ADIBKIA, K.; KIAFAR, F.; JELVEHGARI, M. Development of a nanoprecipitation method for the entrapment of a very water soluble drug into Eudragit RL nanoparticles, Res Pharm Sci, v. 12, p. 1-14, **2017**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5333474/pdf/RPS-12-1.pdf>
4. SAHIN, A.; ESENDAGLI, G.; YERLIKAYA, F.; CABAN-TOKTAS, S.; YOYEN-ERMIS, D.; HORZUM, U.; AKTAS, Y.; KHAN, M.; COUVREUR, P.; CAPAN, Y. A small variation in average particle size of PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation leads to considerable change in nanoparticles' characteristics and efficacy of intracellular delivery. Artif. Cells Nanomed. Biotechnol., v. 45, p. 1657-1664, **2017**. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21691401.2016.1276924>.
5. PULINGAM, T.; FOROOZANDEH, P.; CHUAH, J. A.; SUDESH, K. Exploring Various Techniques for the Chemical and Biological Synthesis of Polymeric Nanoparticles, Nanomater, v. 12, p. 576-602, **2022**. <https://www.mdpi.com/2079-4991/12/3/576/htm>.
6. BILATI, U.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E. Nanoprecipitation Versus Emulsion-based Techniques for the Encapsulation of Proteins Into Biodegradable Nanoparticles and Process-related Stability Issues, AAPS PharmSciTech, v. 6, p. 594-604, **2005**. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2750607/pdf/12249_2008_Article_64594.pdf.
7. LINO, R.C.; CARVALHO, S. M.; NORONHA, C. M.; SGANZERLA, W. G.; ROSA, C. G.; NUNES, M. R.; BARRETO, P. L. M. Development and Characterization of Poly-ε-caprolactone Nanocapsules Containing β-carotene Using the Nanoprecipitation Method and Optimized by Response Surface Methodology. Braz. Arch. Biol., v. 63, p. 1-12, **2020**. <https://www.scielo.br/j/babt/a/spfvmkk5nXG7Dw6YxdZKBhd/?lang=en>.
8. SCHUBERT, S.; JR, J.T.D.; SCHUBERT, U.S. Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid). Soft Matter, v.7, p.1581–1588, **2011**. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2011/sm/c0sm00862a>.

9. BARRERAS-URBINA, C. G.; RAMÍREZ-WONG, B.; LÓPEZ-AHUMADA, G. A.; BURRUEL-IBARRA, S. E.; MARTÍNEZ-CRUZ, O.; TAPIA-HERNÁNDEZ, J. A.; FÉLIX, F. R. Nano- and Micro-Particles by Nanoprecipitation: Possible Application in the Food and Agricultural Industries, *Int J Food Prop*, v. 19, p. 1912-1923, **2016**. <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10942912.2015.1089279>.
10. MOURDIKOU DIS, S.; PALLARES, R. M.; THANH, N. T. K. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties, *Nanoscale*, v. 10, p. 12871-12934, **2018**. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/nr/c8nr02278j>
11. ZIELINSKA, A.; CARREIRÓ, F.; OLIVEIRA, A. M.; NEVES, A.; PIRES, B.; VENKATESH, D.; DURAZZO, A.; LUCARINI, M.; EDER, P.; SILVA, A. M.; SANTINI, A.; SOUTO, E. B. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology, *Molecules*, v. 25, p. 3731-3750. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32824172/>.
12. DANA EI, M.; DEHGANKHOLD, M.; ATAEI, S.; DAVARANI, F. H.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems, *Pharmaceuticals*, v. 10, p. 57-73. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6027495/pdf/pharmaceutics-10-00057.pdf>

**Bruna C. S. Pinto, Vitor
L. M. Marmo, Jéssica A.
R. Ambrosio, Andreza R.
Simioni* & Milton B. Junior**

Laboratório de Sistemas Micro e Nanoparticulados, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Av. Shishima Hifumi, nº2911, CEP 12244000, Brasil.

E-mail: simioni@univap.br