

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE TECNOLOGIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CÂMPUS CAMPO MOURÃO - PARANÁ

CAMILA LAZARIN

**CORRELAÇÃO DA VISCOSIDADE DA FASE ORGÂNICA COM O
TAMANHO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(L-ÁCIDO LÁTICO)
PRODUZIDAS POR MINIEMULSIFICAÇÃO/EVAPORAÇÃO DO
SOLVENTE**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2013

CAMILA LAZARIN

**CORRELAÇÃO DA VISCOSIDADE DA FASE ORGÂNICA COM O
TAMANHO DE NANOPARTÍCULAS DE POLI(L-ÁCIDO LÁCTICO)
PRODUZIDAS POR MINIEMULSIFICAÇÃO/EVAPORAÇÃO DO
SOLVENTE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Engenharia de Alimentos da Coordenação dos Cursos de Tecnologia e Engenharia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, *Campus* Campo Mourão, como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Vitória Leimann.

CAMPOMOURÃO

2013



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Campo Mourão

Coordenação dos Cursos de Tecnologia e Engenharia de Alimentos
Engenharia de Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO

CORRELAÇÃO DA VISCOSIDADE DA FASE ORGÂNICA COM O TAMANHO DE
NANOPARTÍCULAS DE POLI(L-ÁCIDO LÁTICO) PRODUZIDAS POR
MINIEMULSIFICAÇÃO/EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE

por

CAMILA LAZARIN

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 26 de setembro de 2013 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Fernanda Vitória Leimann
Orientador

Prof. Dr. Bogdan Demczuk Junior
Membro titular

Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves
Membro titular

Nota: O documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se na coordenação do curso de Engenharia de Alimentos da UTFPR *Câmpus* Campo Mourão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela fé e as graças Dele recebidas.

Agradeço plenamente aos meus pais Noêmia Engelmann Lazarin e Idair Lazarin que são à base da minha vida, por tudo que fizeram e fazem por mim todos os dias, por estarem sempre ao meu lado me aconselhando, apoiando, dando forças e consolando nos momentos de dificuldades. Não esquecendo o meu irmão Idair Lazarin Junior que sempre se fez presente na minha vida sendo um irmão maravilhoso! Agradeço aos meus familiares todos pela força e pela confiança em mim, principalmente aos meus padrinhos Geni e Dilceu Viletti por toda ajuda, pouso, almoços e caronas nesses 5 anos, vocês foram fundamentais. Ao meu namorado Rafael Augusto Bora por ter sido compreensivo e paciente nos momentos que deveriam ter sido de namoro e diversão, e os ocupei me dedicando ao estudo e conclusão do curso, bem como, por todo apoio para continuar nos momentos que fraquejei. As minhas grandes amigas Ligiane Inhoato, Mônica Ceolim e Priscila Thelen que tive a oportunidade de conhecer durante o curso e que se tornaram fundamentais nessa jornada acadêmica.

Reverencio a Professora Dra. Fernanda Vitória Leimann pela sua orientação e dedicação neste trabalho, por todo seu conhecimento, seu tempo, sua motivação e também por todo carinho, pelos vários conselhos e pelo apoio no decorrer deste curso. Obrigada por ser essa excelente pessoa, professora e orientadora.

Agradeço a Rosana Silva-Buzanello, pelo seu ótimo trabalho que nos serviu para comparação, de base e inspiração.

Agradeço de todo meu coração também ao Prof. Dr. Odinei Hess Gonçalves por toda ajuda no decorrer deste trabalho, pelo amplo conhecimento e pelo apoio. Ao Prof. Dr. Evandro Bona pela ajuda com o delineamento e planejamento experimental, por todo o seu conhecimento do programa utilizado e pela sua boa vontade em ajudar. Por meio destes, me reporto a toda a coordenação dos cursos de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) –

Campus Campo Mourão, pelo apoio.

Agradeço aos professores da banca examinadora, pela atenção e contribuição dedicadas a este estudo. Muito Obrigada!

“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.”

Clarice Lispector

RESUMO

O poli(L-ácido lático) é um poliéster biodegradável, com características hidrofóbicas e instável em condições úmidas. É produzido a partir de recursos renováveis e têm recebido uma grande atenção nas pesquisas de polímeros biodegradáveis alternativos, pois foi aprovado pelo FoodandDrugAdministration (FDA) para a utilização como sistemas de liberação de fármacos. O tamanho médio final e a distribuição de tamanhos das nanopartículas são de grande importância em aplicações como a encapsulação de compostos, tanto para fins de proteção como de liberação modificada. A dependência do tamanho das nanopartículas com parâmetros experimentais vem sendo alvo de estudos, porém, apesar de conhecida a influência da viscosidade da fase orgânica no diâmetro final das nanopartículas, não existe estudos aprofundados desta questão. A viscosidade das fases orgânicas formadoras das nanopartículas foi avaliada no presente trabalho através de planejamento experimental e foi comparado a resultados da literatura mostrando que é possível correlacionar os efeitos significativos para as três respostas (viscosidade, diâmetro médio (Dz) e índice de poli dispersão (IPD)). Os principais fatores que afetam a viscosidade e que também afetam Dz são concentração de PLLA e de lecitina. Para viscosidade e PDI o fator mais representativo em comum foi a concentração de diclorometano.

Palavras-chave: Poli(L-ácido lático), viscosidade da fase orgânica, nanopartículas, miniemulsificação/evaporação do solvente.

ABSTRACT

The poly (L- lactic acid) is a biodegradable polyester with hydrophobic characteristics and unstable in humid conditions. It is produced from renewable resources and have received great attention in the research of alternative biodegradable polymers because it was approved by the Food and Drug Administration (FDA) for use as drug delivery systems. The final average size and size distribution of the nanoparticles are of great importance in applications such as encapsulation of compounds, both for protection purposes as modified release. The dependence of nanoparticle size with experimental parameters has been the subject of studies, however, although known to influence the viscosity of the organic phase in the final diameter of the nanoparticles, there is no in-depth studies of this issue. The viscosity of the organic phases forming the nanoparticles was evaluated in this work through experimental design and results were compared to the literature showing that it is possible to correlate the significant effects for all three answers (viscosity, average diameter (Dz) and dispersion index of poly (IPD)). The main factors affecting the viscosity and Dz are also affect concentration of PLLA and lecithin. For viscosity and PDI factor more representatives in common was the concentration of dichloromethane.

Keywords: Poly (L- lactic acid), the viscosity of the organic phase, nanoparticles, miniemulsificação / solvent evaporation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente.....	14
Figura 2 -	Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a viscosidade das nanopartículas.....	24
Figura 3 -	Gráfico dos valores observados <i>versus</i> valores preditos.....	25
Figura 4 -	Gráfico normal dos resíduos.....	26
Figura 5 -	Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para o diâmetro médio das nanopartículas.....	26
Figura 6 -	Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para os valores de índice de polidispersão (IPD) de tamanhos das nanopartículas.....	27
Figura 7 -	Superfície de resposta para variação da concentração de lecitina <i>versus</i> a concentração de PLLA.....	28
Figura 8 -	Superfície de resposta para a variação da concentração de PLA <i>versus</i> fração de diclorometano ($\text{mL}_{\text{CH}_2\text{Cl}_2}/\text{mL}_{(\text{CH}_2\text{Cl}_2+\text{CHCl}_3)}$).....	29
Figura 9 -	Superfície de resposta para a variação da concentração de lecitina <i>versus</i> fração de diclorometano ($\text{mL}_{\text{CH}_2\text{Cl}_2}/\text{mL}_{(\text{CH}_2\text{Cl}_2+\text{CHCl}_3)}$).....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Níveis e fatores das variáveis do planejamento experimental.....	20
Tabela 2 –	Matriz para o planejamento experimental com valores codificados.....	20
Tabela 3 –	Análise de variância para a viscosidade da fase orgânica.....	21
Tabela 4 –	Respostas do planejamento experimental: viscosidade da fase orgânica para os fatores X1, X2 e X3 a 161 rpm.....	23
Tabela 5 –	Efeitos estimados e valor de p para a viscosidade da fase orgânica.....	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 POLI(L-ÁCIDO LÁTICO)	12
2.2 TÉCNICAS DE OBTENÇÃO DE NANOPARTICULAS POLIMÉRICAS.....	12
2.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	15
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 OBJETIVO GERAL.....	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO.....	18
4.2 REAGENTES UTILIZADOS.....	18
4.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	18
4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	19
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
6. CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

O uso de nanopartículas poliméricas como carreadores de fármaco tem sido intensivamente investigado por aumentar a biodisponibilidade do fármaco e por permitir novas rotas de administração como, por exemplo, aplicações orais ou transdérmicas (MAINLENDER e LANDFESTER, 2009).

Dentre as técnicas de produção de partículas submicrométricas para liberação controlada destacam-se a polimerização em miniemulsão e a técnica de emulsificação/evaporação do solvente. Também é relatada uma técnica que combina as características das duas anteriores, chamada de miniemulsificação/evaporação.

A cinética de liberação dos compostos encapsulados é fortemente afetada pelo tamanho e distribuição de tamanho das nanopartículas (Poletto et al., 2008). Por conseguinte, o controle de tais características durante a produção de nanopartículas é muito importante. Parâmetros tais como a massa molar do polímero e a concentração do mesmo na formulação podem afetar o tamanho, a distribuição de tamanho e morfologia das nanopartículas. Alguns destes parâmetros já foram investigados por outros autores como Musyanovych et al., (2008) e Manea et al., (2007). De forma geral eles concluíram que a viscosidade das nanogotas durante a dispersão da fase orgânica influencia o mecanismo de quebração, levando a um aumento do tamanho das gotículas e partículas. Silva-Buzanello (2012) utilizou um planejamento experimental onde foi avaliada a influência dos seguintes parâmetros no diâmetro e distribuição de tamanhos das nanopartículas: concentração de polímero, proporção entre fase orgânica e fase aquosa (hold-up), concentração de surfatante e tipo de solvente. Porém em todos os casos abordados acima não foi determinada experimentalmente a viscosidade da fase orgânica. Pode-se notar que mesmo sabendo que esses parâmetros afetam a viscosidade a mesma não foi avaliada nos trabalhos. Neste trabalho será abordado este ponto que merece atenção visando complementar os dados já apresentados na literatura.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 POLI(L-ÁCIDO LÁTICO)

O poli(L-ácido láctico) (PLLA) é um poliéster relativamente hidrofóbico, biodegradável e instável em condições úmidas. Quando degradado gera subprodutos atóxicos (ácido láctico, ácido glicólico, dióxido de carbono e água), é produzido a partir de recursos renováveis e têm recebido uma grande atenção nas pesquisas de polímeros biodegradáveis alternativos, pois obteve aprovação pelo Food and Drug Administration (FDA) para a utilização como sistemas de liberação de fármacos (SOARES et al., 2005).

2.2 TÉCNICAS DE OBTENÇÃO DE NANOPARTICULAS POLIMÉRICAS

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para obter nanopartículas poliméricas. Dentre elas encontram-se as técnicas em que o polímero é sintetizado, polimerizações em miniemulsão e em emulsão, além das técnicas em onde se utiliza o polímero pré-formado, como a nanoprecipitação, emulsificação/evaporação e a miniemulsificação /evaporação (LEIMANN et al., 2013)

Na técnica de polimerização em miniemulsão um monômero, que compõe a fase orgânica (estireno, acetato de vinila, metacrilato de metila, etc.) é disperso em água com o uso de um equipamento de dispersão de alta eficiência (sonificador, ultraturrax, etc.). A fase orgânica é estabilizada na forma de nanogotas por surfatantes, que são solubilizados previamente na fase aquosa (lauril sulfato de sódio, Tween 80, etc.) ou na fase orgânica (lecitina, span 80, etc). A polimerização se inicia com o uso de iniciadores como o AIBN (2,2'azo(bis-isobutironitrila) ou o persulfato de potássio e as nanopartículas formam-se a partir da polimerização das nanogotas. Além do surfatante, um "co-estabilizador" deve ser utilizado para evitar a degradação difusional das gotas (LANDFESTER et al., 1999; ASUA, 2002). Dessa forma o tamanho final

das partículas pode ser descrito pelo balanceamento das forças de quebraamento e coalescência das nanogotas durante o processo de obtenção (dispersão), levando em conta a degradação difusional das gotas de menores tamanhos.

Durante a dispersão, o sonificador produz ondas cuja propagação causa oscilação das moléculas em ciclos de compressão e descompressão. A compressão faz com que diminua a distância média entre as moléculas e então a descompressão aumenta a distância, resultando em pressão negativa e causando a formação de vórtices ou bolhas de cavitação. Durante o próximo ciclo de compressão ocorre o colapso total das bolhas de cavitação, produzindo ondas de choque que quebram as gotas de fase orgânica que estão nas suas vizinhanças. O quebraamento e a coalescência são afetados diretamente pela viscosidade da fase orgânica (ASUA, 2002).

Nanopartículas poliméricas de PLLA podem ser obtidas utilizando a técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente. A Figura 1 ilustra a técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente para a encapsulação de um composto hidrofóbico. Essa técnica é dividida em três etapas. Na primeira etapa, o polímero pré-formado é dissolvido, juntamente com os demais componentes (materiais a serem encapsulados previamente solubilizados no solvente). Um surfactante é utilizado para estabilizar as nanogotas que serão geradas durante a dispersão, este é solubilizado previamente na fase aquosa (lauril sulfato de sódio, Tween 80, etc.) ou na fase orgânica (lecitina, span 80, etc). Em seguida, a fase orgânica é dispersa na fase aquosa, formando gotas nanométricas estáveis com o uso de um equipamento de dispersão de alta eficiência, como o sonificador. Numa terceira etapa, o solvente é removido por extração ou evaporação. Com a diminuição da quantidade de solvente nas gotas durante sua remoção, as nanopartículas são formadas em função da diminuição da solubilidade do polímero no solvente e sua conseqüente precipitação (PICH et al., 2006; MUSYANOVYCH et al., 2008; REIS et al., 2006).

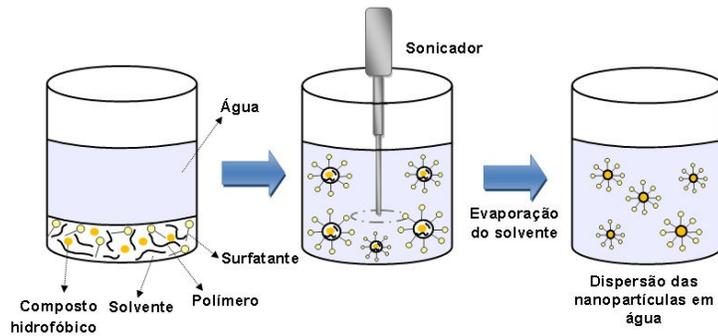


Figura 1 – Representação esquemática da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente. Fonte: Adaptado de Musyanovych et al. (2008).

O mecanismo de quebramento e coalescência das nanogotas durante a fase de dispersão no caso da miniemulsificação/evaporação é o mesmo da polimerização em miniemulsão. A viscosidade da fase dispersa é um fator importante que afeta a dispersão (VANDERHOFF et al., 1978; MUSYANOVYCH et al., 2008; LEIMANN et al., 2013, *in press*) pois diminui a ocorrência de quebra das nanogotas durante a sonificação. Para um determinado polímero e solvente, a viscosidade da fase dispersa é função principalmente da quantidade de polímero utilizado. (ABISMAÏL et al., 1999)

O tamanho médio final e a distribuição de tamanhos das nanopartículas são de grande importância em aplicações como a encapsulação de compostos, tanto para fins de proteção como de liberação modificada, e a influência de parâmetros experimentais sobre essas propriedades deve ser bem conhecida. Leimann et al., (2013) demonstraram que a degradação por hidrólise de partículas de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) é fortemente influenciada pelo seu tamanho final devido à variação da área superficial total das mesmas em contato com a fase aquosa.

O tamanho das nanopartículas é influenciado pela energia despendida na dispersão das nanogotas, pelas concentrações e propriedades do polímero e do surfatante, pelo solvente utilizado e pela fração de fase dispersa. Além disso, essas variáveis se relacionam de forma complexa, o que torna necessária a utilização de planejamentos experimentais que levem em conta a interação entre elas.

2.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfícies de respostas, é uma ferramenta que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve as técnicas de tentativa e erro. Experimentos delineados em esquemas fatoriais são aqueles que envolvem combinações entre os níveis de dois ou mais variáveis independentes, chamadas de fatores. Planejamentos fatoriais apresentam uma vantagem incontestável por fornecer o maior número de graus de liberdade para o resíduo (CUNICO et al., 2008; RODRIGUES; IEMA, 2009).

Prakobvaitayakit e Nimmannit (2003) utilizaram um delineamento experimental em um esquema fatorial 2^3 e metodologia da superfície de resposta para avaliar a produção de nanopartículas de poli(ácido lático)-co-glicólico (PLGA) contendo itraconazol e benzoato de benzila pela técnica de deposição interfacial e deslocamento do solvente. A concentração de PLGA, benzoato de benzila e itraconazol foram as variáveis selecionadas e apresentaram efeito significativo sobre o diâmetro médio das partículas e a eficiência de encapsulação.

Kermabon-Avon et al., (2009) produziram nanopartículas de poli(metacrilato de metila) (PMMA) pela técnica de polimerização em miniemulsão utilizando hexadecano como co-estabilizador e dodecil sulfato de sódio como surfatante através de um delineamento experimental em dois esquemas fatoriais. As variáveis estudadas em um dos esquemas fatoriais foram a concentração de iniciador, concentração co-estabilizador e concentração de surfatante, em um planejamento fatorial completo 2^3 . No segundo planejamento fatorial completo 2^2 , os autores avaliaram as variáveis tempo de sonicação e amplitude do equipamento. Com os resultados obtidos foi possível estabelecer dois modelos matemáticos que demonstraram a capacidade de prever o diâmetro das partículas, a partir das condições de síntese, com uma precisão de 1-2 nm em um intervalo de 75 a 180 nm.

Conclui-se que a dependência do tamanho das nanopartículas com parâmetros experimentais vem sendo alvo de estudos, porém, apesar de

conhecida a influência da viscosidade da fase orgânica no diâmetro final das nanopartículas não existe estudos aprofundados desta questão. Pretende-se então determinar experimentalmente a variação da viscosidade em função dos parâmetros experimentais de produção das nanopartículas por miniemulsificação/evaporação do solvente.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Correlacionar a viscosidade das soluções (fases orgânicas) utilizadas na preparação das nanopartículas de PLLA com o diâmetro final das nanopartículas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a viscosidade das fases orgânicas em função da

- Concentração de PLLA;
- Concentração de lecitina (surfactante);
- Fração volumétrica de diclorometano ($\text{mL}_{\text{CH}_2\text{Cl}_2} / \text{mL}_{(\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{CHCl}_3)}$).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO

O presente estudo foi desenvolvido nos laboratórios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Campo Mourão.

4.2 REAGENTES UTILIZADOS

O L-lactídeo (Purac) e o octanoato de estanho (Sigma-Aldrich) foram utilizados para síntese do poli(L-ácido láctico) (PLLA). Clorofórmio (Vetec, 99% de pureza) e metanol (PróQuímicos, 99,5% de pureza) foram utilizados na purificação do PLLA após a síntese. Clorofórmio e diclorometano (Vetec, 99,5% de pureza) foram utilizados como solvente, lecitina de soja (Alfa Aesar) como surfatante e água destilada como meio contínuo na obtenção das nanopartículas. Todos os reagentes foram disponibilizados pela UTFPR-CM.

4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Síntese do PLLA: Poli(L-ácido láctico) foi sintetizado através da polimerização por abertura de anel de L-lactídeo utilizando octanoato de estanho como catalisador. L-lactídeo e catalisador são cuidadosamente adicionados em um vaso reacional e purgados com nitrogênio gasoso durante 40 minutos. Após a aplicação de vácuo (-400 mmHg) o vaso é selado e

mantido em um banho de óleo a 120°C. Após 24 horas, este é imerso em um banho de gelo para terminar a reação.

Purificação: Traços de L-lactídeo não reagido são removidos por dissolução do material em clorofórmio e precipitação em metanol a 10°C. O PLLA precipitado é filtrado e seco em estufa de convecção forçada a 70 °C até que não haja mais variação de massa. O polímero então é armazenado em embalagem selado á vácuo a -10°C.

Determinação da massa molar: A massa molar é obtida por meio do Viscosímetro capilar Ubbelohde na temperatura de 25°C com soluções de PLLA dissolvidas em clorofórmio. As concentrações das soluções foram utilizadas de acordo com Silva-Buzanello (2013).

Determinação da viscosidade: As viscosidades das fases orgânicas serão obtidas com o uso de um Viscosímetro Brookfield LVDV-III Ultra.

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Um planejamento fatorial completo 2³ foi aplicado a fim de avaliar os efeitos das seguintes variáveis: concentração de PLLA, concentração de lecitina e razão de diclorometano e clorofórmio na mistura de solvente orgânico. Os níveis reais das variáveis estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Níveis e fatores das variáveis do planejamento experimental.

Fatores		Níveis reais e codificados		
		-1	0	1
X1	Concentração PLLA (g/g _{solvente})	0,018	0,026	0,034
X2	Concentração Lecitina (g/g fase orgânica)	0,020	0,025	0,030
X3	Fração volumétrica CH ₂ Cl ₂ (ml _{CH₂Cl₂} /ml _{CH₂Cl₂+CHCl₃})	0,250	0,500	0,750

Foram realizadas 10 análises de viscosidade em diferentes taxas de cisalhamento e todos foram ajustados em um modelo e o melhor modelo foi escolhido como representativo que foi a 161 RPM.

A Tabela 2 apresenta a matriz de ensaios codificada.

Tabela 2 – Matriz para o planejamento experimental com valores codificados.

Experimento	Ordem Aleatória	X1	X2	X3
1	12	0	1	1
2	6	1	0	-1
3	1	-1	-1	0
4	9	0	-1	-1
5	2	1	-1	0
6	5	-1	0	-1
7	15	0	0	0
8	13	0	0	0
9	4	1	1	0
10	7	-1	0	1
11	11	0	-1	1
12	14	0	0	0
13	10	0	1	-1
14	8	1	0	1
15	3	-1	1	0

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de viscosidade foram ajustados a um modelo com auxílio de um software apropriado, verificando o nível de significância dos fatores e os valores de R^2 (coeficiente de correlação) e o coeficiente de ajuste do modelo (Adj).

A análise de variância do modelo definido como melhor ajuste está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Análise de variância para a viscosidade da fase orgânica

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F_{calc}	F_{tab}	p
Regressão	1,698487	5	0,339697	20,353325	3,482	0,000116
Resíduo	0,150206	9	0,016690			
Total	1,848693	14	-			$R^2=91,875\%$

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; MQ: quadrados médios; F_{calc} : F calculado; F_{tab} : F tabelado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Há um grande número de fatores que são conhecidos por afetar o tamanho médio das nanopartículas e a sua distribuição de tamanhos obtidos pela técnica de miniemulsificação/evaporação de solvente (ASUA, 2002; MUSYANOVYCH, 2008). O número de experimentos aumenta exponencialmente em função do número de fatores avaliados, principalmente se interações de ordem superior entre os mesmos devam ser levadas em consideração.

As variáveis a serem avaliadas no delineamento experimental foram cuidadosamente selecionadas com base na literatura disponível. A variável concentração de PLLA foi selecionada, pois afeta diretamente a quantidade de nanopartículas obtidas, ou seja, a produtividade do processo, o que é importante no caso da aplicação final do produto. A variação da proporção dos solventes do polímero (diclorometano:clorofórmio) foi escolhida pois, estes apresentam diferentes valores de tensão superficial, que é um parâmetro importante na formação das nanopartículas (ASUA, 2002). Outro motivo é que, apesar de o clorofórmio ser comumente utilizado, o diclorometano apresenta menor toxicidade e possui seu limite de ingestão diária regulamentado pelo FDA em $3,5 \times 10^{-4} \text{mg/kg}_{\text{ massa corporal}} \cdot \text{dia}$ (FDA, 2011) para uso em formulações farmacêuticas. A concentração de lecitina de soja foi escolhida, pois a estabilidade das miniemulsões depende da capacidade do surfatante em manter as nanogotas estáveis durante a evaporação do solvente e manter a estabilidade das nanopartículas durante o prazo de utilização da miniemulsão, seja na liberação modificada ou como agente protetor de fármacos ou aditivos.

Dessa forma um planejamento fatorial completo 2^3 foi aplicado a fim de avaliar os efeitos das seguintes variáveis na viscosidade da fase orgânica: concentração de PLLA, concentração de lecitina e razão de diclorometano e clorofórmio na mistura de solvente orgânico.

Na Tabela 4 apresenta a matriz de ensaios codificada e os valores das respostas obtidas para a viscosidade da fase orgânica a 161 rpm.

Tabela 4 – Respostas do planejamento experimental: viscosidade da fase orgânica para os fatores X1, X2 e X3 a 161 rpm.

Experimento	Ordem Aleatória	X1	X2	X3	Viscosidade (161 rpm)
1	12	0	1	1	1,8618
2	6	1	0	-1	2,2342
3	1	-1	-1	0	1,1171
4	9	0	-1	-1	1,4894
5	2	1	-1	0	1,8618
6	5	-1	0	-1	1,4894
7	15	0	0	0	1,4894
8	13	0	0	0	1,8618
9	4	1	1	0	2,2342
10	7	-1	0	1	1,1171
11	11	0	-1	1	1,4894
12	14	0	0	0	1,8618
13	10	0	1	-1	2,2342
14	8	1	0	1	1,8618
15	3	-1	1	0	1,8618

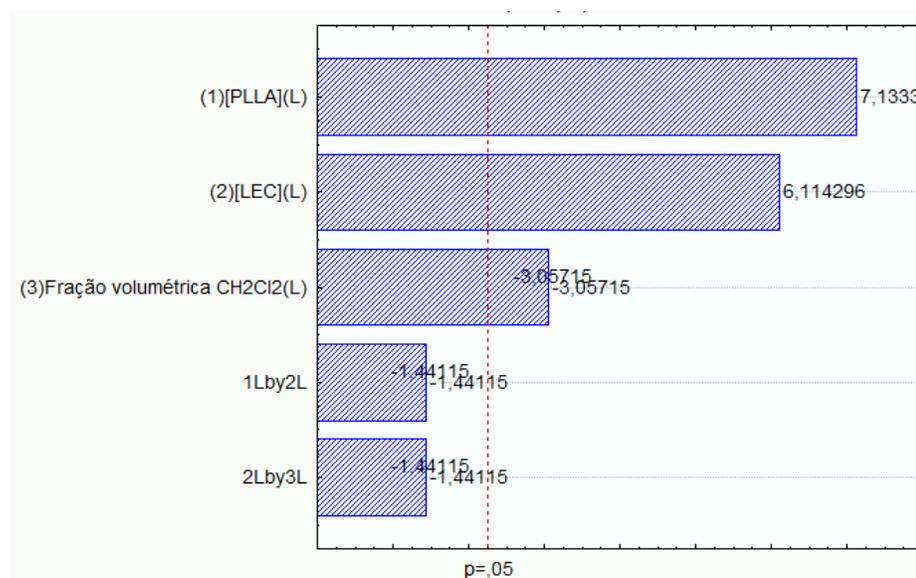
Os resultados foram então ajustados a um modelo com auxílio de um software apropriado, verificando o nível de significância dos fatores e os valores de R^2 (coeficiente de correlação) e o coeficiente de ajuste do modelo (Adj). Concluiu-se que os fatores quadráticos juntamente com o efeito combinado da concentração de PLLA e de fração de diclorometano:clorofórmio não apresentavam efeitos significativos e foram eliminados do modelo.

Na Tabela 5 são apresentados os valores de efeitos estimados para o modelo e valor p . A Figura 2 apresenta o Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados, também para a viscosidade da fase orgânica. A equação do modelo ajustado é apresentada na Equação 1.

Tabela 5 – Efeitos estimados e valor de p para a viscosidade da fase orgânica.

Fatores	Efeitos	Erro padrão	$t_{\text{Calc}}(2)$	p
Média	1,737680	0,033356	52,09459	0,000000
(1) [PLLA]	0,651630	0,091350	7,13335	0,000055
(2) [Lecitina]	0,558540	0,091350	6,11430	0,000176
(3) Fração Volumétrica CH ₂ Cl ₂	-0,279270	0,091350	-3,05715	0,013634
1 x 2	-0,186180	0,129188	-1,44115	0,183413
2 x 3	-0,186180	0,129188	-1,44115	0,183413

[PLLA]: concentração de PLLA; [Lecitina]: concentração de lecitina; Fração volumétrica de diclorometano ($\text{mL}_{\text{CH}_2\text{Cl}_2}/\text{mL}_{(\text{CH}_2\text{Cl}_2+\text{CHCl}_3)}$)



[PLLA]: concentração de PLLA; [LEC]: concentração de lecitina; Fração volumétrica de diclorometano ($\text{mL}_{\text{CH}_2\text{Cl}_2}/\text{mL}_{(\text{CH}_2\text{Cl}_2+\text{CHCl}_3)}$)

Figura 2 - Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para a viscosidade das nanopartículas.

$$\mu = 1,737680 + 0,651630X_1 + 0,558540X_2 - 0,279270X_3 - 0,186180X_{12} - 0,186180 X_{23}$$

Equação (1)

Mediante a análise de variância (Tabela 3) pode-se perceber que o valor de F calculado é superior ao de F tabelado, portanto há rejeição da hipótese nula, concluindo que a variação dos parâmetros apresenta interferência na resposta da viscosidade da fase orgânica para preparação das nanopartículas. Observa-se pela Tabela 5 que os efeitos de interação (1*2 e 2*3) não foram significativos a 95% de confiança, com um valor de p superior a 0,10. Entretanto, foi verificado um melhor ajuste no modelo quando estes foram considerados.

Os efeitos de concentração de PLLA e lecitina apresentaram efeitos significativos com influência positiva na viscosidade. Já os efeitos da fração volumétrica de diclorometano e os efeitos combinados (1*2 e 2*3) apresentaram efeito negativo sobre a viscosidade. Com a visualização do diagrama de Pareto é possível perceber em ordem decrescente os efeitos significativos para 5% de significância ($p=0,05$).

Na Figura 3 está apresentado o gráfico dos valores observados *versus* os valores preditos e na Figura 4 o gráfico normal dos resíduos.

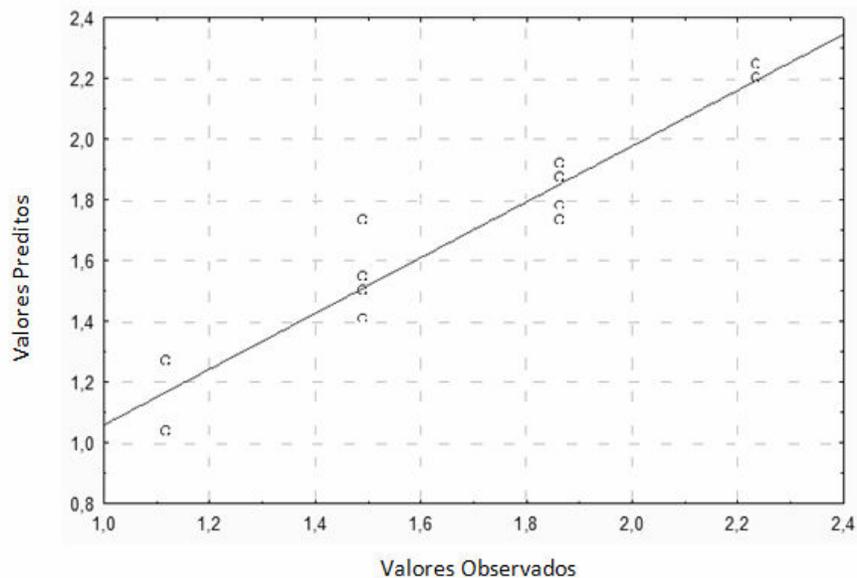


Figura 3 – Gráfico dos valores observados versus valores preditos.

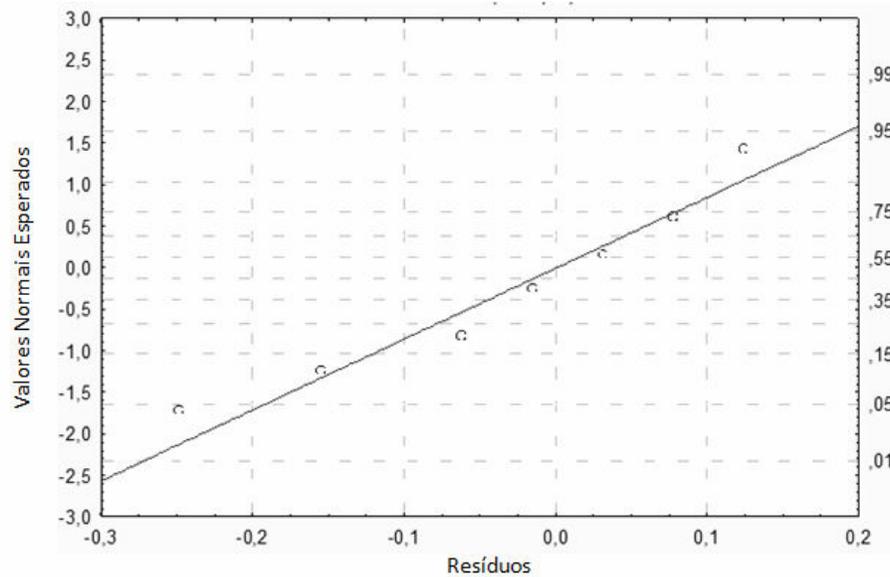


Figura 4 – Gráfico normal dos resíduos.

É possível observar uma boa concordância entre os valores observados e preditos pelo modelo, indicando que este pode ser utilizado para prever valores de viscosidade dentro da faixa experimental avaliada (Figura 3). A Figura 4 permite concluir que há uma distribuição aleatória entre os resíduos de todos os ensaios, sugerindo resíduos independentes.

As Figuras 5 e 6 apresentam os diagramas de Pareto dos efeitos padronizados para os modelos obtidos por Silva-Buzanello (2013) para o diâmetro médio em intensidade (Dz) das nanopartículas e para a o índice de polidispersão (PDI, distribuição de tamanhos).

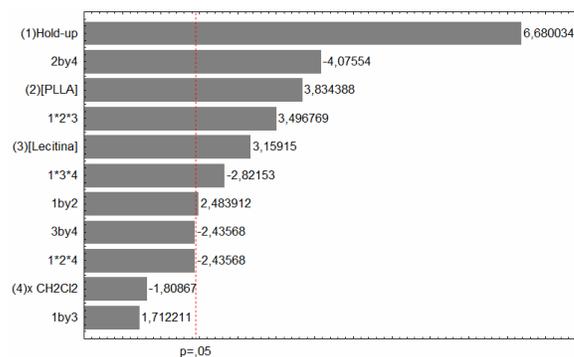


Figura 5. – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para o diâmetro médio das nanopartículas.

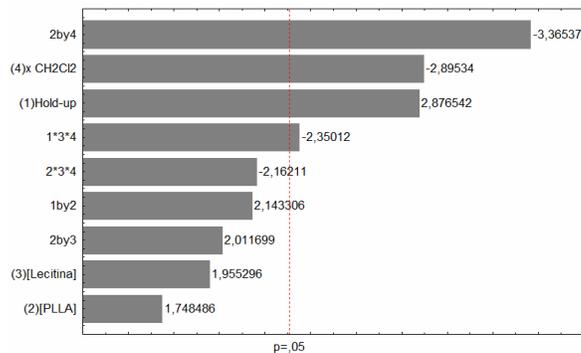


Figura 6 – Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para os valores de índice de polidispersão (IPD) de tamanhos das nanopartículas.

No caso do trabalho desenvolvido por Silva-Buzanello (2013) a variável *hold-up* também foi considerada no modelo, pois representa a relação entre a fase orgânica e o volume total de dispersão (fase orgânica e fase aquosa). No presente trabalho este fator não foi avaliado, pois não se utilizou a fase aquosa.

Nas Figuras 5 e 6 é possível observar que os fatores que apresentaram maior significância no Dz foram os efeitos puros de *hold-up*, concentrações de PLLA, lecitina e também os efeitos combinados de lecitina com concentração de diclorometano e dos três fatores *hold-up*, concentração de PLLA e lecitina. Os demais apresentaram pouca significância, com exceção da concentração de diclorometano e combinação *hold-up* com lecitina, que não foram significativos.

Comparando com os resultados obtidos no presente trabalho podemos observar que o único fator que não se apresentou significativo no trabalho de Silva-Buzanello (2013) e apresentou significância no presente caso foi a concentração de diclorometano. Os demais fatores puros (PLLA e lecitina) apresentam influência em ambos os casos, ou seja, sua concentração afeta a viscosidade que por sua vez influencia de forma significativa no diâmetro. Dessa forma podemos concluir que a viscosidade afeta sim o diâmetro médio

em intensidade das nanopartículas e que os componentes da formulação responsáveis por esse efeito são principalmente a concentração de PLLA e lecitina.

No caso do índice de polidispersão (PDI, distribuição de tamanhos) Silva-Buzanello (2013) determinou que os principais fatores que afetam essa resposta são em ordem decrescente o efeito combinado das concentrações de PLLA com diclorometano, da concentração de diclorometano e, por fim, do *hold-up*. O fator combinado *hold-up*, concentrações de lecitina e diclorometano apresentou pouca significância. Percebe-se que ao contrário do resultado obtido para Dz, nesse caso a concentração de diclorometano apresentou grande importância. No caso da viscosidade a concentração de PLLA apresentou maior influência, o que não ocorreu no caso do PDI. Já o fator concentração de diclorometano mostrou-se significativo em ambos os casos.

A Figura 7 apresenta a superfície de resposta para a variação da concentração de lecitina *versus* a variação da concentração de PLLA tendo a viscosidade como resposta.

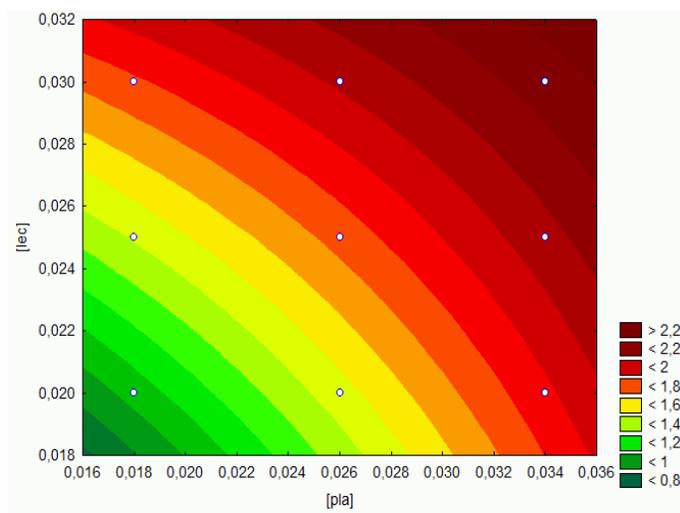


Figura 7 – Superfície de resposta para variação da concentração de lecitina *versus* a concentração de PLLA

Altas concentrações de PLLA combinadas com altas concentrações de lecitina resultaram em uma elevada viscosidade da fase orgânica. Essa viscosidade comparada com os diâmetros das partículas de Silva-Buzanello

(2013) mostram que concentrações elevadas de PLLA em combinação com concentrações elevadas de lecitina resultaram em diâmetros médios de partículas maiores. Musyanovychet al.,(2008) obtiveram partículas maiores com concentração elevada de polímero em seu estudo, fenômeno atribuído ao aumento da viscosidade da fase orgânica, que é confirmado pelo presente modelo.

O comportamento não linear mostrado pelo gráfico da Figura 7 reflete as interações que ocorrem entre o solvente e o polímero.

Essa variação de viscosidades comparada ao IPD de Silva-Buzanello (2013) mostra que quando foram utilizadas menores concentrações de lecitina e maiores concentrações de PLLA, menores valores de IPD foram obtidos, indicando novamente um comportamento não linear do IPD, em relação a essas variáveis.

A Figura 8 apresenta a superfície de resposta para a variação da concentração de PLLA *versus* a fração de solvente.

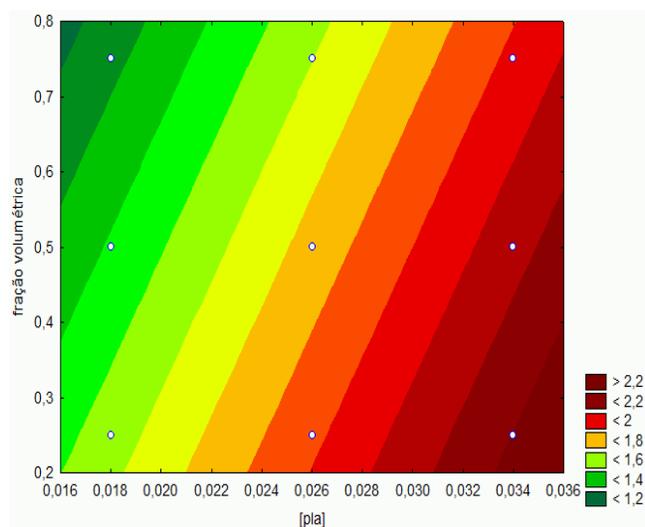


Figura 8 – Superfície de resposta para a variação da concentração de PLA *versus* fração de diclorometano ($\text{mL}_{\text{CH}_2\text{Cl}_2}/\text{mL}_{(\text{CH}_2\text{Cl}_2+\text{CHCl}_3)}$)

O comportamento da resposta da Figura 8 apresenta-se linear, pois o fator de interação entre concentração de PLLA e a da concentração de diclorometano foi ignorado no modelo. Os máximos valores de viscosidade foram obtidos com o nível superior de concentração de PLA e o inferior de fração

volumétrica de diclorometano ($\text{mL CH}_2\text{Cl}_2/\text{mL CH}_2\text{Cl}_2+\text{CHCl}_3$). Silva-Buzanello (2013) também obteve valores máximos de diâmetro médio com o nível superior da concentração de PLLA e o nível inferior da fração de diclorometano na mistura de solventes. O comportamento linear mostrado pelo gráfico mostra que não houve interações entre o solvente e o polímero. Para altas proporções de diclorometano na mistura de solventes (acima de 70%) a variação da concentração de PLLA não influenciou a viscosidade nem o tamanho médio final das nanopartículas, na faixa experimental investigada. .

Os resultados de viscosidade comparados também ao IPD do trabalho de Silva-Buzanello (2013) mostram que os maiores valores de IPD foram encontrados quando maiores concentrações de polímero e menores proporções de diclorometano foram utilizadas. Ainda é possível observar o comportamento não linear do IPD em relação a essas variáveis, pois numa grande região da superfície de resposta o índice de polidispersão se mostrou independente das variáveis.

A Figura 9 apresenta a superfície de resposta para a variação da concentração de lecitina *versus* a fração de solvente.

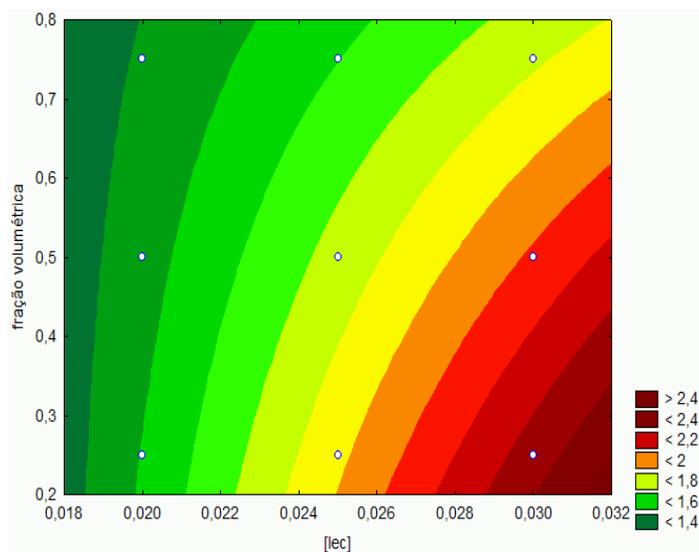


Figura 9 – Superfície de resposta para a variação da concentração de lecitina *versus* fração de diclorometano ($\text{mL CH}_2\text{Cl}_2/\text{mL (CH}_2\text{Cl}_2+\text{CHCl}_3)$)

O efeito combinado das concentrações de lecitina e de diclorometano gera o comportamento não linear na superfície de resposta. Pode-se notar que em altas concentrações de lecitina e baixa fração volumétrica temos altas viscosidades.

A estabilidade das nanopartículas e o tamanho final destas podem ser controlados pelo ajuste da velocidade de agitação, tipo e quantidade de surfactante, viscosidade das fases orgânica e aquosa, massa molar e cristalinidade do polímero e do tipo e concentração de solvente orgânico (TICE; GILLEY, 1985).

Freitas et al., (2005) observaram que a quantidade de surfactante também tem efeito direto sobre as propriedades das nano e micropartículas, ou seja, a concentração de lecitina tem fundamental importância nas nanopartículas, interferindo em várias propriedades, bem como na viscosidade afetando diretamente o tamanho das gotas.

6. CONCLUSÃO

Nanopartículas de PLLA foram obtidas através da técnica de miniemulsificação/evaporação do solvente e tiveram seu diâmetro médio em intensidade e índice de polidispersão caracterizados e avaliados de acordo com um planejamento experimental. A viscosidade das fases orgânicas formadoras das nanopartículas foi avaliada no presente trabalho através de planejamento experimental, mostrando que é possível correlacionar os efeitos significativos para as três respostas (viscosidade, diâmetro médio em intensidade - Dz e Índice de Poli dispersão - PDI).

Os principais fatores que afetam a viscosidade e que também afetam Dz são concentração de PLLA e de lecitina. Para viscosidade e PDI o fator mais representativo em comum foi a concentração de diclorometano.

REFERÊNCIAS

ASUA, J. M. Miniemulsion polymerization. *Progress in Polymer Science*, v. 27, p. 1283-1346, 2002.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F.; PERALTA-ZAMORA, P.; VOLPATO, N. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 9, n.1, p. 23-32. 2008.

FDA, U.S. Food and Drug Administration, disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cdrhfiles/newcdea/newcdeacertification.cfm?cderr=632>, acesso em: agosto de 2013.

FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal Of Controlled Release*, v. 102, p. 313-332. Mar. 2005.

KERMABON-AVON, G.; BRESSY, C., MARGAILLAN, A. Statistical design strategies to optimize properties in miniemulsion polymerization of methyl methacrylate. *European Polymer Journal*, v. 45, p. 1208-1216. 2009.

LANDFESTER, K., BECHTHOLD, N., TIARKS, F., ANTONIETTI, M., Formulation and Stability Mechanisms of Polymerizable Miniemulsions. *Macromolecules*, 1999.32: p. 5222-5228.

LEIMANN, F. V.; BIZ, M. H.; MUSYANOVYCH, A.; SAYER, C. ; LANDFESTER, K. ; ARAUJO, P. H. H. Hydrolysis of Poly(Hydroxybutyrate-co-Hydroxyvalerate) Nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 128, p. 3093-3098, 2013.

MUSYANOVYCH, A; SCHMITZ-WIENKE, J; MAILÄNDER, V; WALTHER, P; LANDFESTER, K. Preparation of Biodegradable Polymer Nanoparticles by Miniemulsion Technique and Their Cell Interactions. *Macromolecular Bioscience*, v. 8, p. 127-139, 2008.

PICH, A.; SCHIEMENZ, N.; BOYKO, V.; ADLER, H-J. P. Thermo reversible gelation of biodegradable polyester (PHBV) in toluene. *Polymer*, v. 47, p. 553-560, 2006.

PRAKOBVAITAYAKIT, M.; NIMMANNIT, U. Optimization of polylactic-co-glycolic acid nanoparticles contain ingitra-conazole using 23 factorial design. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, v. 4, p. 1-9. 2003.

QUEIROZ, D. P. Diagrama de fases, propriedades térmicas e morfológicas de blendas de poli(ácido láctico) e poli(metacrilato de metila). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP, 2000.

REIS, C. P; NEUFELD, R. J; RIBEIRO, A. J; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 2, p. 8– 21, 2006.

SILVA-BUZANELLO, R. A. da Nanoencapsulação de curcumina em polímeros biodegradáveis/biocompatíveis. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Campo Mourão, PR, 2013.

SOARES, A. Q. Polímeros biodegradáveis: novas perspectivas para as ciências farmacêuticas. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 2, p. 202-205, 2005.

TICE, Thomas R.; GILLEY, Richard M..Preparation of injectable controlled-release microcapsules by a solvent-evaporation process.Jornal of Controlled Release, v. 2, p. 343-352. 1985.

VANDERHOFF, J. W., EL-AASSER, M. S.; HOFFMAN, J. D., US Patent 4,070,323. 1978.