

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

SELMA CALGAROTO

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA E DA CINÉTICA DE
DEGRADAÇÃO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE
NÚCLEO LIPÍDICO E DO PERFIL DE BIODEGRADAÇÃO E
ECOTOXOCIDADE NO MEIO AMBIENTE**

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Química

Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann
Orientadora

Porto Alegre, Novembro/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

SELMA CALGAROTO

**AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA E DA CINÉTICA DE
DEGRADAÇÃO DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS DE
NÚCLEO LIPÍDICO E DO PERFIL DE BIODEGRADAÇÃO E
ECOTOXOCIDADE NO MEIO AMBIENTE**

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Química

Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann
Orientadora

Porto Alegre, Novembro/2018

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre (novembro/2014) e (novembro/2018), no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação do(a) Professor(a) Doutor(a) ADRIANA RAFFIN POHLMANN. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Professor da Banca

Prof. Dr. Orientador

Prof. Dr. Co-orientador (se houver)

Aluno

“Ella está en el horizonte - dice Fernando Birri -.
Me acerco dos pasos, ella se aleja dos pasos. Camino diez pasos y el horizonte se corre diez
pasos más allá. Por mucho que yo camine, nunca la alcanzaré.
¿Para que sirve la utopía? Para eso sirve: para caminar.”

(Eduardo H. Galeano. *Las Palabras Andantes*; Siglo XXI:Madrid, 1993, p. 310)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ser a minha força e por me dar sabedoria para seguir em frente e não desistir.

Agradeço aos meus pais Lecenildo e Nilza, pelo amor e apoio incondicionais e por sempre terem sido meu maior exemplo de força, trabalho e resiliência. Por me mostrarem que a honestidade é a mais nobre das virtudes e por me apoiarem na caminhada em busca ao conhecimento, mesmo sem contarem com as mesmas oportunidades no passado. À toda a minha família e pessoas que amo, obrigada por entenderem a minha ausência mesmo com o coração apertado de saudades e os quase 500 km que nos separaram durante esses quatro anos!

Agradeço ao meu Esposo, Diego, por dividir comigo as noites e finais de semana de estudos e as incontáveis vezes de experimentos no laboratório me fazendo companhia. Muito mais do que isso, por seu meu companheiro nas horas boas ou ruins, por sonhar os mesmos sonhos e pelo seu amor sempre presente.

À professora Adriana Raffin Pohlmann, pela supervisão e por todas as horas dedicadas às minhas dúvidas. Em especial, pela confiança e por ter me proporcionado a suficiente independência científica no período final do doutorado. Gostaria de agradecer também pela convivência, a qual proporcionou meu crescimento pessoal e profissional.

Aos colegas dos laboratórios K204 (IQ-UFRGS) e 405 (Fac. Farmácia-UFRGS) pela convivência agradável e a troca de conhecimentos. Aos alunos de iniciação científica, Lucas Fauri e Leticia Natividade. Ao Rodrigo, por descontrair o ambiente com seu bom humor. Às colegas que se tornaram amigas, Taise e Leidyana. Em especial, à Aline pelos dias de maior cansaço e frustração por conta dos resultados desanimadores e por ter sempre uma palavra de esperança.

À Letícia Avila, da CORSAN, pela colaboração nos ensaios de ecotoxicidade.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela excelente infraestrutura e recursos humanos e técnicos.

À CAPES/MEC pela bolsa de estudos durante meu primeiro ano de doutorado e ao CNPq/MCTI pela bolsa de estudos concedida no período restante.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XIV
RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo geral.....	5
2.2 Objetivos específicos	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1 Nanotecnologia: fundamentos e aplicações	6
3.2 Nanotecnologia em saúde: sistemas nanocarreadores	7
3.2.1 Nanopartículas poliméricas carreadoras de fármacos	8
3.3 Poliésteres constituintes das nanopartículas	11
3.3.1 Biodegradação de polímeros	12
3.3.2 Degradação de polímeros.....	14
3.3.2.1 Degradação e Biodegradação de poliésteres constituintes das nanopartículas	16
3.3.3 Estudos de estabilidade química de poliésteres em sistemas de liberação (micro e nanoestruturas).....	20
3.4 Nanotecnologia e meio ambiente	27
3.4.1 Ecotoxicidade de Nanopartículas	29
4. EXPERIMENTAL	32
4.1 Materiais e equipamentos	32
4.1.1 Reagentes, solventes e materiais de consumo	32
4.1.2 Equipamentos.....	33
4.2 Métodos empregados para obter os resultados descritos na seção 5.1	34

4.2.1	<i>Preparação das formulações de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNC), nanoesfera (NS) e nanoemulsão (NE) descritas na seção 5.1</i>	34
4.2.2	<i>Cromatografia por exclusão de tamanho, SEC</i>	35
4.2.3	<i>Estudo da estabilidade química e da cinética de degradação das LNC por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC)</i>	37
4.2.4	<i>Difração de raios x (DRX)</i>	38
4.2.5	<i>Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i>	38
4.2.6	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H (¹H-RMN)</i>	38
4.2.7	<i>Determinação de índice de acidez</i>	39
4.2.8	<i>Determinação de contaminação bacteriana ou fúngica nas formulações</i>	39
4.2.8.1	<i>Identificação de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa</i>	40
4.2.8.2	<i>Identificação da presença de fungos filamentosos e leveduras</i>	40
4.2.8.3	<i>Análises de microrganismos através da técnica de turbidimetria</i>	40
4.2.8.4	<i>Análise estatística dos dados</i>	40
4.3	Métodos empregados para obter os resultados descritos na seção 5.2	41
4.3.1	<i>Preparação das formulações de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNC) utilizadas nos estudos de ecotoxicidade e de biodegradação em solos</i>	41
4.3.2	<i>Ensaio de avaliação da ecotoxicidade das LNC para organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos</i>	42
4.3.2.1	<i>Avaliação da toxicidade crônica através do método de ensaio com algas <i>Pseudokirchneriella subcaptata</i> (<i>Selenastrum capricornutum</i>)</i>	42
4.3.2.2	<i>Avaliação da toxicidade aguda através do método de ensaio com microcrustáceos <i>Daphnia similis</i></i>	44
4.3.2.3	<i>Avaliação da toxicidade aguda através do método de ensaio com peixes <i>Pimephales Promelas</i></i>	45
4.3.2.4	<i>Preparação da água de diluição utilizada nos ensaios com <i>Daphnia similis</i> e com <i>Pimephales Promelas</i></i>	47
4.3.3	<i>Análise de rastreamento do movimento das partículas (Nanosight®)</i>	48
4.4	Métodos empregados para obter os resultados descritos na seção 5.3	48

4.4.1 Determinação do perfil de biodegradação da LNC em solos pelo método do ensaio respirométrico	48
4.4.1.1 Determinação da quantidade de CO ₂ produzida.....	49
4.5 Métodos gerais	50
4.5.1 Espalhamento de luz dinâmico	50
4.5.2 Difração de laser	51
4.5.3 Análise do potencial zeta	51
4.5.4 Potenciometria.....	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Avaliação da estabilidade química e da cinética de degradação das LNC	53
5.1.1 Preparação das dispersões aquosas de LNC com distintas proporções de PCL com diferentes massas molares.....	53
5.1.2 Determinação de contaminação bacteriana e fúngica nas formulações.....	57
5.1.2.1 Identificação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	59
5.1.2.2 Identificação de fungos filamentosos ou leveduriformes.....	59
5.1.2.3 Identificação da contaminação bacteriana e fúngica através de turbidimetria.....	60
5.1.2.4 Determinação e validação da metodologia analítica utilizada - Cromatografia por exclusão de tamanho, SEC	62
5.1.2.5 Compatibilidade do método de separação escolhido para a análise das LNC.....	68
5.1.2.6 Determinação da distribuição de massa molar das LNC antes e após a esterilização	72
5.1.2.7 Determinação do grau de cristalinidade dos materiais constituintes das LNC e das formulações, antes e após a esterilização	76
5.1.2.8 Avaliação da estabilidade química e da cinética de degradação das LNC (estéreis e não estéreis), armazenadas a 5 °C	78
5.1.2.8.1 Fração de cadeias clivadas na LNC.....	91
5.1.2.8.2 Hidrólise autocatalisada e hidrólise não catalisada.....	95
5.1.2.9 Determinação da distribuição de diâmetros de LNC estéreis e não estéreis em função do tempo de armazenamento	98

5.1.3 Análises de pH e de potencial zeta	101
5.2 Avaliação da ecotoxicidade das LNC em meio aquático.....	111
5.2.1 Preparação e caracterização das formulações de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNC) utilizadas nos estudos de ecotoxicidade e de biodegradação em solos.....	111
5.2.2 Ensaio de ecotoxicidade em diferentes níveis tróficos.....	112
5.2.2.1 Ecotoxicidade para algas – <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	112
5.2.2.2 Ecotoxicidade para microcrustáceos – <i>Daphnia simillis</i>	114
5.2.2.3 Ecotoxicidade para peixes – <i>Pimephales promelas</i>	116
5.3 PERFIL DE BIODEGRAÇÃO DAS LNC EM SOLOS	119
6. CONCLUSÕES	122
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	124
8. REFERÊNCIAS	125
ANEXOS	150

Lista de figuras

- Figura 1.** Histograma representativo do número de publicações por ano cruzando-se os termos *nano* and drug*. Base de dados *Web of Science®*, consultada em agosto de 2018. 1
- Figura 2.** Esquema representativo do processo de degradação de polímeros biodegradáveis. Adaptado de: Krzan et al., 2006¹⁴³. 13
- Figura 3.** Mecanismo de hidrólise da poli(ϵ -caprolactona)-(PCL). Adaptado de Höglund et al., 2007. 17
- Figura 4.** Aparato experimental empregado nos ensaios respirométricos. 48
- Figura 5.** Distribuição de tamanho de partícula (nm) por percentual de volume e número das formulações preparadas com diferentes proporções de parede polimérica – (a) LNC 1 PCL, M_n 10.000 g mol⁻¹ 100% m/m; (b) LNC 2 PCL, M_n 80.000 g mol⁻¹ e 10.000 g mol⁻¹, 9:1, m/m; (c) LNC 3 PCL, M_n 80.000 g mol⁻¹ 100% m/m), antes e após esterilização. Técnica: difração de laser (meio dispersante: água). (n=3), análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey (p<0,05). [eixos: 1 - diâmetro de esfera equivalente, por volume, d[4,3]v; 2 - diâmetro cumulativo em volume de 10% da população total, d[0,1]v; 3 - diâmetro cumulativo em volume de 50% da população total, d[0,5]v; 4 - diâmetro cumulativo em volume de 90% da população total, d[0,9]v; 5 - diâmetro de esfera equivalente, por número, d[4,3]n; 6 - diâmetro cumulativo em número de 10% da população total, d[0,1]n; 7 - diâmetro cumulativo em número de 50% da população total, d[0,5]n; 8 - diâmetro cumulativo em número de 90% da população total, d[0,9]n. 54
- Figura 6.** Distribuição de diâmetros de partícula das formulações preparadas com diferentes proporções de parede polimérica, antes e após esterilização: (a) LNC 1 não estéril, (b) LNC 1 estéril, (c) LNC 2 não estéril, (d) LNC 2 estéril, (e) LNC 3 não estéril, (f) LNC 3 estéril, por espalhamento de luz dinâmico (meio dispersante: água). Cada distribuição corresponde à média de três lotes. Ao lado de cada gráfico de distribuição de diâmetro é mostrada a respectiva média das funções de auto correlação temporal (G(τ)) referentes a três lotes. 56
- Figura 7.** Formulações estéreis de LNC 1 (a) e (c), LNC 2 (c) e (d) e LNC 3 (e) e (f), após 48 horas de incubação em placas de ágar sangue (37 °C \pm 1) e ágar Sabouraud (35 °C \pm 1). 58
- Figura 8.** Formulações não estéreis de LNC 1 (a) e (b), LNC 2 (b) e (c) e LNC 3 (e) e (f), após 48 horas de incubação em placas de ágar sangue (37 °C \pm 1) e ágar Sabouraud (35 °C \pm 1). 58
- Figura 9.** Fotomicrografia das lâminas preparadas pelo isolamento de colônia de bactérias a partir das respectivas placas de ágar sangue das formulações não estéreis LNC 1 (a.1), LNC 2 (b.1) e LNC 3 (c.1) e fungos leveduriformes a partir

das placas de ágar <i>Sabouraud</i> das formulações não estéreis LNC 1 (a.2), LNC 2 (b.2) e LNC 3 (c.2), visualizadas em microscópio (aumento de 1000x).....	60
Figura 10. Perfis de distribuição de massa molar de cada material constituinte das LNC, obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). (a) Polisorbato 80 (P80), monoestearato de sorbitano (MS) e triglicerídeo de ácidos cáprico e caprílico (TCC); (b) poli(ϵ -caprolactona) - PCL de diferentes massas molares constituintes das formulações LNC 1 (M_n 10.000 g mol ⁻¹), LNC 2 (M_n 80.000 g mol ⁻¹) e LNC 3 (mistura 9:1 M_n 80.000:10.000 g mol ⁻¹).....	63
Figura 11. Estrutura química do monoestearato de sorbitano (MS).....	64
Figura 12. Perfis de distribuição de massa molar das nanodispersões obtidas a partir da mistura dos constituintes das LNC por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). *LNC - pico (1) = TCC; pico (2) = mistura de P80 + MS; pico (3) = PCL; NS - pico (1) = ausente; pico (2) = mistura de P80 + MS; pico (3) = PCL; NE – pico (1) = TCC; pico (2) = mistura dos componentes moleculares da LNC (P80 + MS); pico (3) = ausente.	67
Figura 13. Perfis de massa molar para as LNC a partir de diferentes técnicas de isolamento, obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). (a): rotaevaporado; (b) sobrenadante extraído; (c) precipitado extraído.....	69
Figura 14. Perfis de distribuição de massa molar para a LNC a partir de diferentes técnicas de secagem após o isolamento da amostra, obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). (a) estufa (30 °C); (b) dessecador (temperatura ambiente).	71
Figura 15. Perfis de distribuição de massa molar para as LNC, antes e após a esterilização: 1) precipitado e 2) sobrenadante, obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). Em ambos os perfis, (a) = LNC 1 não estéril; (b) = LNC 1 estéril; (c) = LNC 2 não estéril; (d) = LNC 2 estéril; (e) = LNC 3 não estéril; (f) = LNC 3 estéril. Em (1), os picos (1), (2) e (3) são equivalentes à massa molar do TCC, MS + P80 e PCL, respectivamente.....	73
Figura 16. Difração de raios-x (a) PCL de diferentes massas molares constituintes das formulações LNC 1 (M_n 10.000 g mol ⁻¹), LNC 2 (M_n 80.000 g mol ⁻¹) e LNC 3 (mistura 9:1 M_n 80.000:10.000 g mol ⁻¹). (b) Formulações de LNC, estéreis e não estéreis.	76
Figura 17. Perfis de distribuição de massa molar para as formulações LNC 1, LNC 2 e LNC 3, não estéreis (a, c e e) e estéreis (b, d e f), armazenadas a 5 °C, durante 60 dias. Resultados obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) para o precipitado extraído. Inicialmente, os picos (1), (2) e (3) são equivalentes à massa molar do TCC, MS + P80 e PCL, respectivamente. n=3.	79
Figura 18. Perfis de perda de massa (ΔM_w %) para as formulações de nanocápsulas, não estéreis e estéreis, armazenadas a 5 °C durante 60 dias (n = 3). Resultados obtidos	

por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). Pico (1) = TCC; Pico (2) = mistura de P80 + MS; Pico (3) = PCL.....	81
Figura 19. Mudanças na massa molar numérica média (M_n) e de dispersidade (\mathbb{D}), para o pico 3, referente à PCL, das formulações de nanocápsulas não estéreis e estéreis, armazenadas a 5 °C durante 60 dias (n = 3). Resultados obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).	82
Figura 20. Mudanças na massa molar numérica média (M_n) para os picos 1 e 2, referentes ao TCC (pico 1) e à mistura P80 + MS (pico 2), das formulações de nanocápsulas não estéreis e estéreis, armazenadas a 5 °C durante 60 dias (n = 3). Resultados obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).	83
Figura 21. Perfis de perda de massa para o sobrenadante coletado das formulações LNC 1 (a), LNC 2 (b) e LNC 3 (c), não estéreis e estéreis, armazenadas a 5 °C, durante 60 dias. Resultados obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). n=3.....	88
Figura 22. Mudanças na massa molar numérica média (M_n) ((a), (c), (e)) e massa molar ponderal média (M_w) ((b), (d), (f)), para o sobrenadante coletado das formulações LNC 1 não estéril e estéril (a) e (b), LNC 2 não estéril e estéril (b) e (c) e LNC 3 não estéril e estéril (e) e (f), armazenadas a 5 °C, durante 60 dias. Resultados obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). n=3.....	89
Figura 23. Fração de cadeias clivadas (f) para as LNC com diferentes proporções de parede polimérica (LNC 1, LNC 2 e LNC 3), estéreis e não estéreis, avaliadas durante 60 dias de armazenamento, a 5 °C. Resultados obtidos a partir de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). Os valores são representados como a média de três experimentos independentes (n=3). ^{a,b,c,d} letras minúsculas correspondem à análise realizada entre os diferentes tempos para cada formulação independente (estéril e não estéril); A,B letras maiúsculas correspondem à análise realizada comparando a condição (estéril e não estéril) nos diferentes tempos; *letras iguais significa equivalência estatística para os dados (ANOVA via dois fatores, com pós-teste de Bonferroni e $p < 0,05$).	92
Figura 24. Distribuição de tamanho de partícula por percentual de volume e número das formulações preparadas com diferentes proporções de parede polimérica, não estéreis (LNC 1 (a), LNC 2 (c) e LNC 3 (e) antes e após 60 dias e estéreis (LNCS 1 (b), LNCS 2 (d) e LNCS 3 (f) antes e após 60 dias. Técnica: difração de laser (meio dispersante: água). n = 3. [eixos: 1- diâmetro de esfera equivalente, por volume, $d[4,3]_v$; 2- diâmetro cumulativo em volume de 10% da população total, $d[0,1]_v$; 3- diâmetro cumulativo em volume de 50% da população total, $d[0,5]_v$; 4- diâmetro cumulativo em volume de 90 % da população total, $d[0,9]_v$; 5- diâmetro de esfera equivalente, por número, $d[4,3]_n$; 6- diâmetro cumulativo em número de 10% da população total, $d[0,1]_n$; 7- diâmetro cumulativo em número de 50% da	

população total, $d[0,5]n$; 8- diâmetro cumulativo em número de 90% da população total, $d[0,9]n$	99
Figura 25. Variação do potencial <i>zeta</i> e do pH em função do tempo de armazenamento para as formulações LNC 1 não estéril (a) e estéril (b), LNC 2 não estéril (c) e estéril (d) e LNC 3 não estéril (e) e estéril (f). $n=3$. ^{a,b,c,d,e} letras minúsculas correspondem à análise realizada entre os diferentes tempos para cada formulação independente (estéril e não estéril); *letras iguais significa equivalência estatística para os dados (ANOVA via dois fatores, com pós-teste de Bonferroni e $p<0,05$).	102
Figura 26. Inibição do crescimento algal em função da concentração de LNC durante 72 h de exposição. Os dados representam a média ($n=3$) \pm desvio padrão.	113
Figura 27. Imobilização dos microcrustáceos, <i>Daphnia simillis</i> , em função da concentração de LNC durante 48 h de exposição. Os dados representam a media ($n=3$) \pm desvio padrão.....	115
Figura 28. Mortalidade (%) de peixes <i>Pimephales promelas</i> , em função da concentração de LNC durante 24 h (A) e 48 h (B) de exposição. Os dados representam a média ($n=3$) \pm desvio padrão.....	117
Figura 29. Geração de dióxido de carbono (CO_2) após exposição das amostras de LNC, controle positivo (celulose) e controle negativo (polipropileno) em ensaio de solo simulado durante 90 dias. *letras iguais significa equivalência estatística para os dados (análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ($p<0,05$)).	119

Lista de tabelas

Tabela 1. Principais contribuições na literatura acerca da estabilidade físico-química de poliésteres em sistemas de liberação em sua forma microparticulada.	23
Tabela 2. Principais contribuições na literatura acerca da estabilidade físico-química de poliésteres em sistemas de liberação em sua forma nanoparticulada.	24
Tabela 3. Composição das formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico com diferentes composições de parede polimérica (LNC 1, 2 e 3), nanoemulsão (NE) e nanoesfera (NS).	35
Tabela 4. Composição das soluções utilizadas no preparo do meio L.C. Oligo.	42
Tabela 5. Volume e concentração de formulação utilizados nos ensaios de algas <i>Pseudokirchneriella subcaptata</i> (<i>Selenastrum capricornutum</i>).	44
Tabela 6. Volume e concentração de formulação utilizados no ensaio com <i>Daphnia similis</i>	45
Tabela 7. Volume e concentração de formulação utilizados no ensaio com <i>Pimephales promelas</i>	46
Tabela 8. Composição da água de diluição utilizada nos ensaios com <i>Daphnia similis</i> e <i>Pimephales promelas</i>	47
Tabela 9. Caracterização das formulações de nanocápsulas, antes e após esterilização, a partir de espalhamento de luz dinâmico (DLS). (n=3), análise de variância (ANOVA).	57
Tabela 10. Análise de turbidimetria para todas as formulações avaliadas juntamente com seus respectivos controles ($\lambda=370$ nm).	61
Tabela 11. Volume de retenção (mL), massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e dispersidade (\mathfrak{D}), de cada material constituinte das LNC, obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).	63
Tabela 12. Volume de retenção (mL), massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e dispersidade (\mathfrak{D}), das nanodispersões obtidas a partir da mistura dos constituintes das LNC por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).	67
Tabela 13. Volume de retenção (mL), massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e dispersidade (\mathfrak{D}) das formulações de nanocápsulas separadas por dois diferentes métodos de isolamento, a partir de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). Inicialmente, os picos (1), (2) e (3) são equivalentes à massa molar do TCC, da mistura dos constituintes secundários MS e P80 e da PCL, respectivamente. (n=3).	70
Tabela 14. Volume de retenção (mL), massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e dispersidade (\mathfrak{D}), das formulações de nanocápsulas obtidos a partir de diferentes métodos de secagem da amostra. Técnica: cromatografia por	

exclusão de tamanho (SEC). Os picos (1), (2) e (3) são equivalentes à massa molar do TCC, à mistura de MS + P80 e à PCL, respectivamente. (n=3).....	72
Tabela 15. Volume de retenção (mL), massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e dispersidade (\mathcal{D}) das LNC (precipitado), antes e após esterilização, a partir de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). Os picos (1), (2) e (3) são equivalentes à massa molar do TCC, MS + P80 e PCL, respectivamente. (n=3), análise de variância (ANOVA).....	74
Tabela 16. Volume de retenção (mL), massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e dispersidade (\mathcal{D}) das LNC (sobrenadante) preparadas com diferentes proporções de parede polimérica, antes e após esterilização, a partir de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). Inicialmente, os picos (1) e (2) são equivalentes à massa molar do TCC e MS + P80, respectivamente. (n=3), análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste <i>post-hoc</i> de Tukey ($p < 0,05$).....	75
Tabela 17. Índice de cristalinidade das amostras de PCL comercial de diferentes massas molares e das formulações de LNC, antes e após a esterilização.....	77
Tabela 18. Valores de r^2 para as formulações de LNC estéreis e não estéreis, em função do tempo de armazenamento (60 dias), descritos pelos mecanismos de hidrólise auto-catalisado e não-catalisado.	96
Tabela 19. Caracterização das formulações de nanocápsulas preparadas com diferentes proporções de parede polimérica, antes e após esterilização, a partir de espalhamento de luz dinâmico (DLS). (n=3), análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste <i>post-hoc</i> de Tukey ($p < 0,05$).	100
Tabela 20. Caracterização físico-química das formulações de LNC por difração de laser, espalhamento de luz dinâmico (DLS), microeletroforese, potenciometria e rastreamento de nanopartículas (NTA). (n=3). (Média \pm desvio padrão).	112
Tabela 21. Parâmetros físico-químicos da água de diluição utilizada no ensaios de toxicidade com peixes <i>Pimephales promelas</i> . (n = 3).....	118

Lista de abreviaturas e símbolos

CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
Đ	Dispersidade
DVB	Divinilbenzeno
d _h	Diâmetro hidrodinâmico
d _{0,5}	Diâmetro cumulativo em volume de 50% da população total de partículas, por difração de laser
d _{4,3}	Diâmetro médio de esfera equivalente, obtido por difração de laser
¹ H-NMR	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
MS	Monoestearato de sorbitano
<i>M_n</i>	Massa molar numérica média
<i>M_w</i>	Massa molar ponderal média
<i>f</i>	Fração de cisões de cadeia
NC	Nanocápsula
NS	Nanoesfera
PCL	Poli(ε-caprolactona)
PDI	Índice de polidispersão obtido por DLS, pela aplicação do método dos cumulantes
P80	Polissorbato 80
RMN	Ressonância magnética nuclear
<i>r</i>	Coefficiente de correlação
rpm	Rotações por minuto
°C	Graus Celsius de temperatura
λ	Comprimento de onda

TCC	Triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico
THF	Tetrahidrofurano
ϕ	Diâmetro

Resumo

Na presente tese foram investigadas a estabilidade química e a cinética de degradação de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNC), utilizadas como sistemas nanocarreadores de fármacos. Com o intuito de avaliar a influência do processo de esterilização, bem como da composição da parede polimérica na cinética de degradação, LNC foram preparadas e armazenadas (5 °C), após a esterilização ou não. A identificação de bactérias e fungos foi realizada por esgotamento em placas de ágar (sangue e *Sabouraud*) e turbidimetria. As LNC foram caracterizadas quanto ao tamanho (espalhamento de luz dinâmico – DLS e difração de laser), potencial *zeta* (mobilidade eletroforética) e pH (potenciometria). As alterações de massa molar, a fração de cisão de cadeias e o mecanismo de hidrólise foram determinados por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC). Os resultados demonstraram diferentes perfis de degradação em relação à hidrólise, dependendo da condição (estéril ou não estéril). A maior perda de massa de PCL foi observada para as formulações não estéreis, comprovando que a hidrólise biótica foi responsável pela aceleração da degradação, mesmo quando armazenadas a baixa temperatura (5 °C). Esses resultados demonstraram que a determinação da estabilidade física não é suficiente como parâmetro de avaliação da estabilidade desses sistemas. A técnica de SEC mostrou ter alto potencial para a avaliação de todos os constituintes das nanocápsulas, embora não seja comumente utilizada na avaliação da estabilidade de estruturas supramoleculares. Foi possível estabelecer uma metodologia sistematizada visando contribuir para uma melhor compreensão dos parâmetros necessários para investigar a estabilidade de sistemas nanoestruturados, considerando parâmetros físicos, químicos e microbiológicos. Para avaliar a ecotoxicidade das LNC, utilizou-se espécies de algas, microcrustáceos e peixes como modelos de níveis tróficos. Os organismos foram sensíveis às amostras de nanocápsulas, demonstrando que esses modelos podem ser usados como bons indicadores da toxicidade da nanoformulação. O perfil de biodegradação no solo foi investigado submetendo as formulações de LNC a um teste respirométrico. Após exposição ao teste respirométrico por 90 dias, as formulações de LNC apresentaram maiores níveis de produção de CO₂ em comparação aos controles positivo (celulose) e negativo (polipropileno).

Abstract

This thesis describes an innovative investigation on the chemical stability and degradation kinetics of lipid core nanocapsules (LNC), used as drug nanocarrier. In order to evaluate the influence of the sterilization process as well as the polymer wall composition on the degradation kinetics of these systems, LNC were prepared and stored (5 °C) after sterilization or not. The identification of bacteria and fungi was performed by techniques of agar plate (blood and *Sabouraud*) and turbidimetry. The LNC were characterized in size (dynamic light scattering - DLS and laser diffraction), zeta potential (electrophoretic mobility) and pH (potentiometry). Molecular weight changes, fraction of chain scissions and the mechanism of hydrolysis were determined by size exclusion chromatography (SEC). The results clearly demonstrated different degradation profiles and susceptibilities towards hydrolysis depending on the condition (sterile or non-sterile). Thus, the highest PCL weight loss was observed for the non-sterile formulations, proving that biotic hydrolysis was responsible for accelerating hydrolysis of the LNC even when stored at low temperature (5 °C). These results demonstrated that the determination of the physical stability of the system is not sufficient in stability studies once chemical changes have been observed. SEC technique has been shown to have a high potential for the evaluation of all constituents of the nanocapsules, even though not widely used to evaluate the chemical stability of supramolecular structures. In this way, a systematized methodology was established to contribute in a better understanding of the necessary parameters to investigate the nanostructure systems stability taking into account physical, chemical and microbiological parameters of evaluation. In addition, environmental studies to evaluate the ecotoxicity in aquatic media (trophic levels) and the biodegradation in soil were performed. To evaluate the ecotoxicity of the LNC, algal, microcrustacean and fish species were used as models of three different trophic levels. The organisms were sensitive to the nanocapsule samples, demonstrating that these models can be used as good indicators of the nanoformulation toxicity. The biodegradation profile in simulated soil was investigated submitting the nanocapsules formulations to a respirometric test. The LNC formulation showed higher levels of CO₂ production compared to the positive (cellulose) and negative (polypropylene) controls.

1. Introdução

A nanotecnologia tem se mostrado uma área promissora, considerando os avanços da nanociência nas últimas duas décadas. Dentre as diferentes aplicações da nanotecnologia, os estudos nas áreas da nanomedicina e da nanotecnologia farmacêutica, relacionados à administração de fármacos, diagnóstico *in vitro*, biomateriais e engenharia de tecidos merecem destaque¹.

Nesse sentido, o desenvolvimento de diferentes sistemas nanocarreadores de fármacos têm revolucionado as perspectivas com relação ao tratamento de doenças crônicas. O sucesso dos sistemas de base nanotecnológica é atribuído, principalmente, às vantagens em relação aos sistemas convencionais, tais como o aumento do tempo de circulação do fármaco no organismo e a transposição de barreiras biológicas, além da possibilidade de direcionar a entrega de fármacos a sítios-alvo específicos²⁻⁶.

O número de artigos publicados na área (cruzando-se os termos “*nano* and drug*”) aumentou significativamente nas últimas décadas, em particular nos últimos 10 anos, dos quais advêm 89% do total das publicações (93.575 de um total de 105.397), contabilizadas a partir de 1978 (Base de dados *Web of Science*®, consultada em agosto de 2018). A Figura 1 representa de forma ilustrativa o crescimento do número de publicações desde 1978 até 2018, mostrando um aumento expressivo nos últimos anos.

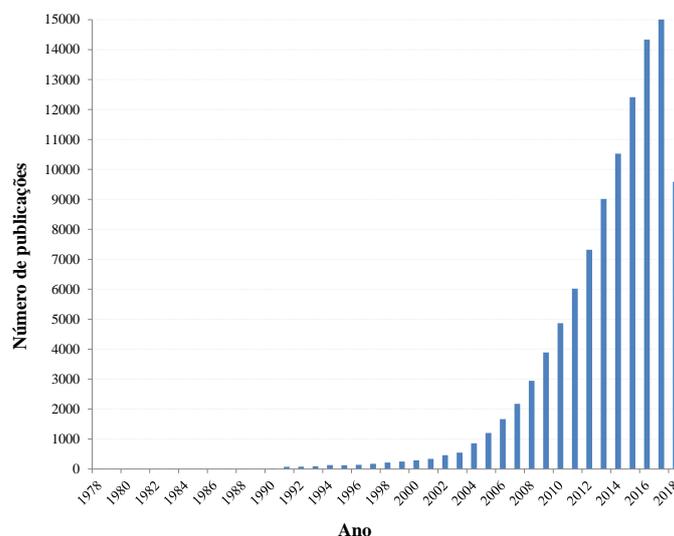


Figura 1. Histograma representativo do número de publicações por ano cruzando-se os termos *nano* and drug*. Base de dados *Web of Science*®, consultada em agosto de 2018.

Dentre os diversos sistemas nanoestruturados, as nanocápsulas poliméricas se destacam por apresentarem resultados promissores para aplicações na terapêutica⁷⁻¹⁰. Como principais vantagens desses sistemas, pode-se citar: a liberação do fármaco no organismo de forma controlada e sustentada, permitindo o direcionamento a sítios específicos¹¹, reduzindo o efeito “burst”¹², melhorando a atividade e/ou diminuindo seus efeitos colaterais^{7,13}. Diversos polímeros naturais como gelatina, alginato e albumina podem ser utilizados para preparar as nanopartículas. Porém, a difícil reprodutibilidade lote a lote quando se utiliza polímeros de origem natural é considerada uma desvantagem que poderia comprometer o sucesso desses sistemas¹⁴. Dessa forma, os polímeros sintéticos dos tipos poliésteres alifáticos são amplamente utilizados, apresentando inúmeras vantagens para este fim.

A resposta biológica desencadeada pelos sistemas nanotecnológicos para uso terapêutico e, conseqüentemente, o sucesso desses nanodispositivos, estão intrinsecamente relacionados às suas características estruturais^{8,15,16}. Além disso, a liberação da substância ativa para o sistema biológico é decorrente de fenômenos de difusão do fármaco para o meio externo, os quais ocorrem pela dissolução e/ou desintegração das nanopartículas^{17,18}. Por conseguinte, as propriedades físico-químicas do fármaco, bem como as do polímero (perfil de degradação, distribuição da massa molar, cristalinidade e hidrofobicidade) têm uma forte influência na liberação da substância ativa desses sistemas¹⁹⁻²¹.

As nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC), um tipo específico de nanocápsulas poliméricas, foram desenvolvidas por nosso grupo de pesquisa como uma plataforma promissora para ser utilizada como carreador de fármacos. Diversos estudos foram publicados comprovando a potencial aplicabilidade desses sistemas tanto no tratamento de alguns tipos de câncer^{22,23}, como em doenças inflamatórias^{15,24,25} e Alzheimer²⁶. Recentemente, resultados interessantes foram observados quanto à atividade biológica de LNC produzidas sem fármacos^{27,28} tais como efeito antioxidante²⁷ e atividade antitumoral²⁸.

O desenvolvimento da nanotecnologia estimulou a pesquisa sobre novas metodologias para a compreensão da toxicidade de nanomateriais *in vivo*, bem como da sua segurança ambiental, uma vez que essas respostas são necessárias para futuras aplicações desses sistemas. A toxicidade aguda e subcrônica das LNC *in vivo* foi avaliada por nosso grupo de pesquisa após a administração intraperitoneal e intradérmica em ratos da linhagem Wistar. Os resultados mostraram a segurança desses sistemas para ambas as

vias de administração^{29,30}. Além disso, resultados da avaliação da citotoxicidade e da genotoxicidade, associadas a absorção oral de LNC em organismos paraquáticos evidenciaram a segurança desses sistemas para a administração por via oral^{31,32}.

Apesar de diversos estudos de toxicidade *in vivo* terem sido realizados, há uma quantidade limitada de estudos sobre a toxicidade ambiental de nanopartículas poliméricas. Nesse sentido, as propriedades inerentes das partículas em nanoescala têm sido confrontadas com os procedimentos tradicionais de avaliação de risco ambiental, que avaliam contaminantes em escala maior³³. Uma vez que as nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) são constituídas majoritariamente por um polímero biodegradável (PCL), o perfil de biodegradabilidade desses sistemas no meio ambiente é um interessante tema de pesquisa.

Os ensaios de toxicidade em ambientes aquáticos são ferramentas promissoras para avaliar os efeitos de toxicidade de substâncias na água e, muitas vezes, para comparar diferentes substâncias químicas ou a resposta de sensibilidade de diferentes organismos aquáticos à mesma substância³⁴. Recomenda-se que o efeito tóxico de uma amostra seja avaliado para mais de uma espécie representativa da biota aquática, preferencialmente pertencendo a diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar³⁵⁻³⁷.

No que diz respeito a estudos de estabilidade físico-química e de degradação de poliésteres em sistemas de liberação, nas suas formas, micro- e nanoestruturada, inúmeros estudos podem ser encontrados na literatura³⁸⁻⁵⁰. Nesse sentido, diferentes parâmetros foram avaliados, tais como: propriedades do polímero (massa molar inicial, razão D,L-lactídeo (PLA, PLGA), proporção glicolato-lactato (PLGA)^{38,44} e condições de processamento e/ou armazenamento (temperatura, pH, força iônica, exposição à radiação gama, secagem das formulações)^{51,45}. Outros autores investigaram a influência da temperatura e do pH na estabilidade físico-química e na degradação *in vitro* de micro^{43,45,52} e de nanopartículas poliméricas^{39,46-49,53,54}.

Embora a estabilidade química de poliésteres em sistemas de liberação em sua forma micro e nanoestruturada tenham sido investigadas, cabe ressaltar que muitos autores atribuíram a estabilidade físico-química de sistemas de liberação apenas a parâmetros como diâmetro, pH e teor de fármaco encapsulado^{40,47,50,54}. Além disso, a influência do processo de esterilização, um parâmetro relevante quando se deseja preservar a estabilidade de sistemas de estrutura supramolecular, não foi avaliado nesses estudos. Isso pode ser atribuído ao fato de que, para muitos sistemas supramoleculares de estrutura complexa com presença de polímero, a possibilidade de esterilização, sem

provocar alterações nas características físico-químicas, tem sido considerada pela comunidade científica como algo difícil de ser realizado⁵⁵.

Nesse sentido, como principal estratégia para prevenir a degradação de sistemas de liberação frente ao armazenamento, as técnicas de secagem têm sido amplamente utilizadas⁵⁶⁻⁶⁰, uma vez que a possibilidade de se obter formulações de nanocápsulas em meio aquoso estáveis quimicamente é considerada pela maioria dos pesquisadores como algo pouco provável^{61,62}. Contudo, ao se tratar de nanocápsulas poliméricas, as quais possuem alta fragilidade do invólucro polimérico frente ao processo de liofilização, limitações relativas à essa técnica são encontradas^{59,60}. Como consequência, já foi relatado que os produtos liofilizados mostraram um aumento de tamanho de duas vezes após redispersão em água, sugerindo a ocorrência de um agrupamento de nanocápsulas⁵⁹.

Com base no exposto, não é possível estabelecer uma metodologia sistematizada para a avaliação da estabilidade de nanopartículas poliméricas, visto que as diferentes técnicas de análise, bem como as diferentes condições de armazenamento, dificultam a comparação entre os resultados obtidos. Além disso, cabe salientar, que até o momento, o fator esterilidade não foi considerado nesses estudos. Assim, a hipótese de trabalho está fundamentada na avaliação da estabilidade química e da cinética de degradação de LNC (estéreis e não estéreis), objetivando determinar o mecanismo de hidrólise predominante quando armazenadas a 5 °C. Adicionalmente, foram realizados estudos ambientais de biodegradação em solo simulado e da ecotoxicidade em três níveis tróficos, com o objetivo de investigar o impacto ambiental desses sistemas nanocarreadores.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade química e a cinética de degradação de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNC), para a determinação do seu mecanismo de hidrólise, além de investigar a sua ecotoxicidade em meio aquoso e o seu perfil de biodegradação em solo simulado.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência da composição da parede polimérica na estabilidade química das LNC preparadas com PCL de diferentes massas molares: (LNC 1 – M_n 10.000 g mol⁻¹, LNC 2 - M_n 10 e 80.000 g mol⁻¹, 9:1, m/m; LNC 3 - M_n 80.000 g mol⁻¹), frente ao armazenamento a 5 °C.

- Investigar a importância do processo de esterilização na estabilidade e na cinética de degradação das LNC armazenadas, e a partir de análises microbiológicas determinar o tipo de hidrólise (abiótica ou biótica) envolvida na degradação desses sistemas.

- Determinar o tipo de mecanismo de hidrólise predominante para as LNC estéreis e não estéreis, classificando em autocatalisado ou não catalisado.

- Avaliar a ecotoxicidade aquática das LNC utilizando três modelos diferentes de níveis tróficos: algas, microcrustáceos e peixes.

- Investigar a biodegradabilidade das LNC em sistema respirométrico de solo simulado.

3. Revisão bibliográfica

Na revisão apresentada a seguir, são discutidos princípios gerais envolvidos na temática da presente tese de doutorado. São relatados aspectos sobre nanotecnologia, bem como sua relevância e aplicações na área da saúde. São mencionadas as vantagens das nanopartículas poliméricas dentre os sistemas nanocarreadores reportados na literatura. Além disso, descreve-se uma breve revisão acerca do histórico da utilização de polímeros em sistemas de liberação e os avanços obtidos nos estudos de degradação desses compostos em sistemas micro e nano estruturados, bem como no meio ambiente.

3.1 Nanotecnologia: fundamentos e aplicações

A nanotecnologia consiste na manipulação da matéria estruturada no nível atômico e molecular, a qual permite, através da nanociência, o desenvolvimento de dispositivos, materiais funcionais e sistemas com propriedades peculiares e significativamente diferentes daquelas observadas na escala micro- ou macroscópica^{14,63,64}. A nanociência, por sua vez, está fundamentada na transversalidade relacionada a vários domínios científicos, tais como biologia, química, engenharia, entre outros. Assim sendo, pode ser considerada como uma área de convergência devido à inter-relação de todas as ciências nela envolvidas.

Em 2011, foi acordada a definição de nanomateriais pela Comissão Europeia: “Um material natural, incidental ou manufaturado contendo partículas não ligadas entre si ou em agregados formando aglomerados, nos quais a distribuição de tamanho apresenta 50% ou mais dessas partículas com uma ou mais dimensões externas no intervalo entre 1 nm e 100 nm. Em casos específicos e justificados por preocupações ambientais, saúde, segurança ou competitividade, o limiar de 50% na distribuição de tamanho pode ser substituído por um limiar entre 1% e 50%”⁶⁵.

Nanociência e nanotecnologia são aplicadas em vários setores, tais como eletrônico (fabricação de materiais de alto desempenho, condutores e semicondutores), computação avançada (dispositivos nanoeletrônicos baseados em “quantum dots”), óptica, produção de energia, medicina, agricultura e indústria alimentícia⁶⁶. Cabe ressaltar que as aplicações no setor agrícola e alimentício são relativamente recentes em comparação com a sua utilização na administração de fármacos e engenharia de tecidos na área da saúde, que podem ser consideradas como aplicações emergentes. Entrega inteligente de nutrientes, biosseparação de proteínas, amostragem rápida de

contaminantes biológicos e químicos e nanoencapsulação de nutracêuticos são alguns dos tópicos emergentes da nanotecnologia para a alimentação e a agricultura⁶⁷.

Dentre as diferentes aplicações da nanotecnologia, merecem destaque aquelas relacionadas à área biomédica, as quais vêm apresentando excelentes perspectivas, tanto para o tratamento de doenças crônicas, quanto para melhorias na saúde pública. Neste sentido, aplicações médicas potenciais são mostradas predominantemente em diagnósticos (de doenças e imagem), em melhorias de próteses, em engenharia de tecidos e no desenvolvimento de novos sistemas para a administração de fármacos^{68,69}.

3.2 Nanotecnologia em saúde: sistemas nanocarreadores

Na área da saúde, o termo nanotecnologia é definido como o uso de pequenas estruturas, de tamanho menor do que 1.000 nanômetros de diâmetro (comumente chamadas de nanocarreadores), que são projetadas a fim de apresentarem propriedades específicas. Os dispositivos em nanoescala são muitas vezes fabricados com o objetivo de imitar os nanodispositivos encontrados na natureza e incluem proteínas, DNA, membranas e outras biomoléculas naturais⁷⁰. Particularmente, nas áreas de nanotecnologia farmacêutica e de nanomedicina, objetiva-se projetar nanomedicamentos que, devido às suas características peculiares, tais como, tamanho reduzido e grande área superficial, são capazes de oferecer vantagens em relação aos seus homólogos (microparticulados) na forma convencional¹⁴. Nesse contexto, diferentes sistemas estão em desenvolvimento, visando à aplicação na terapêutica ou no diagnóstico de doenças, ou para o uso combinado dessas funções como "teranósticos", uma nova fronteira promissora nessa área de estudo⁷¹.

Dentre os diferentes tipos de nanocarreadores aplicados na terapêutica, destacam-se as nanopartículas lipídicas sólidas, os lipossomas, os dendrímeros, as micelas poliméricas e as nanopartículas poliméricas^{11,68,72,73}. Contudo, as nanopartículas poliméricas têm atraído maior atenção dos pesquisadores devido às suas potencialidades terapêuticas e à maior estabilidade físico-química em fluidos biológicos⁷⁴.

As aplicações da nanotecnologia relacionadas à terapêutica têm revolucionado as perspectivas para o tratamento de doenças crônicas. Assim, essas aplicações têm sido focadas principalmente no desenvolvimento de formulações nanotecnológicas destinadas ao tratamento do câncer, de doenças inflamatórias, cardiovasculares, neurológicas e do vírus da imunodeficiência adquirida (AIDS)¹⁴. Diversas nanopartículas estão em fases de teste clínico para o tratamento de doenças como câncer, infecção fúngica, degeneração

muscular, síndrome de imunodeficiência adquirida, diabetes, malária, tuberculose, dentre outras⁷⁵⁻⁷⁷.

O sucesso dos sistemas nanocarreadores de base nanotecnológica está relacionado às vantagens significativas que os mesmos apresentam quando comparados aos sistemas convencionais, tais como o aumento do tempo de circulação do fármaco no organismo, a capacidade de incorporar substâncias hidrofílicas e lipofílicas e a transposição de barreiras biológicas¹¹. Nesse sentido, a nanotecnologia permite a possibilidade de encapsular fármacos pouco solúveis ou insolúveis em água, melhorando seus parâmetros farmacocinéticos, além de proteger moléculas lábeis da degradação química ou enzimática, prevenir a interação com o meio biológico, reduzindo a toxicidade e melhorando a eficiência terapêutica^{75,78,79}.

Adicionalmente, esses sistemas podem ser direcionados a alvos-específicos para promover a liberação de substâncias ativas através de mecanismos de vetorização ativa ou passiva. Esses mecanismos de vetorização permitem a redução da dose de fármaco, o que também diminui seus efeitos colaterais². Nas estratégias de vetorização passiva, o fármaco, encapsulado nos nanocarreadores, pode ser acumulado (pelo efeito de permeação e retenção) em determinadas regiões do organismo, tais como tumores, cérebro e células do sistema endocítico fagocitário⁸⁰. Por sua vez, na vetorização ativa, são exploradas as interações ligante-receptor específico, ancorando os nanocarreadores às células-alvo e liberando gradativamente o fármaco².

3.2.1 Nanopartículas poliméricas carreadoras de fármacos

As nanopartículas poliméricas são transportadores coloidais de fármacos compostos de polímeros sintéticos ou naturais, podendo ser classificados, de um modo geral, como nanocápsulas (*core-shell*), as quais correspondem a uma parede polimérica envolvendo um núcleo oleoso, ou nanoesferas, constituídas por uma matriz polimérica^{13,73,81}. Nesses sistemas, o fármaco pode encontrar-se dissolvido, retido ou adsorvido na matriz polimérica, ou ainda, no caso de nanocápsulas, pode estar presente no núcleo oleoso^{13,82,83}.

Diversos polímeros naturais como quitosana, gelatina, alginato, heparina, albumina e colágeno podem ser utilizados para preparar as nanopartículas. Como vantagem dos polímeros naturais pode-se citar o baixo custo e a facilidade de biodegradação dos mesmos. Entretanto, esse tipo de polímero geralmente apresentam perfis de liberação relativamente rápidos⁸⁴. Além disso, a difícil reprodutibilidade lote a

lote quando se utiliza polímeros de origem natural é considerada uma desvantagem que poderia comprometer o sucesso desses sistemas¹⁴. Dessa forma, os polímeros sintéticos dos tipos poliésteres alifáticos, derivados dos ácidos acrílico e metacrílico ou derivados de cianoacrilato de alquila são amplamente utilizados, apresentando inúmeras vantagens para este fim.

Como principais vantagens destes sistemas, pode-se citar a proteção de substâncias ativas da degradação química, o aumento da solubilidade aparente de fármacos lipofílicos, além de uma maior estabilidade de proteínas, peptídeos e hormônios no trato gastrointestinal^{73,85,86}. Além disso, esses sistemas podem ser projetados com o objetivo de controlar a liberação e a entrega de fármacos no organismo, melhorando sua atividade e diminuindo seus efeitos colaterais^{7,13}.

Nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC), um tipo específico de nanocápsulas poliméricas, foram desenvolvidas por nosso grupo de pesquisa como um sistema carreador de fármaco com propriedades diferenciadas quando comparadas às nanocápsulas poliméricas convencionais. A sua fase interna consiste de um núcleo composto por monoestearato de sorbitano disperso em triglicerídeo dos ácidos cáprico/caprílico, envolto por PCL, e estabilizada por micelas de polissorbato 80^{87,88}. Nesse tipo de nanocápsula, o fármaco pode estar distribuído nas diferentes pseudofases do sistema (fase aquosa, parede polimérica ou núcleo lipídico), de acordo com a sua lipofilicidade (coeficiente de distribuição, log D)⁸⁹.

O modelo supramolecular das nanocápsulas foi estabelecido após estudos de análise térmica (DSC)⁹⁰ e de espalhamento de raios-x a baixo ângulo (SAXS)⁹¹. No estudo realizado por Müller e colaboradores (2001)⁹⁰ foi proposto, a partir dos resultados de análise térmica (DSC), que o monoestearato de sorbitano se encontra dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas. Por sua vez, Cruz e colaboradores (2006)⁹¹ propuseram, a partir de análise de SAXS, que o polímero encontra-se organizado nas nanocápsulas, enquanto que nas nanoesferas o monoestearato de sorbitano atua como uma impureza da poli(ϵ - caprolactona), o que afeta a cristalinidade do polímero. Esse estudo corrobora os resultados obtidos anteriormente por Müller e colaboradores (2001)⁹⁰.

No que diz respeito às características físico-químicas destes sistemas, as LNC possuem estrutura supramolecular diferenciada, devido à maior viscosidade do núcleo lipídico quando comparada a de nanocápsulas convencionais^{23,92}. Além disso, considera-se que a parede polimérica destes sistemas seria organizada de modo que o polímero estaria em contato com o óleo do núcleo lipídico e, concomitantemente, com a água da

fase externa, sendo caracterizada por uma interface núcleo-água, na qual o polímero está embebido⁷². Adicionalmente, Poletto e colaboradores (2015)⁹² observaram que a presença do monoestearato de sorbitano no núcleo, além de aumentar a capacidade de encapsulamento de fármacos em 40 vezes, reduz a espessura da camada cristalina da PCL, ocasionando sua interpenetração na parede polimérica. Como consequência, os autores propuseram que o núcleo dessas nanocápsulas seria definido como uma estrutura de organogel devido à ação de gelificação dos triglicerídeos de cadeia média pelo monoestearato de sorbitano. Comportamentos diferentes quanto à estabilidade das LNC e de nanocápsulas convencionais foram relatados em alguns estudos^{23,93,94}. Ourique e colaboradores (2010)²³, ao avaliarem a liberação da tretinoína para aplicação parenteral, em LNC e nanocápsulas convencionais (NC), observaram que a LNC aumentou a estabilidade físico-química na encapsulação do fármaco. Igualmente, estudos de penetração cutânea demonstraram diferentes comportamentos entre nanocápsulas convencionais e LNC⁹⁴. Brum e colaboradores (2015)⁹⁴, observaram que as NC atingiram a derme, enquanto que as LNC foram mantidas nas camadas mais externas da pele. O resultado foi de acordo com a flexibilidade, previamente determinada para essas nanocápsulas por Fiel e colaboradores (2011)⁹³.

O potencial dessas nanocápsulas foi comprovado em estudos de avaliação biológica de variados modelos de doenças, tais como alguns tipos de câncer^{22,23}, doenças inflamatórias^{15,24,25} e Alzheimer²⁶. Estudos recentes mostraram a atividade biológica de LNC preparadas sem adição de fármacos na formulação^{27,28}. Em um estudo realizado por Bender e colaboradores (2014)²⁷, as formulações de nanocápsulas produzidas sem fármaco mostraram efeito antioxidante em um modelo de peroxidação lipídica. Drewes e colaboradores (2016)²⁸, observaram que a cristalinidade da parede polimérica tem influência sobre a resposta biológica *in vivo*. Os resultados obtidos em um estudo pré-clínico, com um modelo de melanoma induzido em camundongos da linhagem C57BL/6, mostraram que a supraestrutura produzida sem a substância ativa (acetil eugenol) teve maior atividade e, conseqüentemente, maior toxicidade ao melanoma, diminuindo o desenvolvimento do tumor. Esse resultado pode ser atribuído à alta interação do acetil eugenol com a parede polimérica das nanocápsulas, que seria responsável pela diminuição da cristalinidade do polímero. Assim, esses resultados confirmam o potencial promissor destes sistemas, pois além de atuarem na administração de fármacos, conferem novos mecanismos terapêuticos às LNC.

3.3 Poliésteres constituintes das nanopartículas

O uso de polímeros em sistemas de liberação teve início nos anos de 1960 com a contribuição de estudos pioneiros de notáveis pesquisadores na área⁹⁵⁻¹⁰³. Poliésteres alifáticos como o PLA - poli(ácido lático)¹⁰⁴⁻¹⁰⁶, PGA - poli(ácido glicólico), PLGA - poli(ácido lático-co-ácido glicólico)¹⁰⁷⁻¹¹⁰, PCL - poli(ϵ -caprolactona)^{55,111}, copolímeros e blendas destes materiais têm sido extensivamente utilizados como principais componentes de micro e nanopartículas poliméricas, uma vez que são adequados para a entrega controlada e sustentada de fármacos e apresentam excelente biocompatibilidade^{106,112-114}.

Como característica peculiar desses polímeros, destaca-se o fato dos mesmos serem bioabsorvíveis, gerando hidroxiácidos como principais produtos de degradação e tornando-os adequados para aplicações biomédicas¹¹⁵. Contudo, quando há excesso dos produtos de degradação em um órgão ou tecido específico aliado a um fluxo de fluidos corporais menos intenso, pode ocorrer uma resposta inflamatória¹¹⁶, acarretando em aumento da toxicidade para as células¹¹⁷ e, ainda, podendo ocasionar reações osteolíticas no caso de implantes em engenharia de tecidos¹¹⁸⁻¹²⁰.

Em estudos *in vitro*, a toxicidade foi relacionada à diferença da osmolalidade, indicando que uma diminuição do pH pelo aumento do ácido lático induziu a toxicidade nas culturas celulares, quando maiores concentrações de nanopartículas poliméricas foram testadas^{117,121}. Cordewener e colaboradores (2000)¹²¹ avaliaram a citotoxicidade dos produtos de degradação de amostras de PLA utilizadas em implantes na engenharia de tecidos em culturas de fibroblastos (L929). Os resultados dos testes de liberação de enzimas citoplasmáticas (lactato desidrogenase - LDH) incubadas por 24h mostraram que o acúmulo de partículas de diâmetro maiores do que 0,22 μm afetou a permeabilidade da membrana celular e que o aumento do ácido lático causou toxicidade.

Em outro estudo, Singh e colaboradores (2013)¹¹⁷ investigaram a citotoxicidade de nanopartículas poliméricas em diferentes culturas celulares tais como: macrófagos (RAW 264.7), hepatócitos (Hep G2), epitélio renal (A498), epitélio pulmonar (A549) e neuronal (Neuro 2A). Os autores inferiram que o acúmulo de produtos de degradação do polímero levou a um aumento da osmolalidade, ocasionando a morte celular. A fim de avaliar se a morte celular estaria relacionada aos produtos de degradação das nanopartículas, o meio de cultura foi substituído regularmente (a cada 24h) durante o período de incubação (72h). Esta substituição regular do meio de cultura assegurou a

remoção de produtos de degradação de polímero, enquanto que as nanopartículas permaneceram em contato com as células. Após a incubação de 72h (substituição regular do meio de cultura), não houve morte celular, confirmando a hipótese de que as nanopartículas não são tóxicas e ressaltando a influência dos produtos de degradação polimérica na morte celular. Ainda, os dados obtidos corroboram estudos anteriores, os quais mostraram que o aumento da osmolalidade pode desencadear uma resposta inflamatória, possivelmente ativando genes relacionados ao estresse e resultando em um aumento da produção de citocinas inflamatórias¹²²⁻¹²⁴. Nessa mesma perspectiva, Brocker e colaboradores (2012)¹²² relacionaram a hiperosmolaridade ao encolhimento das células, à carbonilação de proteínas, à despolarização mitocondrial, a danos do DNA e à parada do ciclo celular, os quais tornam as células suscetíveis à apoptose.

Entretanto, através de estratégias que possibilitem o aumento da circulação dos nanomateriais no sangue evitando a rápida absorção por macrófagos, é possível contornar um problema relevante após a administração sistêmica, relacionado à acumulação de nanomateriais no fígado e no baço. Assim, estudos *in vivo* poderiam gerar resultados diferentes, uma vez que, nesse caso, os produtos de degradação podem ser excretados ou fazer parte do ciclo metabólico^{125,126}, evitando a toxicidade relacionada à alta concentração de nanopartículas e/ou de seus produtos de degradação. Nesse sentido, um estudo *in vivo* realizado por Prencipe e colaboradores (2009)¹²⁶ com diferentes tipos de nanomateriais (nanopartículas de ouro, nanotubos de carbono e nanocilindros de ouro), revestidos com polietilenoglicol (PEG), avaliou a estabilidade e o tempo de circulação sanguínea após injeção intravenosa desses nanomateriais em camundongos. Os autores afirmaram que a presença do PEG na superfície aumentou o tempo de circulação sanguínea de 5,4h para 22,1h ($t_{1/2}$), possibilitando a diminuição da absorção desses nanomateriais por macrófagos e diminuindo a toxicidade, devido ao aumento do tempo de circulação.

3.3.1 Biodegradação de polímeros

O termo "biodegradação" indica o predomínio de atividade biológica no processo de degradação. No entanto, é bem relatado na literatura que, na natureza, os fatores bióticos e abióticos podem atuar sinergicamente para decompor a matéria orgânica¹²⁷.

A biodegradabilidade de materiais poliméricos é definido como um processo no qual todos os fragmentos desse material são consumidos por microrganismos como fonte de energia e alimento. Há três componentes essenciais que estabelecem a

biodegradabilidade de um material: o material deve ser utilizado como fonte de alimento ou energia para microrganismos; é necessário que o período de tempo para a biodegradação do material seja relativamente curto; no final do processo o material deve ser totalmente consumido no meio ambiente^{128,129}. Entretanto, o tempo exigido para a biodegradação irá depender do ambiente do descarte, que poderá ser: aterro, compostagem aeróbia, digestão anaeróbica ou ambiente marinho/aquático.

Na Figura 2 está representado um fluxograma que ilustra o processo de biodegradação de polímeros.

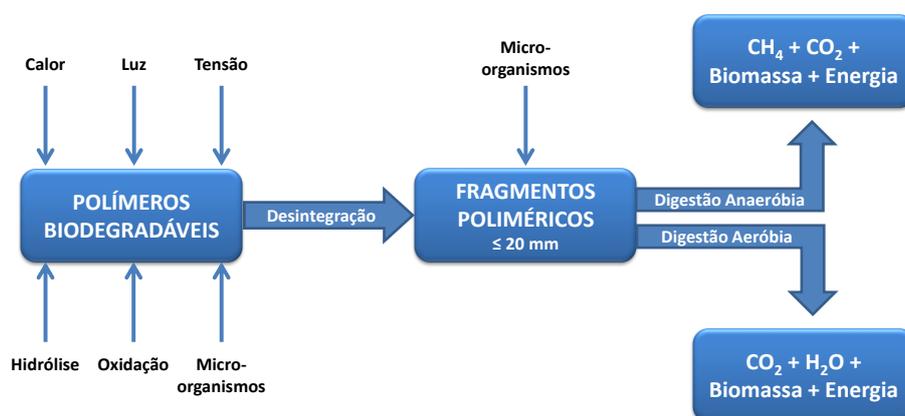


Figura 2. Esquema representativo do processo de degradação de polímeros biodegradáveis. Adaptado de: Krzan et al., 2006¹²⁸.

Conforme pode ser visualizado no fluxograma acima, o processo de biodegradação compreende duas fases principais: desintegração e mineralização. A fase de desintegração é caracterizada por modificações nas propriedades mecânicas (diminuição de resistência e flexibilidade e aumento da fragilidade), físicas (viscosidade) e químicas (clivagem de ligações e redução de M_w e M_n). Essas modificações podem ocorrer através da ação de diferentes fatores, tais como: luz, calor, tensão, hidrólise, oxidação e ação dos microrganismos. A segunda fase, de mineralização, está associada à conversão dos fragmentos gerados na fase inicial em CO_2 , água e biomassa celular, em condições aeróbias, ou, CH_4 e biomassa celular no caso de condições anaeróbias¹²⁸.

Ainda, é importante salientar que os termos biodegradáveis, bioabsorvíveis, bioelimináveis e bio-erosionáveis são frequentemente utilizados indistintamente para descrever poliésteres utilizados em aplicações biomédicas, embora o mecanismo de degradação não seja biológico e, na maioria dos casos, seja conduzido por hidrólise¹³⁰. Em um documento desenvolvido por Vert e colaboradores (2012)¹³⁰, as definições e

terminologias definidas pela IUPAC foram relatadas e as diferenças entre os termos adotados pela comunidade científica foram estabelecidas para serem utilizadas por todas as áreas e domínios da ciência. Os autores sugerem, por exemplo, que um material biodegradável pode ser dito degradável, enquanto que um polímero degradável não será necessariamente biodegradável.

Outrossim, a IUPAC definiu que o termo "biodegradável" refere-se à *“decomposição de polímeros devido a ações biológicas celulares ou in vivo”*¹³⁰ e não pode ser relacionado, por exemplo, a um estudo *in vivo*, no qual a degradação é resultante unicamente da hidrólise da água presente nos tecidos e órgãos. Nesse caso, a referência correta seria hidrólise ou degradação hidrolítica. Em nota, nesse mesmo documento, está descrito que: *"A biodegradação final é freqüentemente usada para indicar a transformação completa de compostos orgânicos em moléculas simples totalmente oxidadas ou reduzidas (como dióxido de carbono / metano, nitrato / amônio e água."* Ainda, é recomendado que o termo "biodegradável" seja utilizado apenas quando é comprovada a ocorrência do mecanismo biótico (presença de enzimas e/ou microrganismos).

3.3.2 Degradação de polímeros

O processo físico-químico de degradação dos polímeros é caracterizado pela perda progressiva das propriedades dos materiais poliméricos, tais como, aparência, resistência mecânica e integridade. Na maioria das vezes, essas modificações podem não ser observáveis no nível macroscópico, entretanto, no nível molecular, o processo de degradação pode ter sido iniciado¹³¹.

A degradação de materiais poliméricos envolve a clivagem de ligações químicas pela ação do meio ambiente em que se encontra, podendo ser abiótica ou biótica¹³². A degradação abiótica é identificada por reações de degradação térmica, mecânica e/ou química. Comumente, termos como “oxo”, “hidro”, “químico” e “foto” degradável descrevem mecanismos de degradação abióticos (não-biológicos). Por outro lado, a degradação biótica é um processo de degradação biológico pelo qual os microorganismos presentes no ambiente assimilam/utilizam substratos de carbono como alimento para seus processos vitais¹³³. Dentre os fatores que influenciam o processo de degradação, pode-se citar: o tipo de polímero e a sua estrutura, as condições ambientais e o histórico de processamento do polímero.

Degradação abiótica

A degradação abiótica é definida como o processo de degradação de um material por ações térmicas, mecânicas, termoxidativas, de fotodegradação ou químicas. Essas reações podem ocorrer de maneira isolada ou combinada^{133,134}.

O processo de degradação térmica caracteriza-se como a reação de degradação que ocorre quando o material polimérico é submetido à temperaturas superiores àquelas suportadas pelo material, as quais causam modificação na estrutura polimérica^{135,136}. A degradação termo-oxidativa ocorre através da combinação da ação de calor, de luz ou do ataque químico. O material reage com o oxigênio, ocorrendo a formação de produtos de oxidação e de dióxido de carbono. Esse tipo de degradação é caracterizada pela presença de três etapas principais: iniciação, propagação e terminação¹³⁷.

Uma vez que a maioria dos materiais são fotosensíveis, a ação da luz no processo de degradação caracteriza-se como um dos fatores mais importantes. Esse processo ocorre através da ação da energia transportada pelos fótons que pode criar estados instáveis em várias moléculas. A transferência de energia pode ser realizada por fotoionização, luminescência, fluorescência e radiação térmica¹²⁷. O mecanismo desse processo de degradação ocorre mediante reações em cadeia via radical livre, sendo caracterizada pela degradação gradativa do material exposto aos raios ultravioleta. Ainda, podem ocorrer cisões de cadeia, reações de formação de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas e ramificação das cadeias¹³⁸.

A degradação química é o processo de degradação no qual uma substância química reage com o polímero. Dentre os agentes químicos responsáveis por esse tipo de degradação, o oxigênio é o mais comum, uma vez que o simples contato do material com o ar atmosférico pode desencadear esse tipo de reação. Nesse sentido, o oxigênio (na forma de O₂ ou O₃) ataca as ligações covalentes do polímero, produzindo radicais livres. Os subprodutos formados atuarão como catalisadores nas etapas subsequentes e, eventualmente pode ocorrer a cisão de cadeia¹²⁷.

Outra maneira, pela qual os polímeros podem sofrer degradação química, é através da hidrólise¹³⁹⁻¹⁴¹. Para que ocorra a quebra da cadeia polimérica através da ação da H₂O, o polímero deve conter ligações covalentes hidrolisáveis como grupos éster, éter, anidrido, amida e assim por diante. Ainda, parâmetros como temperatura, pH e tempo podem influenciar o processo de hidrólise. Dessa forma, quando se deseja obter materiais com vida útil controlada, o *design* desses produtos depende da escolha de monômeros específicos para obter um copolímero com as características hidrofílicas desejadas^{142,143}.

Uma vez que os processos de degradação oxidativo e hidrolítico ocorrem mais facilmente em regiões com estruturas moleculares desorganizadas (domínios amorfos), as estruturas moleculares bem organizadas (maior quantidade de domínios cristalinos) evitam a difusão de O₂ e H₂O, limitando assim a degradação.

Degradação biótica

O processo de degradação biótica ocorre pela ação de microrganismos (bactérias, protozoários, algas, fungos) que transformam a matéria orgânica em água, dióxido de carbono, metano, sais e biomassa¹⁴⁴. Os microrganismos podem atuar por meios mecânicos, químicos e/ou enzimáticos¹⁴⁵. O desenvolvimento microbiano é influenciado pela constituição e pelas propriedades dos materiais poliméricos e as condições ambientais, como por exemplo, a umidade, o clima e os poluentes atmosféricos também são parâmetros importantes¹⁴⁶.

A degradação biótica é também chamada de biodegradação, podendo ocorrer em condições aeróbias (presença de oxigênio) ou anaeróbias (ausência de oxigênio)¹²⁷.

3.3.2.1 Degradação e Biodegradação de poliésteres constituintes das nanopartículas

Avanços importantes quanto à hidrólise de poliésteres alifáticos têm sido relatados¹⁴⁷⁻¹⁵⁴. A degradação dos poliésteres alifáticos ocorre na presença de água provocando a hidrólise das ligações éster. PLA, PCL, bem como, PPC (poli [propileno carbonato]) têm uma lenta degradabilidade em condições neutras e eles mostram uma maior degradabilidade em condições básicas do que em condições ácidas¹⁵⁵. Nesse sentido, os mecanismos de hidrólise desses materiais foram extensivamente investigados e se estabeleceu que a degradação ocorre em dois estágios. O primeiro estágio da hidrólise se caracteriza pela difusão da água pela região amorfa (quebra das ligações ésteres pela água que atua como nucleófilo), enquanto que o segundo estágio de degradação somente se inicia quando a maior parte da região amorfa é degradada^{147,156,157}. No segundo estágio, o mecanismo de hidrólise predominante é do tipo autocatalisado, uma vez que o ataque ao grupamento éster pela água gera grupos terminais carboxílicos, os quais irão atuar como catalisadores na degradação do restante da cadeia polimérica.

Na Figura 3 está representado de forma esquemática o mecanismo de hidrólise do poliéster alifático - poli(ϵ -caprolactona) (PCL), utilizada como polímero constituinte das

LNC investigadas nesse estudo, cujo principal produto de degradação é o ácido-6-hidróxihexanóico.

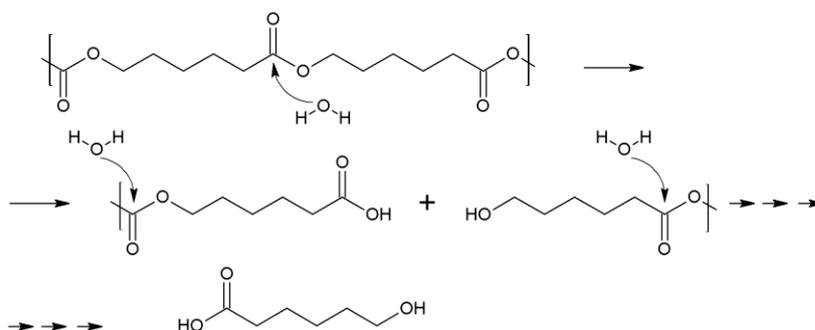


Figura 3. Mecanismo de hidrólise da poli(ϵ -caprolactona)-(PCL). Adaptado de Höglund et al., 2007.

Diversos autores estudaram a degradação de poliésteres em sua forma macroscópica *in vivo*¹⁵⁸⁻¹⁶¹, *in vitro*¹⁶²⁻¹⁶⁴ e no meio ambiente¹⁶⁵⁻¹⁶⁹. Nesse sentido, Pitt e colaboradores (1981)¹⁵⁸ investigaram a degradação *in vivo* de duas diferentes formas macroscópicas de PCL ($M_w = 55.000 \text{ g mol}^{-1}$): filmes (2 cm x 1 cm x 0,01 cm) e cápsulas (~2 cm de comprimento e espessuras variáveis), as quais foram implantadas subcutâneamente em coelhos da linhagem *New Zealand*. Os resultados mostraram que não ocorreu perda de massa para ambas as estruturas em até 80 semanas.

Em outro estudo, Sun e colaboradores (2006)¹⁷⁰ também avaliaram a degradação de cápsulas de PCL ($M_w = 66.000 \text{ g mol}^{-1}$), com cerca de 2,3 cm de comprimento, implantadas em ratos da linhagem *Wistar*. Após 24 meses, os materiais implantados estavam intactos e não se verificou perda de massa. Ainda, um marcador radioativo (Tritio) foi utilizado para investigar a absorção e excreção das cápsulas de PCL. A presença do marcador radioativo foi verificada no plasma somente 15 dias após a implantação dos materiais, sendo que em até 135 dias, cerca de 92% do marcador foi detectado nas fezes e urina dos animais.

Chu (1981)¹⁵⁷ avaliou a resistência à degradação de suturas de PGA *in vitro*, em diferentes pHs (5,24; 7,44 e 10,09) e concluiu que a taxa de degradação foi maior em pH = 10,09, quando comparado aos outros dois tampões de pH mais baixos (5,24 e 7,44). Após 21 dias, nenhum vestígio das suturas foi detectado no pH = 10,09, enquanto que cerca de 20% das estruturas ainda permaneceram nos tampões de pH = 7,44 e 5,25. Höglund, Hakkarainen e Albertsson (2007)¹⁷¹, investigaram a influência da forma

macroscópica da PCL (discos lineares e estrutura porosa) na cinética de degradação *in vitro* (pH=7,4; 37 °C) durante 364 dias. Foi observado uma maior taxa de degradação para os discos lineares (70% de perda de massa), quando comparada às estruturas porosas (30% de perda de massa) para o mesmo período avaliado (364 dias).

Doi e colaboradores (1996)¹⁶⁸ avaliaram a biodegradabilidade de amostras de poliésteres quimiossintetizados e biossintetizados (por bactérias), a 25 °C, sob condições aeróbicas em água natural do rio Arakawa (Japão). Foram monitoradas as mudanças na demanda bioquímica de oxigênio (DBO), perda de massa (erosão) dos filmes de poliésteres e concentração de carbono orgânico dissolvido (COD). Os poliésteres biossintetizados mostraram uma maior taxa de degradação quando comparados aos quimiossintetizados, sendo que a perda de massa e a DBO da maioria dos poliésteres biossintéticos, após 28 dias, foram de 100% e 80% ± 5%, respectivamente. Em contraste, a biodegradação dos poliésteres quimiossintetizados foi dependente da estrutura química e diminuiu na seguinte ordem: poli (etileno)Succinato) > poli(ε-caprolactona) > poli(adipato de etileno) > poli(butileno) Adipato > poli(sebacato de butileno) > poli(sebacato de etileno) = poli(butileno) Succinato = poli(succinato de hexileno) = poli(ε propiolactona). Contudo, cabe salientar que, para os filmes de PCL ($M_n = 67.000 \text{ g mol}^{-1}$), a perda de massa e a DBO, após 28 dias, foram de 100 e 75%, respectivamente.

Em um estudo desenvolvido por Hakkarainem e colaboradores (2000)¹⁶⁶, foi comprovado que a presença de uma cultura mista de microrganismos foi responsável por reduzir filmes de PLLA a um pó fino após 5 semanas de compostagem, enquanto que, na ausência de fatores bióticos, mesmo após 5 semanas, as amostras de PLLA permaneceram intactas. Os autores propuseram que, devido à rápida diminuição da massa molar observada para as amostras em meio biótico, a hidrólise estaria ocorrendo nos terminais de cadeia, enquanto que, em meio abiótico, teria ocorrido hidrólise aleatória das ligações éster, caracterizada pela menor perda de massa.

Em outro estudo, Torres e colaboradores (1996)¹⁷², investigaram a degradação de moldes de PDLLA em uma cultura mista de *Fusarium moniliforme* e *Pseudomonas putida* a 30 °C e observaram que, inicialmente, ocorreu hidrólise química e que os microrganismos atuaram somente após a quebra das cadeias, sendo responsáveis apenas pela bioassimilação dos sub produtos formados.

Alguns autores também investigaram a degradação de diferentes poliésteres na forma de micropartículas *in vitro* e *in vivo*^{38,163,173-177}. Visscher e colaboradores (1985)¹⁷⁶ investigaram a influência do tamanho de microcápsulas de PLGA na taxa de degradação

in vitro e *in vivo*. As microcápsulas foram injetadas no músculo gastrocnêmio de ratos (linhagem *Batleboro*) e foram avaliadas até 70 dias. As microcápsulas de maior tamanho (130 μm) exibiram uma tendência ligeiramente maior de sofrer degradação *in vivo* e *in vitro* em relação aos outros grupos (30 e 79 μm). Ainda, foi observada uma resposta mínima do tecido, caracterizada por uma reação inflamatória aguda local. Os autores constataram que as microcápsulas foram absorvidas pelas células do tecido conjuntivo e do corpo estranho com cerca de 20-30 dias após a injeção, sendo que apenas os vestígios das microcápsulas foram encontrados após 70 dias.

Yamaguchi e Anderson (1993)¹⁷³ avaliaram a biocompatibilidade e a degradação de microesferas de PLGA (lactídeo/glicolídeo 65/35) *in vivo*. Para caracterizar a resposta do tecido aos implantes degradáveis, foram determinadas as reações no local implantado e também os tipos de células na interface microesfera/tecido. Ao longo de um período de implantação de 150 dias, observaram-se inflamações leves e cicatrização sem ferimentos. Na interface microesfera/tecido, os tipos de células observadas eram macrófagos e fibroblastos, sendo os macrófagos predominantes nos primeiros 15 dias. Os autores afirmaram que, após 150 dias, a grande maioria das microesferas foi completamente degradada, a resposta inflamatória foi mínima e nenhuma reação tecidual adversa foi observada.

A fagocitose por macrófagos de microesferas constituídas de diferentes polímeros (poliestireno, celulose e poliésteres) foi investigada por Tabata e colaboradores¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Em um desses estudos, Tabata e Ikada (1988)¹⁸¹ avaliaram a fagocitose de microesferas (<2 μm) produzidas a partir de homopolímeros de ácido L-láctico, ácido DL-ácido láctico ou ácido glicólico, com diferentes massas molares, composições de monômeros e revestimentos. A fagocitose por macrófagos peritoneais de camundongos foi investigada a partir da marcação fluorescente das microesferas. Não foi observada influência da natureza química dos polímeros na fagocitose das microesferas. No entanto, o pré-revestimento dessas estruturas com albumina de soro bovino e macromoléculas não proteicas reduziu a fagocitose das microesferas, enquanto que o revestimento com a γ -globulina bovina, fibronectina humana, tuftsin bovina e gelatina aumentaram a fagocitose. A observação microscópica indicou que as microesferas fagocitadas foram gradualmente degradadas no interior dos macrófagos, levando à liberação do corante fluorescente encapsulado. Contudo, somente a liberação do corante foi atribuída à degradação e nenhum resultado de perda de massa foi mostrado.

Da mesma forma, a poli(ϵ -caprolactona) (PCL), em sua forma macroscópica, mostrou ser biodegradável em culturas de fungos¹⁸²⁻¹⁸⁶, compostagem¹⁸⁷, lodo ativado¹⁶⁷ e em diferentes tipos de solos^{168,169,188}. Nesse sentido, estudos prévios relataram que filmes de PCL são biodegradáveis em culturas fúngicas puras^{183,184}, mistura de culturas de fungos¹⁸⁵, de bactérias e de leveduras¹⁸⁶. Benedict e colaboradores (1983) realizaram dois estudos comparando a degradação de filmes de PCL em culturas de fungos¹⁸⁵ e em cultura mista de bactérias e de leveduras¹⁸⁶. Os autores afirmaram que a bactéria gram negativa *Cryptococcus laurenti* foi responsável pelas menores taxas de degradação para filmes de PCL de maior massa molar quando comparada à cultura de fungos.

Conforme descrito anteriormente, a degradação da PCL em sua forma macroscópica também foi estudada *in vivo*, em aplicações biomédicas^{147,160,161}. Entretanto, apenas um estudo acerca da degradação *in vitro* de micropartículas de PCL foi realizado¹⁸⁹. No item a seguir, são descritos estudos acerca da estabilidade química e degradação de sistemas de liberação nas formas micro e nanoestruturadas.

3.3.3 Estudos de estabilidade química de poliésteres em sistemas de liberação (micro e nanoestruturas)

No que diz respeito a estudos de estabilidade físico-química e de degradação de poliésteres em sistemas de liberação, inúmeros estudos podem ser encontrados na literatura³⁸⁻⁵⁰ (Tabelas 1 e 2). Nesse sentido, diferentes parâmetros foram avaliados, tais como: propriedades do polímero (massa molar inicial, razão D/L-lactídeo (PLA, PLGA), proporção glicolato-lactato (PLGA) e condições de processamento e/ou armazenamento (temperatura, pH, força iônica, exposição à radiação gama, secagem das formulações).

Blanco e colaboradores (2006)⁴⁴ investigaram a degradação *in vitro* (37 °C; pH = 7,4) de microesferas poliméricas de PLGA e PLA, e observaram que o valor da constante de velocidade diminuiu com o aumento da fração de ácido lático frente ao ácido glicólico. Os resultados de perda de massa mostraram que em até 2 meses cerca de 94% e 37% de perda de massa ocorreu para as microesferas de PLGA 50.50 ($M_w = 38.800 \text{ g mol}^{-1}$) e PLGA 75.25 ($M_w = 65.400 \text{ g mol}^{-1}$), respectivamente. Por sua vez, para as microesferas de PLA ($M_w = 42.600 \text{ g mol}^{-1}$), não foi observada perda de massa significativa (12%).

Spenlehauer e colaboradores (1989)³⁸ também avaliaram a influência da proporção de lactato/glicolato e da esterilização por radiação gama na degradação *in vitro* (37 °C; pH = 7,4) e *in vivo* de microesferas de PLA e PLGA. A maior proporção de lactato

em relação ao glicolato aumentou a estabilidade *in vitro*. Para as microesferas de PLA37.5GA25 ($M_w = 100.000 \text{ g mol}^{-1}$), cerca de 80% de perda de massa foi observada após 12 semanas. Ainda, a esterilização por radiação gama ocasionou cerca de 40% de perda de massa para todos os sistemas avaliados.

Outros autores investigaram a influência da temperatura e do pH na estabilidade físico-química e na degradação *in vitro* de micropartículas^{43,45,52} (Tabela 1) e de nanopartículas poliméricas^{39,46-49,53,54} (Tabela 2). Chen e colaboradores (2000)⁵² avaliaram a degradação de micropartículas de PCL (M_w inicial não mostrado) em meio *in vitro* simulado (37 °C; pH = 4,7 e 7,4 com e sem lipase), por 7 semanas. Os resultados mostraram valores de perda de massa de 1,84% (com lipase) e 1,6% (sem lipase), em pH = 7,4, enquanto que em pH = 4,7 a perda de massa foi de 27,6% (com lipase) e 15% (sem lipase). Por outro lado, Zolnik e Burgess (2007)⁴⁵, avaliaram a degradação *in vitro* (37 °C; 1 mês) de microesferas de PLGA ($M_w = 25.000 \text{ g mol}^{-1}$), e constataram uma maior perda de massa em pH = 2,4 (>90%) do que em pH = 7,4 (~80%).

Coffin e MCGivinity (1992)³⁹ avaliaram a estabilidade química de nanopartículas do tipo pseudolatex, de PLA e PCL ($M_w = 108.000 \text{ g mol}^{-1}$), em meio aquoso em diferentes temperaturas (5, 25 e 37 °C) e pH's (1,65; 3,1 e 5,1), com o uso de surfactantes não iônico e aniônico. O surfactante não iônico aumentou a estabilidade das formulações e, quando as dispersões foram armazenadas durante 350 dias a 5 °C, foram observadas poucas alterações na massa molar (M_w) de ambos os polímeros. Por outro lado, em 25 °C os pseudolatex de PLA e PCL diminuíram seu M_w para 90.000 g mol^{-1} e 48.000 g mol^{-1} , respectivamente (8 meses de armazenamento). Esse resultado foi considerado inédito, uma vez que a PCL é conhecida por ser mais estável do que o PLA em meio aquoso. Os autores justificaram que o uso do surfactante não iônico pode ter aumentado a porcentagem de regiões amorfas na PCL, fazendo com que a estabilidade fosse diminuída. A 37 °C houve degradação rápida de ambos os polímeros, sendo que o M_w diminuiu para 77.000 g mol^{-1} e 66.000 g mol^{-1} , para os pseudolatex de PLA e PCL, respectivamente. Quando os autores avaliaram a influência do pH na estabilidade, foi observado que nos pHs de 3 e 5 as formulações foram mais estáveis (5 °C).

Belbella e colaboradores (1996)⁴⁶, ao estudarem a estabilidade de nanoesferas de PLA ($M_w = 30.000 \text{ g mol}^{-1}$ e 85.000 g mol^{-1}), demonstraram a influência do pH e da temperatura na estabilidade química destes sistemas em meio aquoso. Os parâmetros avaliados neste estudo foram a massa molar, a quantificação da produção de ácido lático (produto de degradação) e o tamanho das nanopartículas. Com base nos resultados de

quantificação de ácido lático, a situação definida como ideal pelos autores foi o armazenamento a 4 °C em pH neutro (5,5 a 7). Entretanto, para essa situação, os perfis de distribuição de massa molar do PLA não foram mostrados.

Em outro estudo, Lemoine e colaboradores (1996)⁴⁹ também investigaram a influência da temperatura na estabilidade química de nanopartículas de PCL ($M_w = 78.000 \text{ g mol}^{-1}$ e $29.400 \text{ g mol}^{-1}$), PLA ($M_w = 50.000 \text{ g mol}^{-1}$) e PLA37.5GA25 ($M_w = 96.800 \text{ g mol}^{-1}$). O decréscimo na massa molar da PCL ($M_w = 78.000 \text{ g mol}^{-1}$) para as formulações armazenadas a 4 °C ou à temperatura ambiente foi de cerca de 12% após 6 meses, enquanto que para as mesmas formulações armazenadas a 37 °C a taxa de degradação foi de 63%. Após 1 ano de armazenamento (temperatura ambiente), as perdas de massa para as formulações de PCL, PLA50, PLA37.5GA25 e PLA25GA50 foram iguais a 35, 26, 67 e 100%, respectivamente. Embora esses resultados indiquem a ocorrência de perda de massa significativa para as formulações armazenadas à temperatura ambiente, os autores afirmaram que as formulações de PCL e de PLA poderiam ser mantidas por até 1 ano nessas condições, ou a 4 °C.

Calvo e colaboradores (1996)⁴⁸, investigaram a degradação de nanocápsulas (NC) (núcleo oleoso - Migliol®), de nanoesferas (NS) e da nanoemulsão (NE) de PCL ($M_w = 40.000 \text{ g mol}^{-1}$), quando armazenadas a temperatura ambiente (ver Tabela 2). Foi verificada a redução do pH em função do tempo de armazenamento, sendo que o pH inicial, com valores entre 5 e 5,5, diminuiu para valores entre 3 e 3,3, após 180 dias. Esses resultados foram atribuídos, inicialmente, à hidrólise dos triglicerídeos que compõem o Migliol® e dos fosfolípídeos utilizados como tensoativos, os quais geram ácidos graxos livres em solução. O declínio dos valores de pH também foi atribuído à formação do ácido 6- hidróxilhexanóico, principal produto de degradação da PCL. Os resultados obtidos por cromatografia de exclusão de tamanho corroboram os dados de pH, mostrando que, em até 2 meses de armazenamento, não foi observada alteração dos perfis de distribuição de massa molar da PCL. Entretanto, valores de perda de massa não foram calculados. Embora tenha ocorrido degradação das nanopartículas, o diâmetro médio das NC e NS foi mantido, o que demonstra que avaliar apenas os parâmetros de diâmetro não é suficiente quando se deseja investigar a estabilidade de sistemas nanoestruturados.

Nas Tabelas 1 e 2 são mostradas algumas das principais contribuições relatadas na literatura acerca da estabilidade físico-química de poliésteres em sistemas de liberação nas suas formas micro e nanoparticuladas.

Tabela 1. Principais contribuições na literatura acerca da estabilidade físico-química de poliésteres em sistemas de liberação em sua forma microparticulada.

Sistema de liberação/ método de preparação	Polímero/outras constituintes	Armazenamento/tempo	Técnica/análise	Resultados (perda de massa)	Referência
Microesferas; evaporação de solvente	PLA 50 ($M_w = 54.000$); PLA45.GA10 ($M_w = 58.000$); PLA37.5GA25 ($M_w = 72.000$ e 100.000); diclorometano; metilcelulose; álcool polivinílico (PVA); água	37 °C; pH 7,2; radiação λ ; 9 meses	SEC	Esterilização por radiação - 40% de perda de massa para todos os polímeros; tempo necessário para que o M_w diminuísse para 10.000: PLA50 = 7 meses; PLA45.GA10 = 3 meses; PLA37.5GA25 (100.000) = 2 meses e PLA37.5GA25 (72.000) = 1 mês	Spenlehauer et al., 1989 ³⁸
Microesferas; dupla emulsão (água/óleo/água); liofilizadas	PLG ($M_w = 16.000$) e ABA triblocos ($M_w = 26.000$) (PLG + PEO); diclorometano; álcool polivinílico (PVA); água	37 °C; pH 2, 7,4 e 9; 1 mês	SEC, difração de laser, RMN	Maior perda de massa em pH 9. PLG = 17% de perda de massa; ABA triblocos = 64% de perda de massa.	Bittner et al., 1999 ⁴³
Micropartículas; emulsificação; secas “freeze-drying”	PCL (M_w inicial não mostrado); diclorometano; surfactante (Tween 60); água	37 °C; pH 4,7 e 7,4 com e sem lipase; 7 semanas	SEC	Perda de massa em pH 7,4 = 1,84% (com lipase) e 1,6% (sem lipase). Em pH 4,7 = 27,6% (com lipase) e 15% (sem lipase) em 7 semanas.	Chen et al., 2000 ¹⁸⁹
Microesferas; secas por “spray-drying”	PLA ($M_w = 42.600$), PLGA50.50 ($M_w = 38.800$); PLGA75.25 ($M_w = 65.400$) diclorometano	37 °C; pH 7,4; 2 meses	SEC, DSC	Perda de massa (2 meses) - PLGA 50.50 = 94%; PLGA 75.25 = 37%; PLA = 12%. Microesferas de PLA (5 meses) (25%) não foi considerada significativa.	Blanco et al., 2006 ⁴⁴
Microesferas; filtradas (0,45 μ m) secas	PLGA ($M_w = 25.000$); diclorometano; álcool (PVA)	37 °C; pH 7,4 e 4,2; 1 mês	SEC, DSC	Perda de massa em pH 7,4 = ~80% e em pH 2,4 = >90%.	Zolnik; Burgess, 2007 ⁴⁵

Tabela 2. Principais contribuições na literatura acerca da estabilidade físico-química de poliésteres em sistemas de liberação em sua forma nanoparticulada.

Sistema de liberação/ método de preparação	Polímero/outros constituintes	Armazenamento/ tempo	Técnica/análise	Resultados (perda de massa)	Referência
Pseudolatex (nanopartículas); microfluidização de emulsão óleo/água e evaporação do solvente	PCL e PLA ($M_w = 108.000 \text{ g mol}^{-1}$); cloreto de metila:acetato de etila (50:50); surfactantes: não iônicos (PS 20 e Pluronic 68); aniônicos (oleato de potássio e dodecil sulfato de sódio); água	5, 25 e 37 °C; pH = 1,65; 3,1 e 5,1; 12 meses	SEC (M_w), DSC, espalhamento de luz dinâmico (diâmetro médio), medidas de pH	Para as dispersões de PLA50 e PCL em surfactante não iônico – estabilidade de até 350 dias a 5 °C. As dispersões de PCL diminuíram o M_w de 108.000 para 45.000 g mol^{-1} a 25 °C, enquanto que para o PLA, o M_w foi de 90.000 g mol^{-1} , no mesmo período de tempo analisado (8 meses).	Coffin; e McGinity, 1992 ³⁹
Nanopartículas (primaquina encapsulada); nanoprecipitação	PLA ($M_w = 88.000 \text{ g mol}^{-1}$); fosfolipídios (Epicuron 170); acetona; poloxamer (F68); água	Diferentes pHs; 4 °C; 3 meses	pH; HPLC (teor do fármaco durante o armazenamento)	Autores definiram estabilidade das nanopartículas devido aos diâmetros e encapsulação do fármaco serem mantidos	Rodrigues et al., 1995 ⁴⁷
Nanoesferas; precipitação de polímero pré-formado	PLA ($M_w = 30.000$ e $85.000 \text{ g mol}^{-1}$); acetona; surfactante dodecil sulfato de sódio; água	-18, 4 e 37 °C; diferentes pHs; até 30 dias em meio aquoso	SEC, HPLC (quantificação de ácido láctico)	Define como situação ideal de armazenamento 4 °C (pH neutro). Dados de SEC e valores de massa molar em função do tempo, para a situação ideal (4 °C), não foram mostrados.	Belbella et al., 1996 ⁴⁶
Nanopartículas; nanoprecipitação	PLA ($M_w = 200.000 \text{ g mol}^{-1}$); acetona; fosfolipídios (lipoid S75); poloxamer (188); água	4 °C; 9 meses	Espalhamento de luz dinâmico (diâmetro), medidas de pH e análise morfológica	Medidas de estabilidade por análises de diâmetro e pH. Estabilidade definida devido à ausência de agregação e/ou precipitação (suspensão monodispersa) em 9 meses de armazenamento a 4 °C.	Paul et al., 1997 ⁵⁰

Nanopartículas	PLGA, PEO-PLGA, PDLLA; acetona; álcool polivinílico (PVA); água	37 °C; pH 7,4	Espalhamento de luz dinâmico (diâmetro), HPLC (quantificação dos ácidos formados da degradação); SEC	A degradação completa de nanopartículas de PLGA e PEO-PLGA, ocorreu em 10 e 8 semanas, respectivamente. PDLLA em até 2 anos (a partir de resultados de diâmetro). SEC utilizado para determinar perfil bimodal ou unimodal. Não calculou perda de massa por M_w , somente valores de M_n mostrados. Quantificou ácidos láctico e glicólico.	Zweers, et al., 2004 ⁴⁰
Nanopartículas; evaporação de solvente; liofilização	PLGA 50:50 ($M_w = 44.000 \text{ g mol}^{-1}$); diclorometano; álcool polivinílico (PVA); acetona; água	Degradação <i>in vivo</i> (administração intravenosa em ratos); 3h, 1 dia, 3 e 7 dias.	SEC; perda de massa das nanopartículas extraídas dos tecidos de fígado, baço e pulmões.	60% de perda de massa para ambos os tecidos avaliados após 7 dias.	Mohammad; Reineke, 2013 ⁴¹
Nanopartículas; evaporação de solvente	PCL ($M_w = 78.000$ e $29.400 \text{ g mol}^{-1}$); PLA 50 e PLA37.5GA25 ($M_w = 96.800 \text{ g mol}^{-1}$); acetona; surfactante F68®; água	-16, 4, 37 °C e temperatura ambiente; até 1 ano em meio aquoso	SEC, DSC, difração de laser (diâmetro e potencial <i>zeta</i>)	Perda de massa: PCL = 35%; PLA50 = 26%, PLA37.5GA25 = 67% e PLA25.GA50 = 100% em meio aquoso (temperatura ambiente), após 1 ano; temperatura de armazenamento ideal para nanopartículas de PCL por até 1 ano = 4 °C.	Lemoine et al., 1996 ⁴⁹
Nanopartículas, nanocápsulas e nanoemulsão; deposição interfacial e emulsificação	PCL ($M_w = 40.000 \text{ g mol}^{-1}$); acetona; fosfolipídios (lecitina de soja e fosfatidilcolina); (Migliol 840); (poloxamer 188); água	Temperatura ambiente; 6 meses	SEC, difração de laser (diâmetro e potencial <i>zeta</i>) e medidas de pH	Diminuição de pH (relacionada à hidrólise). Resultados de SEC mostraram que em até 2 meses não há modificações significativas nos perfis de distribuição de massa molar da PCL, porém foi observada degradação em 6 meses (cálculos de perda de massa não mostrados).	Calvo et al., 1996 ⁴⁸
Nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNC); método do polímero pré-formado	PCL ($M_w = 80.000 \text{ g mol}^{-1}$);	4 e 25 °C; 90 dias	Espalhamento de luz dinâmico (diâmetro médio); PDI; pH; cor; HPLC (teor do fármaco durante o armazenamento)	Após 60 dias de armazenamento (4 °C), não houve alterações de diâmetro e cor das formulações; o teor residual de luteína foi de 36% em relação ao valor inicial. A 25 °C: alterações no potencial <i>zeta</i> , pH e teor de luteína.	Brum et al., 2017 ⁵⁴

Diante do exposto, pode ser observado que a estabilidade química de poliésteres em sistemas de liberação em sua forma micro e nanoestruturada foi investigada e que diversos estudos consideraram a perda de massa desses sistemas acerca da degradação dos polímeros constituintes. Porém, cabe ressaltar que muitos autores atribuíram a estabilidade de sistemas de liberação apenas a parâmetros como diâmetro, pH e teor de fármaco encapsulado^{40,47,50,54} (Tabela 2). Além disso, fatores como o método de preparação, as propriedades do polímero (massa molar inicial, razão D, L-lactídeo (PLA, PLGA), a proporção glicolato-lactato (PLGA), bem como as condições de processamento e/ou armazenamento (temperatura, pH, força iônica, exposição à radiação gama, secagem das formulações) podem diferir de um estudo para outro, o que dificulta a comparação entre os resultados obtidos.

Outro desafio está fundamentado no fato de não haver um consenso quanto a métodos de separação dos polímeros para avaliação da cinética de degradação desses sistemas, sendo que, na maioria dos estudos relatados, apenas a perda de massa relacionada aos valores de massa molar ponderal média (M_w) foi avaliada. No caso específico das LNC, não há estudos de estabilidade que considerem análises de perda de massa. Por conseguinte, a influência do processo de esterilização, um parâmetro relevante quando se deseja preservar a estabilidade de sistemas de estrutura supramolecular, não foi avaliado nesses estudos. Isso pode ser atribuído ao fato de que, para muitos sistemas supramoleculares de estrutura complexa com presença de polímero, a possibilidade de esterilização, sem provocar alterações nas características físico-químicas destes sistemas, tem sido considerada pela comunidade científica como algo difícil de ser realizado⁵⁵.

Nesse sentido, como principal estratégia para prevenir a degradação de sistemas de liberação frente ao armazenamento, as técnicas de secagem têm sido amplamente utilizadas⁵⁶⁻⁶⁰ uma vez que a possibilidade de se obter formulações de nanocápsulas em meio aquoso estáveis quimicamente é considerada pela maioria dos pesquisadores como algo pouco provável^{61,62}. Contudo, ao se tratar de nanocápsulas poliméricas, muitas limitações relativas à técnica de secagem dessas formulações são encontradas, sendo necessário o uso de agentes crioprotetores ou de secagem. Dentre as limitações relatadas, a maioria está relacionada à alta fragilidade do invólucro polimérico frente ao processo de liofilização^{59,60}. Como consequência, já foi relatado que os produtos liofilizados mostraram um aumento de tamanho de duas vezes após redispersão em água, sugerindo a ocorrência de um agrupamento de nanocápsulas⁵⁹.

Do mesmo modo, Schaffazick e colaboradores (2003)⁶⁰ liofilizaram nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) e Eudragit® após a adição de dióxido de silício. No entanto, tal adição limita a administração intravenosa dos pós de nanocápsulas.

Com base no exposto, não é possível estabelecer uma metodologia sistematizada para a avaliação da estabilidade de nanopartículas poliméricas, visto que os diferentes métodos de separação utilizados, as diferentes técnicas de análises, bem como as diferentes condições de armazenamento, dificultam a comparação entre os resultados obtidos. Além disso, cabe salientar, que até o momento, o fator esterilidade não foi considerado nesses estudos, sendo necessária a investigação da influência da presença de microrganismos na cinética de degradação em meio aquoso. Assim, a hipótese de trabalho está fundamentada na avaliação da estabilidade química e da cinética de degradação de LNC em meio aquoso (estéreis e não estéreis), objetivando determinar o mecanismo de hidrólise predominante quando armazenadas a 5 °C.

3.4 Nanotecnologia e meio ambiente

O desenvolvimento exponencial da nanotecnologia estimulou, recentemente, a pesquisa sobre novas metodologias para a compreensão da toxicidade de nanomateriais *in vivo*, bem como da sua segurança ambiental, uma vez que essas respostas são necessárias para futuras aplicações desses sistemas. O interesse nessa área de pesquisa, conhecida como nanotoxicologia, pode ser explicado pela inexistência de informações acerca da avaliação dos riscos associados à exposição aos nanomateriais, a qual não acompanhou os avanços da nanotecnologia^{190,191}. Segundo um documento publicado pelo *Official Journal of the European Union*, essa lacuna existe porque a pesquisa científica não produziu dados adequados para avaliar também os efeitos desses produtos com a mesma velocidade com que avançaram as pesquisas no campo de desenvolvimento de novos nanomateriais e de aplicações dos mesmos⁶⁵.

Atualmente, não há testes de toxicidade internacionalmente aceitos ou protocolos validados disponíveis para avaliação de segurança de nanomateriais¹⁹². Nesse sentido, como uma iniciativa nessa área de conhecimento, pode-se citar o projeto NANoREG, que visa a regulamentação referente à segurança dos nanomateriais a partir do desenvolvimento de métodos confiáveis, reprodutíveis e relevantes para testar e avaliar os efeitos dos nanomateriais sobre saúde humana e meio ambiente em um contexto regulatório. Esse projeto foi uma colaboração de mais de 85 parceiros institucionais de

Estados membros da União Europeia, Estados associados, a República da Coreia e o Brasil e teve duração de 48 meses, encerrando-se em 28 de fevereiro de 2017 com um investimento aproximado de 50 milhões de euros¹⁹³.

O NANoREG analisou os resultados de pesquisas existentes na área de segurança e toxicidade de nanomateriais e assegurou quanto à necessidade de uma validação para fins de regulamentação. Dentre as diversas finalidades que motivaram a realização desse projeto, pode-se citar: a obtenção de instrumentos para a caracterização de riscos, teste de toxicidade e medidas de exposição, além de propor uma metodologia eficaz e prática do gerenciamento de riscos com nanomateriais e produtos contendo estes materiais.

Dentre os estudos desenvolvidos pelo NANoREG, foi realizada uma análise científica para responder a um conjunto de perguntas sobre o uso seguro de nanomateriais¹⁹⁴. Como resultado dessa análise, foi concluído que a maioria das lacunas de dados estão relacionados às diferentes características dos nanomateriais avaliados (por exemplo, tamanho, área superficial, química da superfície, solubilidade, forma), aos diferentes métodos utilizados para determinar essas características e às diferentes estratégias e abordagens de avaliação de risco, específicas para cada nanomaterial. Diante disso, fica evidente a necessidade de pesquisas aprofundadas e relacionadas à cada tipo de nanomaterial específico, sendo incabível a extrapolação de resultados obtidos entre os diferentes tipos de nanomateriais.

Nesse sentido, cabe salientar que o uso de polímeros biodegradáveis em nanocarreadores tem impactado nas linhas de pesquisa relacionadas às respostas ambientais. Visto que as nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) são constituídas majoritariamente por um polímero biodegradável (PCL), o perfil de biodegradabilidade desses sistemas no meio ambiente é um interessante tema de pesquisa. Como previamente discutido no início dessa seção de revisão, a poli (ϵ -caprolactona) (PCL) em sua forma macroscópica, mostrou-se biodegradável em culturas de fungos^{182,183,186,195,196}, compostagem¹⁸⁷, lodo ativado¹⁶⁷ e em diferentes tipos de solos^{168,169,188}. Contudo, pode-se afirmar que, além dos estudos de biodegradação do PCL em sua forma macroscópica, a biodegradação de nanopartículas constituídas por esse polímero não foi investigada até o momento.

Além disso, o conhecimento sobre nanomateriais poliméricos produzidos por materiais biodegradáveis ainda é limitado, uma vez que sempre foram considerados seguros. No entanto, alguns estudos foram realizados avaliando os materiais constituintes da LNC. A biodegradabilidade dos ésteres e polissorbatos de ácidos graxos de sorbitano,

como o polissorbato 80 e o monoestearato de sorbitano, tem sido amplamente comprovada, uma vez que também têm uso extensivo aprovado pela FDA como agentes antiespumantes, aromatizantes sintéticos, estabilizadores e emulsificantes em alimentos e em uma variedade de cosméticos e produtos médicos¹⁹⁷. Além disso, em 2005, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) publicou um documento que resume informações sobre os ésteres e polissorbatos de ácidos graxos de sorbitano, tais como suas propriedades físico-químicas, efeitos toxicológicos, perfil de exposição, destino ambiental e ecotoxicidade. Sobre o destino ambiental, este documento destaca a existência limitada de estudos avaliando este parâmetro para polissorbatos. Entretanto, baseado em estudos de biodegradação relatados para sorbitanos (monolaurato de sorbitano, monooleato de sorbitano e outros ácidos graxos - C6-C10) que sofrem biodegradação moderada no meio ambiente (60-83% em 28 dias), é afirmado que, por analogia, seria esperado que os polissorbatos tivessem características de biodegradação semelhantes¹⁹⁷.

Diante disso, o estudo da biodegradação dos materiais da LNC nanoencapsulados torna-se um objeto de pesquisa interessante, uma vez que as propriedades inerentes das partículas em nanoescala têm sido confrontadas com os procedimentos tradicionais de avaliação de risco ambiental que avaliam contaminantes em escala maior³³. Ainda, é de extrema importância a abordagem dessa linha de pesquisa, diante da necessidade de comprovação da segurança ambiental desses novos sistemas para as futuras aplicações.

3.4.1 Ecotoxicidade de Nanopartículas

No que tange à área ambiental, a maioria dos estudos referentes à avaliação da toxicidade para os níveis tróficos aquáticos está relacionada à nanopartículas inorgânicas, destacando-se as nanopartículas de TiO₂, nanotubos de carbono, AgNP, FeO e nanopartículas de ouro¹⁹⁸⁻²⁰³. Contudo, podem ser encontrados alguns estudos avaliando a ecotoxicidade de nanopartículas poliméricas, muito embora, em menor quantidade comparados às nanopartículas inorgânicas citadas anteriormente.

A quantidade limitada de estudos de toxicidade ambiental de nanopartículas poliméricas pode ser explicada pelo fato de as mesmas serem constituídas, na maioria das vezes, de materiais biodegradáveis, sendo consideradas não tóxicas, sem uma avaliação aprofundada dos possíveis impactos ambientais. De acordo com a literatura, para nanopartículas poliméricas os efeitos nocivos poderiam ser observados em concentrações

superiores a $\sim 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de NPs²⁰⁴. No entanto, cabe ressaltar que não é possível extrapolar o efeito tóxico de um organismo de substâncias de certas espécies para organismos de outras espécies, nem para fazer comparações entre os diferentes níveis tróficos e diferentes nanomateriais²⁰⁵. Uma vez que diferentes tipos de nanopartículas (orgânicas e inorgânicas) apresentam propriedades inerentes de cada material constituinte e/ou características peculiares por se tratarem de sistemas diferentes, a comparação dessas partículas não pode ser considerada.

Nesse sentido, o uso de testes de toxicidade em ambientes aquáticos são ferramentas promissoras para avaliar os efeitos de toxicidade de substâncias na água e, muitas vezes, para comparar diferentes substâncias químicas ou a resposta de sensibilidade de diferentes organismos aquáticos à mesma substância³⁴. Recomenda-se que o efeito tóxico de uma amostra seja avaliado para mais de uma espécie representativa da biota aquática, preferencialmente pertencendo a diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar³⁵⁻³⁷. Estes podem incluir espécies de algas (produtores primários), microcrustáceos (consumidores primários) e peixes (consumidores secundários)²⁰⁶.

Alguns estudos que avaliaram a toxicidade para *Daphnia similis* utilizando AgNP (nanopartículas de prata) mostraram um EC_{50} de $4,70 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ($0,0047 \text{ ppm}$)²⁰³ e em outro estudo, foram obtidos resultados similares e um EC_{50} de $6,90 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ($0,0069 \text{ ppm}$) quando se utilizou as mesmas partículas (AgNP) e os mesmos organismos²⁰⁷. No que se refere à nanopartículas poliméricas, Besseling et al., (2014)²⁰⁸ avaliaram os efeitos de nanopartículas de poliestireno (nano-PS) ($\sim 70 \text{ nm}$) no crescimento, mortalidade, desenvolvimento de neonatos e malformação dos organismos de *Daphnia magna*. Os resultados mostraram uma redução no tamanho do corpo e alterações na reprodução dos organismos para concentrações de nano-PS entre $0,22$ e 103 mg L^{-1} . Ainda, as malformações ocorreram em concentrações acima de 30 mg L^{-1} de nano-PS.

Asharani et al. (2008)²⁰⁰ avaliaram a toxicidade de nanopartículas de prata (AgNP) para embriões de *Danio rerio* e encontraram valores de LC_{50} entre 25 e 50 mg L^{-1} ($25-50 \text{ ppm}$). Em outro estudo, Xin et al. (2015)²⁰⁹ avaliou a toxicidade de AgNP para embriões de zebrafish e os resultados mostraram valores de LC_{50} entre $4,120 \text{ mg L}^{-1}$ and $5,909 \text{ mg L}^{-1}$ ($4-6 \text{ ppm}$). Em relação à nanopartículas poliméricas, foram investigados os efeitos tóxicos de nanopartículas de poliestireno (55 e 110 nm) em algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*), crustáceos (*Thamnocephalus platyurus*; *Daphnia magna*), bactérias (*Vibrio fischeri*) e a citotoxicidade para linhagens celulares do peixe truta arco-íris. Os resultados mostraram um EC_{50} de $0,54 - 5,2 \text{ mg L}^{-1}$ para as espécies *in vivo*, enquanto para os ensaios

de citotoxicidade o EC₅₀ foi de ~ 60 - 87 mg L⁻¹ ²⁰². Em outro estudo, Bhattacharya et al. (2010)²¹⁰ investigaram o efeito da adsorção de partículas de poliestireno (20 nm) na fotossíntese de algas e os resultados mostraram que uma concentração de 1,8 - 6,5 mg L⁻¹ prejudicou a fotossíntese da população algal ocasionando redução da população avaliada.

Adicionalmente, em 2016, o NANoREG desenvolveu uma série de estudos que avaliaram o efeito da acumulação potencial, bem como da toxicidade aquática de 6 grupos de nanomateriais. Dentre esses nanomateriais, foram avaliadas nanopartículas de TiO₂, CeO₂, SiO₂, ZnO e Ag e nanotubos de carbono para diferentes organismos aquáticos: crustáceos (*Daphnia magna*), algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*), nematóides (*Caenorhabditis elegans*) e peixes (*Danio rerio*). Esse documento definiu e classificou a toxicidade de acordo com diferentes faixas de concentrações de valores de EC₅₀: não tóxicas (>100 mg L⁻¹), danosas (10-100 mg L⁻¹), tóxicas (1-10 mg L⁻¹), muito tóxicas (<1 mg L⁻¹) e extremamente tóxicas (<0,1 mg L⁻¹). Cabe salientar que de um modo geral, os nanotubos de carbono se mostraram mais tóxicos, seguido das nanopartículas de prata. Entretanto, para cada organismo avaliado, os resultados foram diferentes e podem ser encontrados de maneira detalhada no documento de livre acesso fornecido pelo NANoREG.

A respeito das LNC, um tipo específico de nanopartícula polimérica, a toxicidade aguda e subcrônica *in vivo* foi intensivamente investigada por nosso grupo de pesquisa²⁹⁻³². Após a administração intraperitoneal e intradérmica em ratos da linhagem *Wistar*, os possíveis efeitos toxicológicos foram avaliados utilizando marcadores de dano renal, bem como de danos teciduais e histopatológicos e os resultados mostraram a segurança desses sistemas para ambas as vias de administração^{29,30}. Além disso, resultados da avaliação da citotoxicidade e da genotoxicidade, associadas a absorção oral de LNC em organismos paraquáticos *Caenorhabditis elegans* como modelo alternativo *in vivo* evidenciaram a segurança desses sistemas para a administração via oral^{31,32}. Contudo, a toxicidade desses sistemas na área ambiental ainda não foi investigada, sendo evidente que, para aplicações futuras devido ao potencial promissor desses sistemas, esse parâmetro deverá ser considerado. Uma vez que, é imprescindível conhecer as concentrações limites que poderiam estar em contato com corpos hídricos e solos sem que nenhum efeito tóxico seja observado. Assim, pela primeira vez, a toxicidade dessas nanopartículas poliméricas no meio ambiente foi avaliada.

4. Experimental

4.1 Materiais e equipamentos

4.1.1 Reagentes, solventes e materiais de consumo

- acetona grau HPLC - Panreac® (Espanha)
- ácido bórico (H_3BO_3) - Sigma-Aldrich® (EUA)
- ácido cítrico monohidratado ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) - Sigma-Aldrich® (EUA)
- bicarbonato de sódio – (NaHCO_3) - Sigma-Aldrich® (EUA)
- brometo de potássio (KBr) - Sigma-Aldrich® (EUA)
- citrato de ferro pentahidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) - Sigma-Aldrich® (EUA)
- cloreto de ferro III hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) - Sigma-Aldrich® (EUA)
- cloreto de sódio (NaCl) – Merck® (Alemanha)
- cloreto de potássio (KCl) - Merck® (Alemanha)
- clorofórmio deuterado (CDCl_3) - Sigma-Aldrich® (EUA)
- etanol PA – Merck® (Alemanha)
- fosfato dipotássico (K_2HPO_4) - Merck® (Alemanha)
- hidróxido de sódio (NaOH) - Sigma-Aldrich® (EUA)
- meio de cultura estéril (Luria-Bertani) - Sigma-Aldrich® (EUA)
- molibdato de amônio tetrahidratado ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) - Sigma-Aldrich® (EUA)
- monoestearato de sorbitano, Sigma-Aldrich® (EUA)
- nitrato de cálcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) – Synth®
- nitrato de manganês tetrahidratado ($\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) - Sigma-Aldrich® (EUA)
- nitrato de potássio (KNO_3) - Merck® (Alemanha)
- poli(ϵ -caprolactona) $M_w = 14.000 \text{ g mol}^{-1}$ e $M_n = 10.000 \text{ g mol}^{-1}$, Sigma-Aldrich® (EUA)
- poli(ϵ -caprolactona) $M_n = 80.000 \text{ g mol}^{-1}$, Sigma-Aldrich® (EUA)
- polissorbato 80 (P80) - Gerbras® (Brasil)
- sulfato de cálcio dihidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) - Sigma-Aldrich® (EUA)
- sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) - Sigma-Aldrich® (EUA)
- sulfato de ferro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) - Sigma-Aldrich® (EUA)
- sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) - Sigma-Aldrich® (EUA)
- tetraidrofurano grau HPLC - Panreac® (Espanha)

- triglicerídeos de cadeia média, Alpha Química® (Brasil)
- unidade filtrante Microcon® 10000 M_w , Millipore® (EUA)

4.1.2 Equipamentos

- agitador vórtex de tubos AP56 Phoenix® (Brasil) - *Lab. K204, IQ/UFRGS*
- autoclave horizontal, AB42, Phoenix® (São Paulo, Brasil) - *Lab. K204, IQ/UFRGS*
- balança analítica, Scientec® - *Lab. K204, IQ/UFRGS*
- bomba de alto vácuo Speedivac-2, Edwards® (Brasil) - *Lab. K204, IQ/UFRGS*
- câmara de contagem de células Neubauer Blaubrand, Brand® - *Departamento Técnico de Controles e Ensaios, CORSAN.*
- centrífuga Baby-I mod. 206 Fanem® (Brasil) - *Lab. K204, IQ/UFRGS*
- centrífuga 5804R, Eppendorf® (Alemanha) - *Departamento Técnico de Controles e Ensaios, CORSAN.*
- centrífuga de eppendorff 1-14, Sigma® (EUA) - *Lab. K204, IQ/UFRGS*
- condutivímetro Mettler Toledo 8603 - *Departamento Técnico de Controles e Ensaios, CORSAN.*
- cromatógrafo (SEC) VE 2001 com detector triplo TDA 302, Viscotek® (EUA) - *Central Analítica, IQ/UFRGS*
- equipamento ZetaSizer ZS, Malvern® (Reino Unido) - *Lab. 405, Faculdade de Farmácia/UFRGS*
- equipamento Mastersizer 2000, Malvern® (Reino Unido) - *Lab. 405, Faculdade de Farmácia/UFRGS*
- equipamento NanoSight LM10, NanoSight® (Reino Unido) – *Lab. K204, IQ/UFRGS*
- equipamento de ressonância magnética nuclear Varian® (Inova 300 MHz, Agilent Technologies, CA, EUA) – *IQ/UFRGS*
- espectrofotômetro 640-IR, Varian® (EUA) – *IQ/UFRGS*
- evaporador rotatório R-114 Büchi® (Alemanha) – *Lab. K204, IQ/UFRGS*
- shaker MA 830, Marconi®, (Brasil) - *Departamento Técnico de Controles e Ensaios, CORSAN.*
- microscópio óptico Axio Lab A1, Zeiss® - *Departamento Técnico de Controles e Ensaios, CORSAN.*
- microscópio óptico BX41TF, acoplado à câmera fotográfica e polarizador, Olympus® (Japão) – *IQ/UFRGS*
- potenciômetro UB-10 Denver® (EUA) – *Lab. K204, IQ/UFRGS*

- placa de agitação magnética com aquecimento, Ika-Werke® (Alemanha) – *Lab. K204, IQ/UFRGS*

- refrigerador (modelo: CRM33, Consul®, Brasil)

4.2 Métodos empregados para obter os resultados descritos na seção 5.1

4.2.1 Preparação das formulações de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNC), nanoesfera (NS) e nanoemulsão (NE) descritas na seção 5.1

As formulações de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNC), contendo diferentes composições de parede polimérica, foram obtidas empregando-se o método de deposição interfacial de polímero pré-formado²¹¹. Formulações de nanoemulsão - NE (sem polímero) e nanoesfera - NS (sem triglicerídeos de cadeia média) também foram preparadas para fins de validação do método a ser utilizado, com o objetivo de comparar e identificar as massas molares da mistura dos diferentes constituintes das LNC a partir da análise de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).

Preparou-se uma fase orgânica contendo poli(ϵ -caprolactona) (exceto para a NE) com M_n predeterminada (LNC 1 PCL, M_n 10.000 g mol⁻¹ 100% m/m, LNC 2 PCL, M_n 80.000 g mol⁻¹ e 10.000 g mol⁻¹, 9:1, m/m e LNC 3 PCL, M_n 80.000 g mol⁻¹ 100% m/m), 127 μ L de triglicerídeos de cadeia média (TCC) (exceto para a NS) e 0,038 g de monoestearato de sorbitano (MS), dissolvidos em 27 mL de acetona, permanecendo sob agitação a 40 °C. Essa fase orgânica foi injetada, sob agitação, em uma fase aquosa contendo 0,077 g de polissorbatos 80 (P80) e 53 mL de água MilliQ® a 40 °C. Após 10 minutos, a acetona foi removida e a suspensão foi concentrada a 10 mL em evaporador rotatório a 40 °C. A composição das formulações encontra-se descrita na Tabela 3.

Tabela 3. Composição das formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico com diferentes composições de parede polimérica (LNC 1, 2 e 3), nanoemulsão (NE) e nanoesfera (NS).

Matéria-prima	LNC 1	LNC 2	LNC 3	NE	NS
PCL M_n 10.000 g mol ⁻¹	0,10 g	0,01 g	-	-	0,10 g
PCL M_n 80.000 g mol ⁻¹	-	0,09 g	0,10 g	-	-
MS	0,038 g				
TCC	127µL	127µL	127µL	127µL	-
P80	0,077 g				
Acetona	27 mL				
Água MilliQ®	53 mL				
Volume final	10 mL				

Após a preparação, as formulações LNC 1, LNC 2 e LNC 3 foram separadas em diferentes frascos. As amostras a serem esterilizadas foram acondicionadas em frascos de 10 mL e recravadas com septo e lacres de alumínio para posterior esterilização e eliminação da interferência microbiológica no processo de degradação. As amostras foram submetidas ao processo de esterilização, sendo autoclavadas por 10 min a 134 °C, em uma autoclave horizontal (modelo: AB42, Phoenix®), conforme metodologia descrita e validada por nosso grupo de pesquisa²¹². As formulações foram denominadas LNC 1, LNC 2 e LNC 3, conforme a massa molar de PCL utilizada.

As amostras LNC 1, LNC 2 e LNC 3 (estéril e não estéril) foram, então, caracterizadas quanto à distribuição de diâmetro, variações de potencial *zeta* e de pH. Igualmente, a análise de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) foi realizada antes e após a esterilização para comprovar que esse processo não provoca alterações na massa molar. Todas as formulações, estéreis e não estéreis, foram investigadas quanto a uma possível contaminação por fungos e/ou bactérias.

4.2.2 Cromatografia por exclusão de tamanho, SEC

A avaliação da cinética de degradação das diferentes LNC, a partir das mudanças na massa molar das amostras, antes e após os tempos pré-definidos de armazenamento (a 5 °C) foi realizada por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).

Para isso, 1,5 mL da amostra de LNC foram transferidos para um tubo Falcon® e 4,0 mL de etanol (grau analítico) foram adicionados. A mistura foi agitada durante 2 minutos em misturador vórtex (Velp®), que opera a uma velocidade constante de vibração (2400 rpm). As amostras foram centrifugadas (centrífuga Baby-I mod. 206 Fanem®, Brasil) (3600 rpm) durante 15 min. O sobrenadante foi coletado, evaporado em rotaevaporador e armazenado em estufa (30 °C) durante 12h, enquanto que o precipitado foi diretamente seco em estufa (30 °C) por 12h (Excellent UFE550, Memmert®) após a extração. Após a secagem, todas as amostras foram dissolvidas em tetrahidrofurano (THF) a uma faixa de concentração <0,1% (<10 mg mL⁻¹) e filtradas com auxílio de um filtro de membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) de 0,45 µm (Millipore®). Por fim, as análises foram realizadas em um cromatógrafo por exclusão de tamanho (SEC) (VE 2001, Viscotek®, EUA) equipado com detector triplo (TDA 302, Viscotek®, EUA) e coluna PS/DVB (Malvern Instruments®, Westborough, MA, EUA). Foram utilizados padrões de poliestireno para a calibração.

Para todas as amostras estudadas, tanto a massa molar ponderal média (M_w), quanto a massa molar numérica média (M_n) foram avaliadas juntamente com a polidispersidade (M_w/M_n). Um modelo cinético para determinar a taxa de degradação de poliésteres alifáticos foi previamente descrito por Pitt e Gu (1987)¹⁵³. As taxas de degradação foram descritas por uma constante k nas Equações (1) e (2). A partir das Equações (1) e (2), é possível definir se a cinética da hidrólise é do tipo autocatalisada $\ln(M_n)$ ou não catalisada $(1/M_n)$ ¹⁷¹, respectivamente.

$$\ln(M_n) = \ln(M_{n,0}) - k_3 t \quad (1)$$

$$\frac{1}{M_n} = \frac{1}{M_{n,0}} + k_4 t \quad (2)$$

onde M_{n0} é a massa molar numérica media inicial de cada amostra e M_n é a massa molar numérica média em cada tempo de armazenamento (t).

Partindo-se das equações (1) e (2), foram plotados $\ln(M_n)$ e $1/M_n$ como funções do tempo de degradação e foi traçada uma linha de tendência para ajustar os dados. A equação em que foi obtido o melhor ajuste (ou seja, o maior R^2), indica o mecanismo dominante (autocatalisado ou não catalisado)¹⁷¹.

A massa molar numérica média (M_n) também foi utilizada para determinar a fração de cadeias clivadas (f) nas LNC após o armazenamento (Equação 3), a partir de um modelo cinético descrito anteriormente por Cáceres & Canevarolo (2008)²¹³ para determinar a fração de cadeias clivadas do poliestireno.

$$f = \frac{M_{n0}}{M_{nt}} - 1 \quad (3)$$

onde f descreve a fração de cadeias clivadas, M_{n0} é a massa molar numérica média inicial de cada amostra e M_{nt} é a massa molar numérica média em cada tempo de armazenamento.

As mudanças na massa molar e as taxas de degradação considerando a massa molar ponderal média ($\Delta M_w \%$) nas LNC foram determinadas a partir da Equação (4).

$$\Delta M_w \% = \left(\frac{M_{w0} - M_{wt}}{M_{w0}} \right) \times 100 \quad (4)$$

onde M_{w0} é a massa ponderal média inicial de cada amostra e M_{wt} é a massa ponderal média em cada tempo de armazenamento para cada amostra.

4.2.3 Estudo da estabilidade química e da cinética de degradação das LNC por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC)

Após o preparo das formulações e a esterilização (ou não), as amostras LNC 1, LNC 2 e LNC 3 (estéreis e não estéreis) foram armazenadas em frascos de vidro (h = 100 mm; \varnothing = 5 mm; v = 10 mL) e recravadas com septo e lacres de alumínio, permanecendo a 5 °C em refrigerador (modelo: CRM33, Consul®, Brasil), sob abrigo da luz. A temperatura foi medida com um termômetro (Fisherbrand™) periodicamente (2 vezes por semana).

Alíquotas foram retiradas em tempos previamente definidos (10, 15, 30 e 60 dias) e separadas para análises de pH, de diâmetro e de potencial *zeta*. Também foram avaliadas possíveis mudanças da massa molar por SEC (amostras previamente extraídas conforme descrito de maneira detalhada no item 4.2.2). Todas as análises foram realizadas em triplicata (de lote e de medidas).

4.2.4 Difração de raios x (DRX)

A cristalinidade das amostras de PCL comercial ($M_n = 10.000 \text{ g mol}^{-1}$; $M_n = 80.000 \text{ g mol}^{-1}$; 9:1 m/m PCL $M_n = 80.000$ e $10.000 \text{ g mol}^{-1}$) e das formulações de LNC, antes e após a esterilização, foi determinada através da técnica de difração de raios-x (DRX) em um difratômetro (modelo: D-500 Rigaku, Siemens®) equipado com fendas Soller no feixe incidente, fenda de divergência de 1° , fenda de entrada de $0,15 \text{ mm}$ e um monocromador de grafite no feixe secundário.

Os filmes das amostras de PCL foram preparados usando acetona como solvente. A solução de PCL (10 mg mL^{-1}) e as formulações de LNC ($1,0 \text{ mL}$ de formulação $\sim 10 \text{ mg}$ de PCL) foram depositadas em uma placa de vidro (comprimento de 50 mm , $2,5 \text{ mm}$ de largura) e secas à vácuo sob temperatura ambiente durante 24 h . Os dados foram coletados com radiação $\text{CuK}\alpha$, na faixa angular de 2° a 40° (2θ), com velocidade de varredura de $0,05^\circ \text{ s}^{-1}$ à temperatura ambiente.

O método de Segall et al., (1995)²¹⁴ foi utilizado para calcular o índice de cristalinidade (IC) das amostras (Equação 5).

$$IC = \left(\frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) \times 100 \quad (5)$$

onde IC é o índice de cristalinidade (%); I_{am} é a intensidade de difração que representa somente o material amorfo ($2\theta = 18^\circ$); I_{002} é a intensidade máxima do principal pico de difração que representa o material cristalino e amorfo.

4.2.5 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As análises de infravermelho foram realizadas empregando-se um espectrofotômetro (Varian® 640-IR, Agilent Technologies, CA, USA). As amostras foram depositadas sobre pastilhas de KBr previamente preparadas e foram analisadas de 4000 a 400 cm^{-1} , com 32 acumulações de resolução de 8 cm^{-1} .

4.2.6 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H (^1H -RMN)

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em um espectrômetro Varian® (Inova 300 MHz , Agilent Technologies, CA, USA) na temperatura de 25° C . Clorofórmio

deuterado (CDCl₃) foi utilizado como solvente e o sinal do CHCl₃ residual (7,27 ppm) foi usado como referência.

4.2.7 Determinação de índice de acidez

O procedimento de titulação para determinar o índice de acidez em amostras de três lotes diferentes de monoestearato de sorbitano (MS), foi executado através do método adaptado do Instituto Adolfo Lutz (2008)²¹⁵, realizado em triplicata. Esse método consiste em utilizar uma solução de NaOH (0,1 mol L⁻¹) para titular o ácido graxo livre na amostra. Para isso, pesou-se 0,038 g de MS em balão e, em seguida, foram adicionados 25 mL de etanol. A mistura foi aquecida a 37 °C sob agitação magnética por 30 min. Após dissolução, a titulação com solução aquosa de NaOH foi realizada, utilizando-se como indicador a fenolftaleína.

O cálculo de acidez foi determinado pela Equação 6.

$$Ac = Vxfx \frac{5,61}{P} \quad (6)$$

onde Ac = índice de acidez; f = fator de correção da solução de NaOH; V = volume de NaOH para titular a amostra; 5,61 = equivalente grama do KOH; P = quantidade de amostra (em gramas).

4.2.8 Determinação de contaminação bacteriana ou fúngica nas formulações

A determinação de contaminação bacteriana ou fúngica nas formulações foi realizada por duas técnicas complementares: esgotamento em placas de ágar sangue e *Sabouraud* e análise da turbidimetria. As amostras das formulações (LNC 1, LNC 2 e LNC 3) foram analisadas antes e após a esterilização. Com o auxílio de um suabe, as formulações foram transferidas para as placas (1 mL), até que as mesmas se encontrassem completamente preenchidas. As placas de ágar sangue, que permitem a identificação de bactérias, foram colocadas em estufa a temperatura controlada (37 ± 1 °C) e analisadas visualmente após 48h. O mesmo procedimento foi realizado para as placas de ágar *Sabouraud*, que permitem a identificação de fungos, mantendo-as a 35 ± 1 °C.

4.2.8.1 Identificação de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa

Um isolado de bactéria de cada placa (LNC 1, LNC 2 e LNC 3, não estéreis) foi selecionado e fixado em uma lâmina de microscópio. Em seguida, foi feita a aplicação do corante cristal violeta em ambas as lâminas e as mesmas foram coradas com lugol. Por fim, as lâminas foram descoloradas com acetona/álcool e adicionou-se o corante de contraste fucsina, com o objetivo de visualizar as bactérias Gram-negativas em microscópio.

4.2.8.2 Identificação da presença de fungos filamentosos e leveduras

A fim de identificar a presença de fungos e leveduras nas amostras não estéreis (positivas no teste de contaminação), um isolado de fungos de cada placa foi selecionado e fixado em uma lâmina de microscópio. A visualização em microscópio (1000x) permitiu identificar fungos filamentosos e/ou leveduras, que diferem de acordo com a sua morfologia.

4.2.8.3 Análises de microrganismos através da técnica de turbidimetria

Diferentes proporções volumétricas das formulações (1 μ L, 5 μ L e 10 μ L) foram adicionadas em 1 mL de meio de cultura estéril LB (Luria-Bertani), rico em nutrientes necessários para o crescimento de microrganismos, mantido a 37 ± 1 °C durante 48h. Como controles, determinou-se a absorbância das formulações (LNC 1, LNC 2 e LNC 3), em contato com o meio de cultura estéril LB, porém sem incubação. Os experimentos foram realizados em triplicata, e os valores de absorbância foram medidos por espectrometria de absorção (Spectramax® M2e – SoftMax Pro Software Interface 5, Sunnyvale, CA, EUA) em $\lambda = 370$ nm.

4.2.8.4 Análise estatística dos dados

A análise de variância (ANOVA) para um ou dois fatores: Anova “One-way” e Anova “Two-way”, respectivamente, foram empregadas para a análise dos resultados. Dessa forma, para os resultados obtidos antes e após a esterilização, visto que somente o fator "esterilidade" estaria sendo avaliado, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) "One-way", seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey ($p < 0,05$). Para esse tratamento, foi utilizado o software OriginPro® 8.

Por sua vez, para os resultados referentes à cinética de degradação, nos quais os fatores condição (estéril e não estéril) e tempo (0, 10, 15, 30 e 60 dias) foram avaliados, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com dois fatores, via modelos lineares generalizados, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni ($p < 0,05$) para múltiplos fatores. O programa de tratamento de dados utilizado para a análise estatística dos resultados foi o SPSS® 18.

4.3 Métodos empregados para obter os resultados descritos na seção 5.2

4.3.1 Preparação das formulações de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNC) utilizadas nos estudos de ecotoxicidade e de biodegradação em solos

As formulações de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNC) foram obtidas empregando-se o método de deposição interfacial de polímero pré-formado²¹¹ conforme a metodologia descrita previamente na seção 4.2.1. Para isso, preparou-se uma fase orgânica contendo poli(ϵ -caprolactona) (M_n 10.000 g mol⁻¹), 127 μ L de triglicerídeos de cadeia média (TCC) e 0,038 g de monoestearato de sorbitano (MS), dissolvidos em 27 mL de acetona, permanecendo sob agitação a 40 °C. Essa fase orgânica foi injetada, sob agitação, em uma fase aquosa contendo 0,077 g de polissorbato 80 (P80) e 53 mL de água MilliQ® a 40 °C produzindo uma solução turva esbranquiçada. Após 10 minutos, a acetona foi removida e a suspensão foi concentrada a 10 mL em evaporador rotatório a 40 °C. As formulações, denominadas LNC, foram preparadas em triplicata ($n=3$) e acondicionadas em frascos de vidro de 10 mL, recravados com septo e lacres de alumínio. As formulações foram mantidas em refrigerador (modelo: CRM33, Consul®, Brasil), sob abrigo da luz e a 5 °C até o seu uso.

As amostras foram, então, caracterizadas quanto à distribuição de diâmetro, variações de potencial *zeta* e de pH. Adicionalmente, para os ensaios de ecotoxicidade em meio aquoso, análises de concentração de partículas por mL também foram realizadas.

4.3.2 Ensaios de avaliação da ecotoxicidade das LNC para organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos

4.3.2.1 Avaliação da toxicidade crônica através do método de ensaio com algas *Pseudokirchneriella subcaptata* (*Selenastrum capricornutum*)

O protocolo utilizado para a realização do ensaio de ecotoxicidade com algas seguiu as determinações da normativa NBR 12648²¹⁶. Esse método consiste na exposição de uma cultura de algas (organismo-teste) a diferentes concentrações de amostra por um período de exposição de 72h e posterior avaliação da inibição de crescimento da cultura algácea nas populações expostas ao agente tóxico. O organismo-teste utilizado neste método é *Pseudokirchneriella subcaptata* (*Selenastrum capricornutum*), espécie de alga mantida em meio L.C. Oligo.

Preparação do meio L.C.Oligo

A preparação do meio L.C. Oligo seguiu os protocolos padronizados pela norma NBR 12648²¹⁶. O protocolo consiste na mistura de 1 mL das soluções 1, 2, 3, 4 e 7 (Tabela 4) e 0,5 mL das soluções 5 e 6 (Tabela 4), seguida da adição de água purificada até completar um litro de solução.

Tabela 4. Composição das soluções utilizadas no preparo do meio L.C. Oligo.

Soluções estoque do meio L.C. Oligo	Substância Química	Massa (g)	Volume final da solução (mL)
1	Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	4,0	100
2	KNO ₃	10,0	100
3	MgSO ₄ . 7H ₂ O	3,0	100
4	K ₂ HPO ₄	4,0	100
5	CUSO ₄ . 5H ₂ O	0,030	1000
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	0,060	
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,060	
	Mn(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	0,060	
	C ₆ H ₈ O ₇ . H ₂ O	0,060	
	H ₃ BO ₃	0,060	
6	C ₆ H ₅ FeO ₇ . 5H ₂ O	1,625	1000
	FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,625	
	FeCl ₃ . 6H ₂ O	0,625	
7	NaHCO ₃	15,0	1000

A solução obtida (meio L.C. Oligo) foi agitada por uma hora e foi armazenada em recipientes de borossilicato e autoclavada a 121 °C por 15 min.

Toda a vidraria utilizada nos testes foi previamente lavada com detergente neutro, água da torneira, acetona, solução de ácido clorídrico a 10% (v/v) e água destilada. Em seguida, todo o material de vidro foi autoclavado (AV-50, Phoenix Ltda) a 121 °C por 15 min.

Preparação do inóculo algáceo

Três a sete dias antes do início do ensaio a cultura de algas foi repicada em meio L.C Oligo esterilizado previamente e mantida em incubação a 25 °C, 4500 lux de luminosidade e agitação de 100 rpm. A nova cultura obtida foi centrifugada (1700 rpm) em recipientes esterilizados durante 15 min. O sobrenadante foi descartado e as algas ressuspendidas no meio de cultura.

A suspensão de células resultante foi analisada por contagem da densidade de células de algas, utilizando-se câmaras Neubauer para contagem celular e microscópio óptico. O volume de inóculo algal adicionado nas concentrações teste foi de 1,0 mL, de maneira que a concentração inicial estivesse entre 10^4 células mL⁻¹ e 10^5 células mL⁻¹.

Ensaio de exposição

O ensaio de exposição foi realizado em 5 diluições de amostra (em triplicata), além do controle, por um período de 72h. O controle foi constituído de 50 mL de meio L.C. Oligo e 1 mL do inóculo de algas (ausência de amostra).

As soluções teste foram obtidas a partir da mistura do L.C. Meio Oligo e da formulação LNC em diferentes concentrações de acordo com a Tabela 5. As concentrações foram calculadas em $\mu\text{mol L}^{-1}$ e mg L^{-1} , utilizando o número de partículas por mL presentes na formulação (resultado obtido pela técnica NTA) e a fração mássica (%m/m) da LNC presente na dispersão aquosa, respectivamente. Adicionalmente, a concentração de cada constituinte em mg L^{-1} utilizando a fração mássica (%m/m) presente na dispersão aquosa também foi calculada (Tabela 1A em *Anexos*).

Tabela 5. Volume e concentração de formulação utilizados nos ensaios de algas *Pseudokirchneriella subcaptata* (*Selenastrum capricornutum*).

Volume de formulação LNC (µL)	Meio LC	Concentração de Oligo (mL)	Concentração de nanocápsulas (µmol L ⁻¹)	Concentração de nanocápsulas (mg L ⁻¹)
-	50	-	-	-
2,5	50	5,15 x 10 ⁻⁰⁹	5,15 x 10 ⁻⁰⁹	1,84
5	50	2,06 x 10 ⁻⁰⁸	2,06 x 10 ⁻⁰⁸	3,68
10	50	8,22 x 10 ⁻⁰⁸	8,22 x 10 ⁻⁰⁸	7,36
25	50	5,15 x 10 ⁻⁰⁷	5,15 x 10 ⁻⁰⁷	18,4
50	50	2,06 x 10 ⁻⁰⁶	2,06 x 10 ⁻⁰⁶	36,8

Por fim, 1 mL do inóculo de algas foi adicionado à cada uma das diluições, os frascos foram tapados e colocados num agitador shaker (MA 830, Marconi).

4.3.2.2 Avaliação da toxicidade aguda através do método de ensaio com microcrustáceos *Daphnia similis*

O protocolo utilizado para a realização dos testes de ecotoxicidade com microcrustáceos seguiu as determinações da normativa NBR 12713²¹⁷. Esse método consiste na exposição de microcrustáceos (organismo-teste) à diferentes concentrações de amostra por um período de exposição de 48h e posterior avaliação da imobilidade dos organismos expostos ao agente tóxico. Os organismos – teste utilizados neste método foram organismos jovens da classe *Daphnia similis*, os quais tinham entre 6h e 24h de idade, obtidos por partenogênese, a partir da segunda postura de fêmeas com idade entre 7 e 28 dias.

O ensaio de exposição dos organismos jovens de *Daphnia similis* foi realizado em 4 diluições de amostra (em triplicata), além do controle, por um período de 48h. As soluções teste foram obtidas a partir da mistura da água de diluição e da formulação LNC em diferentes concentrações no início do ensaio, de acordo com a Tabela 6. As concentrações foram calculadas em µmol L⁻¹ e mg L⁻¹, utilizando o número de partículas

por mL presentes na formulação (resultado obtido pela técnica NTA) e a fração mássica (%m/m) da LNC presente na dispersão aquosa, respectivamente. Adicionalmente, a concentração de cada constituinte em mg L⁻¹ utilizando a fração mássica (%m/m) presente na dispersão aquosa também foi calculada (Tabela 2A em *Anexos*).

Tabela 6. Volume e concentração de formulação utilizados no ensaio com *Daphnia similis*.

Volume de formulação (µL)	Água de diluição (mL)	Concentração de nanocápsulas (µmol L ⁻¹)	Concentração de nanocápsulas (mg L ⁻¹)
-	200	-	
100	200	2,06 x 10 ⁻⁰⁶	18
200	200	8,22 x 10 ⁻⁰⁶	37
200	100	1,64 x 10 ⁻⁰⁵	74
400	100	6,06 x 10 ⁻⁰⁵	147

Os organismos foram transferidos aleatoriamente para recipientes-teste (béqueres de vidro) contendo 25 mL das soluções preparadas previamente e descritas na Tabela 6. O ensaio foi realizado em triplicata, com 7 organismos em cada réplica. Os recipientes-teste foram mantidos em uma sala climatizada com temperatura entre 18 °C e 22 °C por 48h, ao abrigo da luz e sem alimentação aos organismos. Após 48h, o número de organismos móveis e imóveis foi registrado.

4.3.2.3 Avaliação da toxicidade aguda através do método de ensaio com peixes

Pimephales promelas

O protocolo utilizado para a realização dos testes de ecotoxicidade com peixes seguiu as determinações da normativa NBR 15088²¹⁸. Esse método consiste na exposição de peixes (organismo-teste) à diferentes concentrações de amostra por um período de exposição de 48h e posterior avaliação da mortalidade dos organismos expostos ao agente tóxico. Os organismos – teste utilizados neste método foram organismos jovens da classe

Pimephales promelas com idades de 1 a 14 dias e com uma diferença máxima de 24h entre os organismos utilizados no mesmo ensaio.

O ensaio de exposição de organismos jovens de *Pimephales promelas* foi realizado em 6 diluições de amostra (em triplicata), além do controle, por um período de 48h. As soluções testes foram preparadas no momento de início do ensaio e obtidas a partir da mistura de água de diluição e formulação em diferentes concentrações de acordo com a Tabela 7. As concentrações foram calculadas em $\mu\text{mol L}^{-1}$ e mg L^{-1} , utilizando o número de partículas por mL presentes na formulação (resultado obtido pela técnica NTA) e a fração mássica (%m/m) da LNC presente na dispersão aquosa, respectivamente. Adicionalmente, a concentração de cada constituinte em mg L^{-1} utilizando a fração mássica (%m/m) presente na dispersão aquosa também foi calculada (Tabela 3A em *Anexos*).

Tabela 7. Volume e concentração de formulação utilizados no ensaio com *Pimephales promelas*.

Volume de formulação (μL)	Água de diluição (mL)	Concentração de nanocápsulas ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Concentração de nanocápsulas (mg L^{-1})
-	200	-	
1.250	200	$3,20 \times 10^{-4}$	230
2.500	200	$1,30 \times 10^{-3}$	460
5.000	200	$5,15 \times 10^{-3}$	920
10.000	200	$2,06 \times 10^{-2}$	1.840
20.000	200	$8,22 \times 10^{-2}$	3.680
40.000	200	$3,28 \times 10^{-1}$	7.360

O ensaio foi realizado em duplicata, com 10 organismos em cada réplica, mantidos entre 23 °C e 27 °C por 48h, com fotoperíodo de 16h de luz, sem alimentação dos organismos. Após 48h, o número de organismos mortos foi registrado. Ao final do ensaio,

foi calculada a porcentagem de letalidade para cada concentração em relação ao número total de organismos utilizados.

4.3.2.4 Preparação da água de diluição utilizada nos ensaios com *Daphnia similis* e com *Pimephales promelas*

A água de diluição das formulações utilizada nos ensaios com *Daphnia similis* e *Pimephales promelas* foi preparada de acordo com as Normas NBR 15088²¹⁸ e NBR 12713²¹⁷. Para isso, a água a ser utilizada foi reconstituída para atender as seguintes características: dureza total de 40 a 48 mg CaCO₃ L⁻¹ e pH entre 7,0 a 7,6. A preparação foi realizada adicionando 20 mL de solução (1) e 10 mL da solução (2) em 970 mL de água ultrapura. As soluções (1) e (2) foram preparadas e nomeadas de acordo com a Tabela 8.

Tabela 8. Composição da água de diluição utilizada nos ensaios com *Daphnia similis* e *Pimephales promelas*.

Solução	Reagentes	Massa (mg)	Volume da solução final (mL)
1	CaSO ₄ .2H ₂ O	1.500	1000
	KCl	0,030	
2	NaHCO ₃	0,060	1000
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,060	

A água foi aerada para a solubilização total dos sais, saturação do oxigênio dissolvido e estabilização do pH durante 12h antes da sua utilização. A qualidade da água de diluição foi comprovada através do controle realizado junto aos ensaios com as formulações. Para isso, o controle é aceitável se a porcentagem de imobilidade, para *Daphnias similis*, ou mortalidade para *Pimephales promelas* não exceder 10 %.

Para todos os ensaios, dos três níveis tróficos, foram determinadas as concentrações que causavam efeito agudo em 50% da população exposta, utilizando o método estatístico Trimmed Spearman-Kärber 1.5²¹⁹.

4.3.3 Análise de rastreamento do movimento das partículas (Nanosight®)

A técnica de análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) foi utilizada para determinar a densidade do número de partículas (partículas por mL) nas formulações de LNC. As análises foram realizadas empregando-se um equipamento NanoSight LM10 (NanoSight, Amesbury, UK) equipado com câmara porta-amostra acoplada a um laser de 640 nm.

As amostras foram diluídas 5000 vezes em água ultrapura (Milli-Q®; Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e injetadas na câmara da amostra usando seringa (5 mL).

A luz espalhada por cada partícula que se move sob movimento browniano é registrada por esta técnica. Os dados foram capturados através de câmara de vídeo e analisados com o programa de tratamento de dados NTA 2.5 (NanoSight Ltd.). Cada videoclip foi capturado ao longo de 60 s.

4.4 Métodos empregados para obter os resultados descritos na seção 5.3

4.4.1 Determinação do perfil de biodegradação da LNC em solos pelo método do ensaio respirométrico

O perfil de biodegradação das formulações de LNC em solo foi investigado usando um método adaptado de acordo com as normas ASTM D 5338-98²²⁰ e D6003²²¹ para escala laboratorial (Figura 4). A partir da mineralização do carbono constituinte do polímero pelo metabolismo das espécies vivas presentes no solo, o nível de biodegradação pode ser estimado pela produção de CO₂²²².

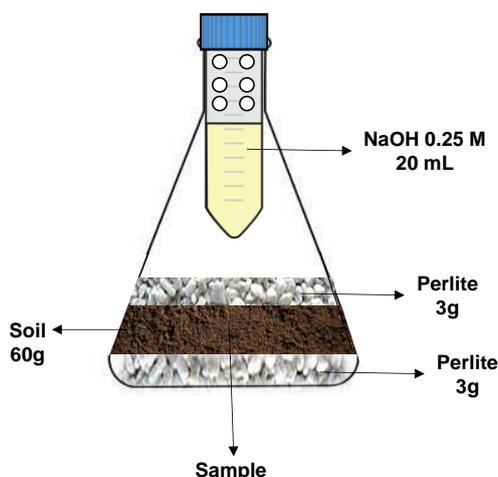


Figura 4. Aparato experimental empregado nos ensaios respirométricos.

A célula respirométrica foi constituída de um frasco Erlenmeyer (capacidade de 250 mL) e de um tubo falcon previamente furado e acoplado na boca do frasco reacional. No frasco Erlenmeyer foi colocado um substrato multicamadas. O substrato multicamadas foi composto por uma mistura de 60 g de solo de jardinagem e a amostra a ser investigada (50 mL de LNC). Essa mistura (solo + amostra) foi colocada entre duas camadas de 3 g de perlita (Figura 4).

A capacidade de biodegradação foi avaliada através da quantificação do CO₂ produzido durante a biodegradação. Para isso, um tubo falcon com orifícios contendo 20 mL de solução de NaOH (0,25 M) foi acoplado ao Erlenmeyer, conforme descrito anteriormente. Esta solução foi substituída a cada 7 dias e titulada com uma solução de 0,1 M de HCl. A câmara respirométrica foi mantida a 60 °C +/- 2 °C e aberta a cada 7 dias para a titulação da solução de NaOH. Depois que a solução de NaOH foi resfriada, uma alíquota de 10 mL foi retirada e transferida para um frasco Erlenmeyer para o procedimento de titulação e o restante foi descartado. Adicionou-se 1 mL de solução de BaCl₂ 0,25 M (Synth) à alíquota de NaOH (10 mL) e a titulação foi realizada com solução de HCl 0,1 M. A quantidade de dióxido de carbono produzida durante o período de incubação foi determinada como uma percentagem da quantidade teórica de CO₂ produzido pelos ensaios controle (misturas de solo sem qualquer outra fonte de carbono - isenta da amostra) durante o mesmo período de incubação.

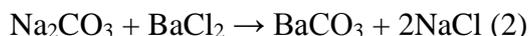
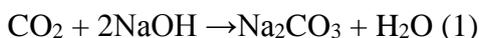
Adicionalmente, para fins de comparação, testou-se um controle positivo (biodegradável) consistindo em 0,5 g de papel de filtro cortado em pedaços de 2x1cm e um controle negativo (não biodegradável) consistindo em 0,5 g de pellets de polipropileno (Braskem) comercial. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

Baseado na quantidade indicada pelas normas ASTM D 5338-98²²⁰ e D6003²²¹, que recomenda o uso de 0,5 g de polímero, a escolha de 50 mL de LNC foi baseada na quantidade de PCL presente em 50 mL de formulação (0,5 g).

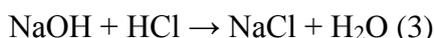
4.4.1.1 Determinação da quantidade de CO₂ produzida

A determinação da quantidade de dióxido de carbono (CO₂) gerado a partir do metabolismo das espécies vivas presentes no meio foi calculado de acordo com o método descrito na ISO 17556/2003 e previamente utilizado em estudos de biodegradação de polietileno²²². Em contato com a solução básica alocada dentro da célula respirométrica (tubo falcon) o CO₂ reage para formar um carbonato instável (Na₂CO₃), que é precipitado

com uma solução de BaCl₂, formando BaCO₃ (pó branco) de acordo com as reações (1) e (2):



A quantidade de NaOH que não reage com o produto gasoso (CO₂) reage com o HCl da solução ácida na titulação, de acordo com a reação (3):



A diferença entre o número de mols inicial do NaOH da solução básica e do HCl consumido na titulação fornece a quantidade de CO₂ liberada na metabolização das amostras pelos microrganismos e, assim, a taxa de biodegradação pode ser obtida de acordo com a Equação 7.

$$MCO_2 = \left[\left(\frac{2 \times CS \times VSO}{CA} \right) - \left(\frac{VA \times VST}{VSZ} \right) \right] \times CS \times 22 \quad (7)$$

onde MCO₂ é a massa de CO₂ liberada no teste de biodegradação (mg); CA é a concentração da solução de HCl (0,1 mol L⁻¹); CS é a concentração da solução de NaOH (0,25 mol L⁻¹); VSO é o volume da solução de NaOH no início do teste (20 mL); VST é o volume da solução de NaOH antes da titulação (20 mL); VSZ é o volume da alíquota da solução de NaOH utilizada na titulação (10 mL); VA é o volume de solução de HCl utilizado para a titulação (mL) e 22 é a metade da massa molecular do CO₂.

4.5 Métodos gerais

4.5.1 Espalhamento de luz dinâmico

As formulações foram avaliadas por espalhamento de luz dinâmico (DLS) - espectroscopia de correlação de fótons (PCS), empregando-se um equipamento ZetaSizer® ZS (Malvern, UK). As amostras foram diluídas em água MilliQ® previamente filtrada (0,45 μm Millipore®) em balão volumétrico (10 mL) para transferência diretamente nas cubetas ópticas. As funções de correlação foram

determinadas por detecção da luz espalhada em um ângulo de 173° (a 25 °C). Cada correlograma foi tratado pelo método de cumulantes para a obtenção da distribuição de diâmetros e do diâmetro médio (*Z-average*). O índice de polidispersão (PDI) foi calculado utilizando-se a Equação 8.

$$PDI = \frac{\mu_2}{\Gamma^2} \quad (8)$$

onde Γ e μ_2 representam a taxa de decaimento médio e sua variância, respectivamente.

Os correlogramas foram também tratados pelo algoritmo CONTIN para a determinação do diâmetro médio de cada população presente na amostra.

4.5.2 Difração de laser

As formulações foram avaliadas quanto à distribuição de tamanho de partículas, ao diâmetro médio de esfera equivalente ($D_{4,3}$) e à polidispersão (*Span*) (Equação 9) por difração de laser, empregando o equipamento Mastersizer® 2000 (Malvern, UK).

O meio dispersante foi a água (100 – 150 mL) inserida na unidade Hydro 2000SM - AWM2002, (Malvern, UK). Na falta do valor de índice de refração da PCL, os índices de refração das fases externa e interna, respectivamente, 1.33 (água) e 1.59 (poliestireno), foram utilizados.

$$Span = \frac{d_{0.9} - d_{0.1}}{d_{0.5}} \quad (9)$$

onde $d_{0.9}$, $d_{0.5}$ e $d_{0.1}$ são os diâmetros cumulativos em volume nos percentis 90, 50 e 10 sob a curva de distribuição de diâmetros, respectivamente.

4.5.3 Análise do potencial zeta

Um parâmetro relacionado diretamente à superfície das nanocápsulas é o potencial *zeta*, o qual corresponde ao potencial elétrico na interface estabelecida entre o meio externo e a camada estacionária de fluido ao redor da partícula. A caracterização das nanopartículas quanto ao potencial *zeta* foi realizada utilizando a técnica de microeletroforese (Equação 10), empregando-se o equipamento ZetaSizer® ZS (Malvern, UK). As medidas foram realizadas após a diluição das formulações (500 vezes, v/v) em solução de NaCl 10 mM, previamente filtrada através de membrana 0,45 μm .

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta} \quad (10)$$

onde U_E é a mobilidade eletroforética, ε é a constante dielétrica, z é o potencial *zeta*, η é a viscosidade do solvente e $f(ka)$ é a função de Henry.

4.5.4 Potenciometria

A determinação do valor de pH das dispersões aquosas de LNC foi realizada em potenciômetro (UB-10 Denver®), previamente calibrado com soluções tampão (pH 4,0 e 7,0). As medidas foram realizadas diretamente nas formulações e todas as análises foram realizadas em triplicata de lote.

5. Resultados e discussão

Para maior clareza, a seção de resultados foi dividida em três partes. A primeira parte (seção 5.1) descreve o estudo da estabilidade das LNC em meio aquoso. Para isso, distintas proporções de PCL com diferentes massas molares foram utilizadas para preparar nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC 1 PCL, M_n 10.000 g mol⁻¹ 100% m/m, LNC 2 PCL, M_n 80.000 g mol⁻¹ e 10.000 g mol⁻¹, 9:1, m/m e LNC 3 PCL, M_n 80.000 g mol⁻¹ 100% m/m) com o intuito de se estabelecer uma correlação entre as características da parede polimérica e os parâmetros de estabilidade e cinética de degradação das nanocápsulas. Além disso, as formulações foram submetidas a um processo de esterilização, a fim de investigar a influência da presença ou não de microorganismos na manutenção das características e da estabilidade química das nanocápsulas. A seleção das formulações LNC 1 e LNC 2 foi motivada pelas suas propriedades biológicas previamente apresentadas^{28,223-225}. De forma a investigar a influência da presença de cadeias menores na formulação LNC 2, foi proposta a comparação com uma formulação preparada nas mesmas condições, mas com 100% de PCL M_n 80.000 g mol⁻¹ (LNC 3).

A segunda parte (seção 5.2) trata da avaliação da ecotoxicidade das LNC para organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos, enquanto que na terceira parte (seção 5.3), foi investigado o perfil de biodegradação das LNC em ensaios respirométricos de solo simulado.

5.1 Avaliação da estabilidade química e da cinética de degradação das LNC

5.1.1 Preparação das dispersões aquosas de LNC com distintas proporções de PCL com diferentes massas molares

As formulações LNC 1, LNC 2 e LNC 3, esterilizadas ou não, foram obtidas como líquidos macroscopicamente homogêneos e esbranquiçados com efeito *Tyndall*. A distribuição de diâmetros de partícula por difração de laser mostrou perfil de populações unimodais para todas as formulações. Os dados de diâmetros médios, diâmetros nos percentis 10, 50 e 90 sob as curvas de distribuição, por volume e por número de partículas, foram plotados em gráficos radar (Figura 5).

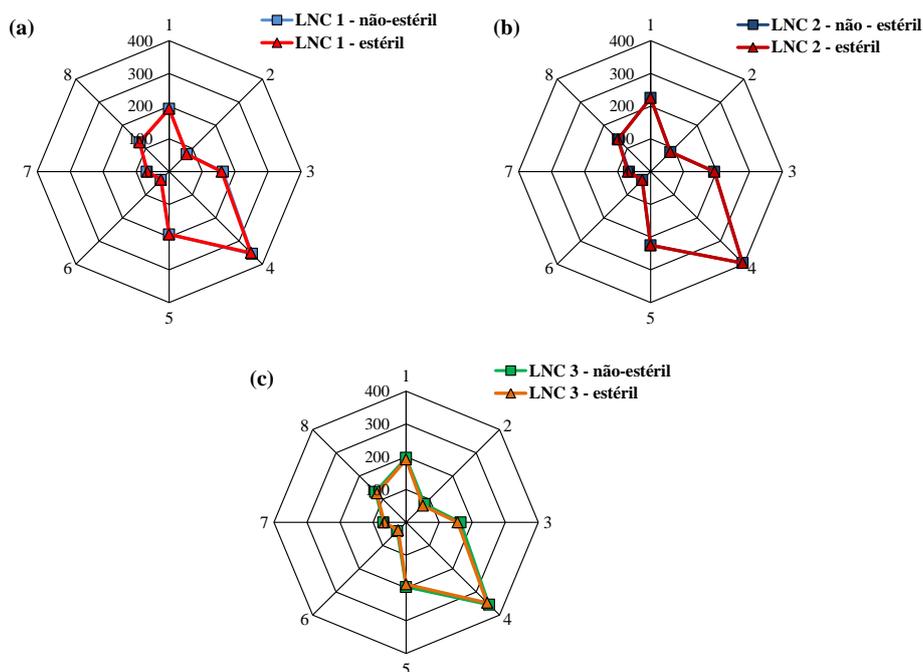


Figura 5. Distribuição de tamanho de partícula (nm) por percentual de volume e número das formulações preparadas com diferentes proporções de parede polimérica – (a) LNC 1 PCL, M_n 10.000 g mol⁻¹ 100% m/m; (b) LNC 2 PCL, M_n 80.000 g mol⁻¹ e 10.000 g mol⁻¹, 9:1, m/m; (c) LNC 3 PCL, M_n 80.000 g mol⁻¹ 100% m/m), antes e após esterilização. Técnica: difração de laser (meio dispersante: água). (n=3), análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey ($p < 0,05$). [eixos: 1 - diâmetro de esfera equivalente, por volume, $d[4,3]_v$; 2 - diâmetro cumulativo em volume de 10% da população total, $d[0,1]_v$; 3 - diâmetro cumulativo em volume de 50% da população total, $d[0,5]_v$; 4 - diâmetro cumulativo em volume de 90% da população total, $d[0,9]_v$; 5 - diâmetro de esfera equivalente, por número, $d[4,3]_n$; 6 - diâmetro cumulativo em número de 10% da população total, $d[0,1]_n$; 7 - diâmetro cumulativo em número de 50% da população total, $d[0,5]_n$; 8 - diâmetro cumulativo em número de 90% da população total, $d[0,9]_n$].

Todas as formulações apresentaram traçados similares nos gráficos radares e um perfil característico de nanocápsulas de núcleo lipídico²²⁶. Considerando os valores de diâmetros, para as formulações LNC 1, LNC 2 e LNC 3, antes e após a esterilização, foi possível afirmar que não houve variação nos diâmetros de esfera equivalente ($d_{4.3}$), em percentual de volume ($p > 0,05$). Para a formulação LNC 1, estéril e não estéril os valores de $d_{4.3}$ obtidos foram de 192 ± 18 nm e 192 ± 12 nm, respectivamente. Para as formulações LNC 2 e LNC 3, os valores de $d_{4.3}$ foram de 225 ± 22 nm (LNC 2 - não

estéril) e 225 ± 13 nm (LNC 2 - estéril); 197 ± 22 nm (LNC 3 - não estéril) e 192 ± 20 nm (LNC 3 - estéril). A polidispersão, expressa em valores de *Span*, foi inferior a 1,5.

Cabe salientar que todas as formulações estudadas apresentaram diâmetros cumulativos em número de 50% da população total ($d_{0.5}$), aproximadamente na mesma faixa de tamanho: 68 ± 4 nm (LNC 1 - não estéril) e 66 ± 6 nm (LNC 1 - estéril); 67 ± 9 nm (LNC 2 - não estéril) e 69 ± 6 nm (LNC 2 - estéril); 69 ± 3 nm (LNC 3 - não estéril) e 66 ± 6 nm (LNC 3 - estéril). Complementarmente, os perfis originais obtidos pela análise de difração de laser, por volume (%) e por número (%), são mostrados em *Anexos* (Figura 1A).

O conjunto de dados permitiu verificar a reprodutibilidade do processo de esterilização para as formulações LNC 1, LNC 2 e LNC 3, seguindo o protocolo previamente estabelecido por Paese e colaboradores (2017)²¹² para uma formulação de LNC preparada com PCL M_n 80.000 g mol⁻¹. Conforme já observado por Paese e colaboradores (2017), esses resultados comprovam que os perfis de distribuição de diâmetro são mantidos após o processo de esterilização, demonstrando a estabilidade do sistema. As formulações também foram avaliadas por espalhamento de luz dinâmico (Figura 6) para melhor caracterizar suas populações nanométricas²²⁷. A técnica de espalhamento de luz dinâmico, também conhecido como espectroscopia de correlação de fótons, é baseada no princípio da esfera equivalente, onde o raio hidrodinâmico da partícula pode ser determinado por sua interação com a luz²²⁸. Uma vez que a presença de agregados aumenta o tamanho médio, esta técnica torna-se interessante para determinar o estado de agregação das nanopartículas em suspensão.

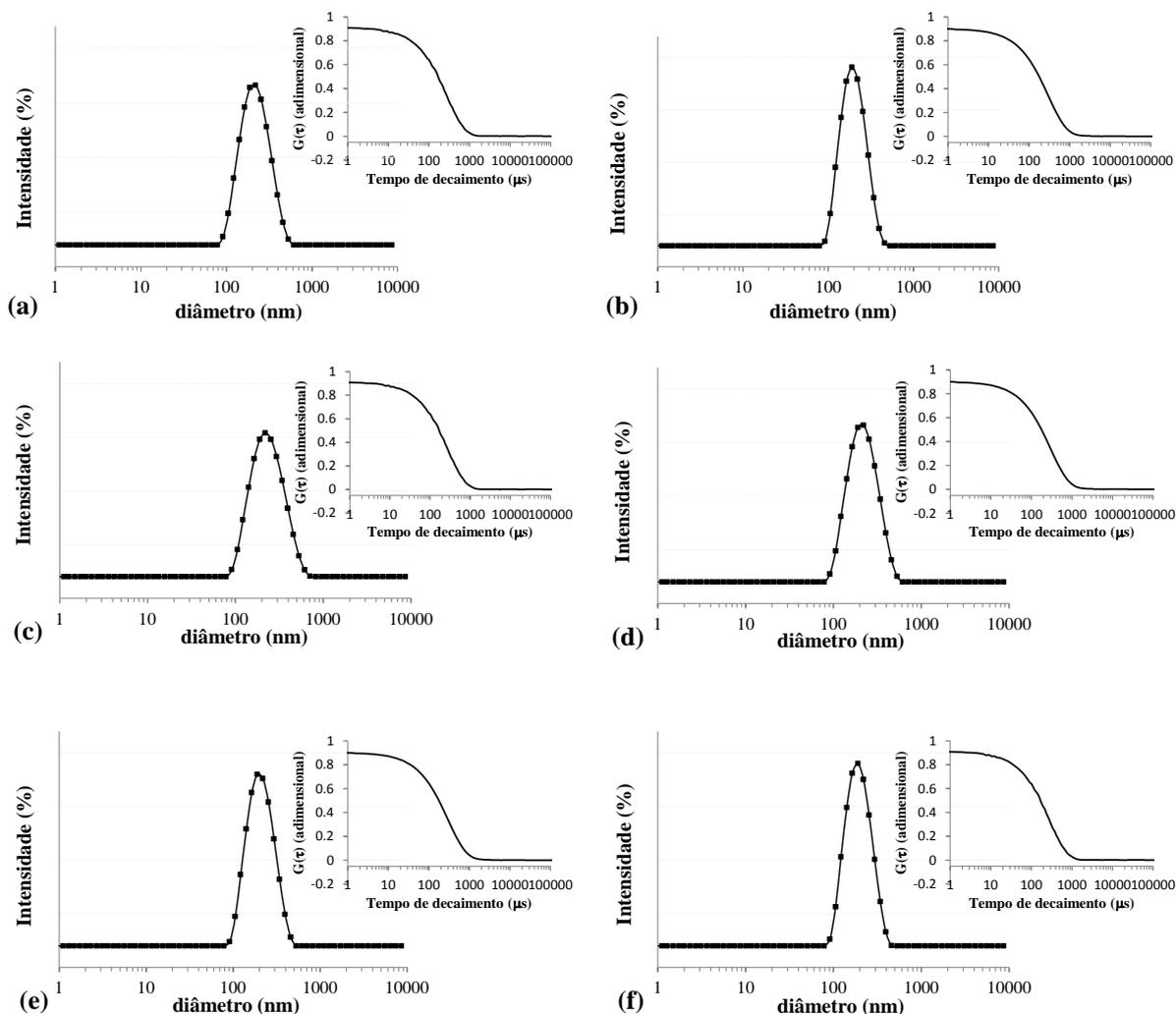


Figura 6. Distribuição de diâmetros de partícula das formulações preparadas com diferentes proporções de parede polimérica, antes e após esterilização: (a) LNC 1 não estéril, (b) LNC 1 estéril, (c) LNC 2 não estéril, (d) LNC 2 estéril, (e) LNC 3 não estéril, (f) LNC 3 estéril, por espalhamento de luz dinâmico (meio dispersante: água). Cada distribuição corresponde à média de três lotes. Ao lado de cada gráfico de distribuição de diâmetro é mostrada a respectiva média das funções de auto correlação temporal ($G(\tau)$) referentes a três lotes.

Os valores de diâmetros médios calculados pelo método dos cumulantes e pelo algoritmo CONTIN estão descritos na Tabela 9. A faixa de valores de diâmetros hidrodinâmicos para ambos os métodos variaram respectivamente de 184 a 217 nm e de 203 a 248 nm, com índices de polidispersão (PDI) de 0,09 a 0,14 e largura de pico a meia-altura da curva de distribuição de 57 a 102 nm.

Tabela 9. Caracterização das formulações de nanocápsulas, antes e após esterilização, a partir de espalhamento de luz dinâmico (DLS). (n=3), análise de variância (ANOVA).

Formulação	DLS		DLS	
	(método dos cumulantes)		(algoritmo <i>CONTIN</i>)	
	d_h (<i>Z-ave</i>) (nm)	PDI (adim.)	d_h (nm)	Largura do pico(nm)
LNC 1 - não estéril	190 ± 2	0,13 ± 0,03	209 ± 3	84 ± 4
LNC 1 - estéril	187 ± 1	0,12 ± 0,04	203 ± 2	67 ± 7
LNC 2 - não estéril	217 ± 2	0,13 ± 0,04	248 ± 4	102 ± 6
LNC 2 - estéril	216 ± 10	0,14 ± 0,02	248 ± 6	102 ± 7
LNC 3 - não estéril	203 ± 10	0,12 ± 0,02	213 ± 2	71 ± 8
LNC 3 - estéril	184 ± 9	0,09 ± 0,01	205 ± 8	57 ± 6

d_h = diâmetro hidrodinâmico
PDI = índice de polidispersão

Os resultados indicaram que as formulações de LNC apresentam populações nanométricas unimodais com baixa polidispersão. Adicionalmente, comparando-se as formulações, antes e após a esterilização, pode-se afirmar que os diâmetros permaneceram significativamente similares ($p > 0,05$). Considerando os resultados, as formulações LNC 1, LNC 2 e LNC 3 foram submetidas a testes para detecção e identificação de contaminação por microrganismos, visto que a hidrólise dos materiais não estéreis, no armazenamento, poderia ser resultante de biodegradação (degradação biótica).

5.1.2 Determinação de contaminação bacteriana e fúngica nas formulações

A esterilidade das formulações foi comprovada através de ensaios de contaminação microbiológica (Figura 7). Por sua vez, foi possível verificar a presença de um precipitado branco para as formulações não estéreis, indicando crescimento microbiano (Figura 8).

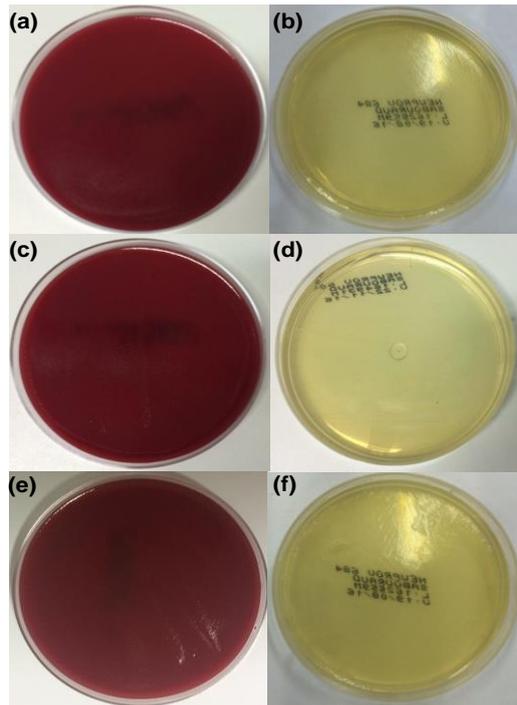


Figura 7. Formulações estéreis de LNC 1 (a) e (b), LNC 2 (c) e (d) e LNC 3 (e) e (f), após 48 horas de incubação em placas de ágar sangue ($37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$) e ágar *Sabouraud* ($35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$).

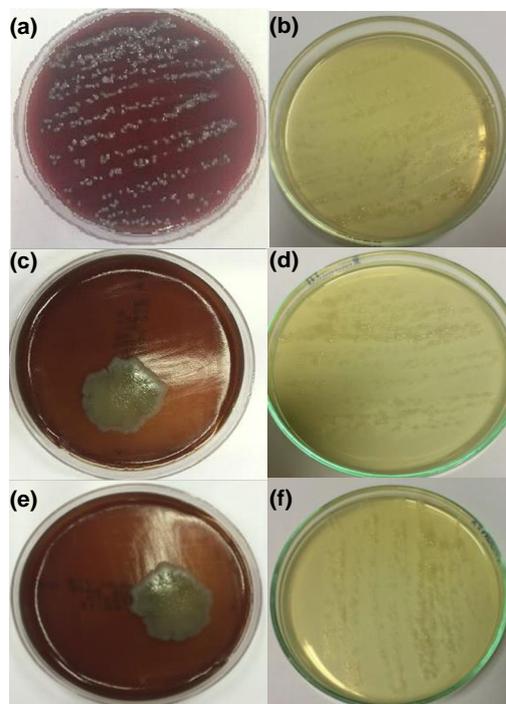


Figura 8. Formulações não estéreis de LNC 1 (a) e (b), LNC 2 (b) e (c) e LNC 3 (e) e (f), após 48 horas de incubação em placas de ágar sangue ($37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$) e ágar *Sabouraud* ($35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$).

Após o cultivo de todas as placas contendo as formulações não estéreis, foi possível verificar que as formulações apresentaram crescimento tanto de bactérias como de fungos. O resultado demonstra que o processo de autoclavagem das formulações foi efetivo, conforme anteriormente proposto por Paese e colaboradores (2017)²¹² para uma formulação de LNC preparada com PCL (Mn 80.000 g mol⁻¹).

5.1.2.1 Identificação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

O método de coloração de Gram para identificação das bactérias Gram-positivas (Gram+) e Gram-negativas (Gram-) é baseado em diferenças na estrutura da parede bacteriana destes dois grupos²²⁹. Bactérias Gram+ são fundamentalmente compostas por uma espessa camada de peptidoglicano em sua composição e, assim, são capazes de formar um complexo roxo a partir da reação com os corantes cristal violeta e lugol que permanece após protocolo de coloração²³⁰. Por outro lado, bactérias Gram-, possuem uma fina camada de peptidoglicano recoberta por uma membrana externa. Desta forma, não há formação de complexo com os corantes empregados no protocolo de coloração e as bactérias são coradas de rosa pelo uso de fucsina, que é utilizado para a melhor visualização de bactérias Gram-negativas.

As formulações LNC 1, LNC 2 e LNC 3 (não estéreis) apresentaram contaminação de bactérias Gram+ e Gram- (Figura 9 a.1, b.1 e c.1).

5.1.2.2 Identificação de fungos filamentosos ou leveduriformes

O método de identificação e de classificação de fungos filamentosos ou leveduriformes é realizado a partir da análise de características morfológicas, tanto macroscópicas (cor, aspecto, textura da colônia), quanto microscópicas (forma e cor da hifa, presença ou não de septos, tipo e arranjo de esporos)²³¹.

A fotomicrografia da lâmina, observada por microscopia, mostrou a presença de fungos leveduriformes nas formulações não estéreis (Figura 9 a.2, b.2 e c.2).

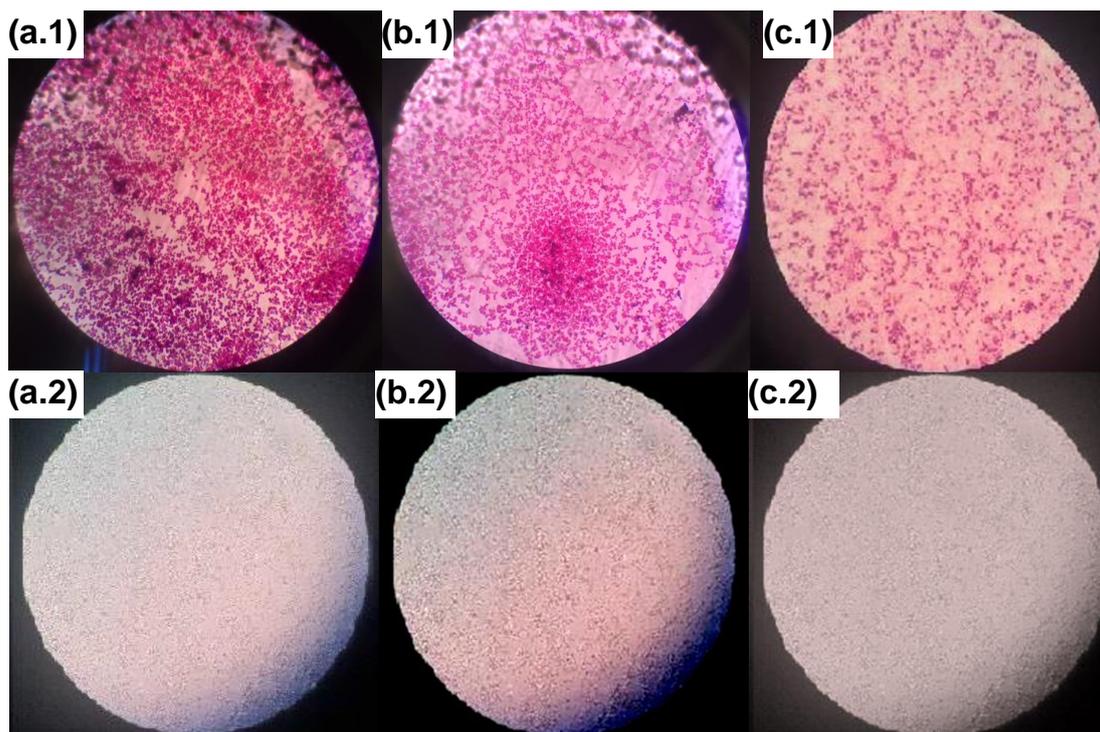


Figura 9. Fotomicrografia das lâminas das formulações não estéreis a partir das respectivas placas de ágar sangue (bactérias) LNC 1 (a.1), LNC 2 (b.1) e LNC 3 (c.1) e de ágar *Sabouraud* (fungos leveduriformes) LNC 1 (a.2), LNC 2 (b.2) e LNC 3 (c.2), visualizadas em microscópio (aumento de 1000x).

5.1.2.3 Identificação da contaminação bacteriana e fúngica através de turbidimetria

A contaminação por microrganismos nas formulações LNC 1, LNC 2 e LNC 3, estéreis e não estéreis, foi realizada complementarmente pela técnica de turbidimetria. A técnica é baseada na determinação de mudanças na absorção de radiação na região de 370 nm de comprimento de onda em um meio de cultura decorrente da contaminação microbiana²³². Os resultados obtidos estão representados na Tabela 10. As concentrações foram calculadas a partir dos diferentes volumes de formulação (1, 5 e 10 μ L) adicionados ao meio de cultura estéril LB (1 mL). Os controles foram obtidos a partir da análise da formulação de LNC em contato com o meio de cultura estéril LB, sem incubação.

Tabela 10. Análise de turbidimetria para todas as formulações avaliadas juntamente com seus respectivos controles ($\lambda=370$ nm).

Formulação	1 $\mu\text{L mL}^{-1}$	5 $\mu\text{L mL}^{-1}$	10 $\mu\text{L mL}^{-1}$
LNC 1 – não estéril	0,80 \pm 0,04*	0,88 \pm 0,01*	0,93 \pm 0,01*
LNC 1 – não estéril controle	0,22 \pm 0,01	0,36 \pm 0,02	0,57 \pm 0,02
LNC 2 – não estéril	0,35 \pm 0,02*	0,72 \pm 0,01*	0,92 \pm 0,01*
LNC 2 – não estéril controle	0,32 \pm 0,01	0,68 \pm 0,01	0,86 \pm 0,01
LNC 3 – não estéril	0,36 \pm 0,02*	0,75 \pm 0,01*	0,94 \pm 0,01*
LNC 3 – não estéril controle	0,32 \pm 0,02	0,69 \pm 0,02	0,89 \pm 0,01
LNC 1 – estéril	0,18 \pm 0,01	0,33 \pm 0,00	0,56 \pm 0,01
LNC 1 – estéril controle	0,19 \pm 0,01	0,34 \pm 0,02	0,56 \pm 0,01
LNC 2 - estéril	0,21 \pm 0,00	0,62 \pm 0,02	0,80 \pm 0,02
LNC 2 – estéril controle	0,24 \pm 0,00	0,65 \pm 0,02	0,80 \pm 0,02
LNC 3 – estéril	0,24 \pm 0,00	0,65 \pm 0,02	0,83 \pm 0,02
LNC 3 – estéril controle	0,23 \pm 0,01	0,63 \pm 0,02	0,87 \pm 0,01

*Diferença significativa ($p<0,05$) comparado ao respectivo controle. Análise de variância (ANOVA). Médias \pm desvio padrão ($n=3$).

A partir dos resultados obtidos pode-se afirmar que as formulações estéreis apresentaram valores de absorvância similares ao seus respectivos controles ($p>0,05$). Por outro lado, para as formulações não estéreis os valores da absorvância foram maiores para todas as quantidades de formulação adicionadas ao meio, quando comparados aos seus respectivos controles ($p<0,05$), indicando, mesmo que em baixas quantidades a presença de contaminantes nas amostras. Somado a isso, também foi verificado que as formulações não estéreis em questão apresentaram mudança de coloração quando comparadas aos seus respectivos controles.

Temperaturas baixas são utilizadas para inibir o crescimento de microrganismos²³³. Contudo, bactérias do tipo Gram-positivas continuam seu crescimento mesmo em baixas temperaturas, sendo classificadas como microrganismos psicotróficos²³⁴. De acordo com as normas da *International Dairy Federation* (1976)²³⁵

microrganismos psicotróficos são definidos como sendo aqueles que conseguem crescer e manter sua atividade a 7 °C ou abaixo desta temperatura, independentemente de sua temperatura ótima de crescimento (25 - 30 °C). Neste contexto, as bactérias Gram-positivas, apesar de apresentarem uma temperatura ótima de crescimento entre 35 e 37°C, conseguem crescer em ambientes com temperaturas entre 3 e 46 °C^{236,237}. Adicionalmente, esses microrganismos são resistentes e sobrevivem durante períodos prolongados quando armazenadas a temperaturas inferiores a -20 °C²³⁸. Diante disso e com a constatação da presença de bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e fungos leveduriformes nas formulações não estéreis estudadas, torna-se indispensável investigar a influência desses microrganismos na cinética de degradação das LNC, mesmo quando armazenadas a 5 °C, temperatura descrita previamente na literatura como a ideal para armazenar nanocápsulas poliméricas de PCL sem alterar sua estabilidade química⁴⁹.

Neste sentido, as LNC estéreis poderiam sofrer hidrólise química (abiótica) e as LNC não estéreis poderiam sofrer um processo de hidrólise química catalisada por enzimas– (biótica). Assim, o objetivo desta investigação foi estabelecer os mecanismos de hidrólise destas formulações.

5.1.2.4 Determinação e validação da metodologia analítica utilizada - Cromatografia por exclusão de tamanho, SEC

Após o armazenamento das formulações, o método de extração da amostra utilizado neste estudo foi adaptado do método descrito previamente por Paese e colaboradores (2017)²¹². Observações prévias²³⁹ descritas por nosso grupo de pesquisa para sistemas similares demonstraram que ao se adicionar etanol à dispersão aquosa de nanocápsulas (1:100, v/v), seguido de centrifugação, o sedimento (precipitado) é composto exclusivamente de polímero (PCL) e o sobrenadante contém os demais materiais das nanocápsulas. Considerando que oligômeros podem ser formados durante o armazenamento decorrentes da degradação da PCL, a etapa de sucessivas lavagens descrita no protocolo proposto por Paese e colaboradores (2017)²¹² foi omitida no presente estudo, sendo esta a principal modificação do método de extração. Desta forma, tanto o sobrenadante quanto o precipitado foram analisados neste estudo de tese com o objetivo de se obter informações acerca da perda de massa de todos os constituintes.

Para a validação do método, inicialmente, foi necessário conhecer a contribuição de cada componente na soma total da massa do sistema LNC analisado por cromatografia

por exclusão de tamanho (SEC). Considerando-se que todas as formulações (LNC 1, LNC 2 e LNC 3) são constituídas quimicamente pelos mesmos componentes, sendo suas diferenças baseadas apenas na proporção de PCL com diferentes massa molares (LNC 1 PCL, M_n 10.000 g mol⁻¹ 100% m/m, LNC 2 PCL, M_n 80.000 g mol⁻¹ e 10.000 g mol⁻¹, 9:1, m/m e LNC 3 PCL, M_n 80.000 g mol⁻¹ 100% m/m), analisou-se uma amostra de cada material, isoladamente, por SEC (Figura 10 (a) e (b) e Tabela 11).

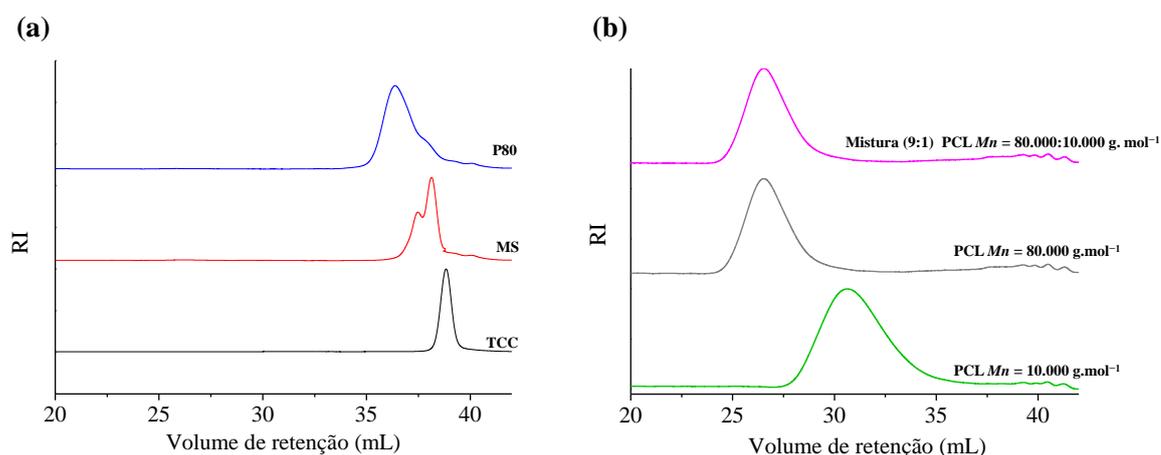


Figura 10. Perfis de distribuição de massa molar obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). (a) Polisorbato 80 (P80), monoestearato de sorbitano (MS) e triglicerídeo de ácidos cáprico e caprílico (TCC); (b) poli(ϵ -caprolactona) - PCL de diferentes massas molares constituintes das formulações LNC 1 (M_n 10.000 g mol⁻¹), LNC 2 (M_n 80.000 g mol⁻¹) e LNC 3 (mistura 9:1 M_n 80.000:10.000 g mol⁻¹).

Tabela 11. Volume de retenção (mL), massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e dispersidade (\mathcal{D}), de cada material constituinte das LNC, obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).

Material	Volume de retenção (mL)	M_n	M_w	\mathcal{D}
TCC	38,90	677	690	1,02
MS	~ 37,14 - 38,70	867	1.022	1,18
P80	35,98	1.796	2.226	1,24
PCL M_n 10.000 g mol ⁻¹	30,62	11.319	17.770	1,57
PCL M_n 80.000 e M_n 10.000 g mol ⁻¹ (9:1, m/m)	~26, 28 – 30,34	37.163	95.867	2,58
PCL M_n 80.000 g mol ⁻¹	26,53	52.072	106.612	2,05

Os resultados de massa molar obtidos por SEC, nas condições experimentais deste estudo, mostraram valores próximos aos valores teóricos para todos os constituintes da LNC. Foi possível notar um perfil de distribuição de massa molar do tipo polidisperso monomodal, com exceção do monoestearato de sorbitano (MS), que apresenta característica polidispersa multimodal. Para ambos os constituintes, triglicerídeo de ácidos cáprico e caprílico (TCC) e polissorbato 80 (P80), os valores experimentais obtidos (Tabela 11), corroboram com os valores teóricos, uma vez que para o TCC o valor teórico está entre 630 a 714 g mol⁻¹, dependendo da composição e proporção de cadeias C8 ou C10, e para o P80 o valor da massa molar teórica é de 1.310 g mol⁻¹. Por sua vez, para o monoestearato de sorbitano (MS), o valor experimental obtido (867 g mol⁻¹ – *Mn* e 1.022 g mol⁻¹ – *Mw*), apresentou variações se comparado ao valor teórico para este componente (430 g mol⁻¹).

Sabe-se que a composição qualitativa e quantitativa do monoestearato de sorbitano pode variar conforme o método de esterificação. Geralmente, a quantidade de sorbitano é constante, mas a quantidade linear de sorbitol e isosorbida pode variar conforme o fabricante²⁴⁰. Neste sentido, podemos inferir que as principais alterações entre resultados teóricos e experimentais podem estar relacionadas com os seguintes fatores: lotes diferentes de produto; técnicas e padrão utilizados; equipamentos de análise; condições analíticas e curvas de calibração. Ainda, cabe salientar que a técnica de SEC fornece valores relativos à massa molar do padrão utilizado (poliestireno), e que pode apresentar erros de exatidão (concordância com o valor verdadeiro)²⁴¹. A estrutura química do MS está representada na Figura 11.

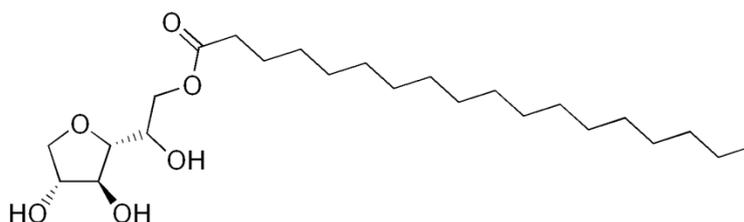


Figura 11. Estrutura química do monoestearato de sorbitano (MS).

A fim de avaliar se a variação na massa molar do monoestearato de sorbitano estaria relacionada a alguma alteração de lote do produto utilizado ou, ainda, se seria devido a uma característica intrínseca do produto fornecido pelo fabricante, foi investigada a identidade físico-química da matéria-prima. Para isso, três lotes distintos de MS (do mesmo fabricante – Sigma-Aldrich®) foram avaliados e caracterizados

quimicamente segundo análises de espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-NMR}$) e cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). Os resultados encontram-se em *Anexos* (Figuras 2A, 3A e 4A). As amostras dos três lotes analisados foram nomeadas: MS 1 (lote: MKBQ 3766V1), MS 2 (lote: 060M0142V1) e MS 3 (lote: 035V08163).

A análise dos três lotes de monoestearato de sorbitano por espectroscopia na região do infravermelho apresentou espectros com características idênticas para as três amostras analisadas (ver Figura 2A em *Anexos*). Verifica-se a presença de uma banda larga e pronunciada com máximo em 3412 cm^{-1} , referente ao estiramento dos grupos OH. Bandas também foram visualizadas em $2957 - 2916\text{ cm}^{-1}$ (estiramento de C-H de C sp^3) e em 1738 cm^{-1} referente ao estiramento de C=O (éster). A banda típica de estiramento C-H para o CHCl_3 , utilizado como solvente, também pode ser observada no espectro (3083 cm^{-1}).

O resultado obtido por ressonância magnética nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-NMR}$) para a amostra de MS mostrou espectro idêntico ao espectro fornecido pelo fabricante para esta matéria-prima (ver Figura 3A em *Anexos*). Deste modo, considera-se que os resultados obtidos estão de acordo com dados do controle de qualidade fornecidos pelo fabricante, e que não há impurezas no produto em questão.

Adicionalmente, foram avaliados os perfis de distribuição de massa molar para os três lotes diferentes de monoestearato de sorbitano (Figura 4A em *Anexos*). Os resultados de distribuição de massa molar obtidos por SEC para os três lotes analisados variaram de 775 g mol^{-1} (MS 1) a 867 g mol^{-1} (MS 3) para os valores de M_n e de 971 g mol^{-1} (MS 1) a 1.022 g mol^{-1} (MS 3) para os valores de M_w (ver Tabela 4A em *Anexos*). Esses resultados estão de acordo com a caracterização físico-química previamente descrita (Figuras 2A e 3A), ou seja, independente do lote de amostra utilizado, não há alteração nas propriedades físico-químicas do reagente em questão.

Entretanto, a partir do conjunto de resultados obtidos, não foi possível afirmar se a mistura de picos observada estaria relacionada à identidade do monoestearato de sorbitano ou à formação de compostos de baixa massa molar oriundos da degradação desse éster graxo. Dessa forma, sabendo-se que a degradação deste componente está diretamente relacionada ao índice de acidez, foram realizadas análises para a determinação de acidez dos três lotes de MS.

O procedimento de titulação para a determinação do índice de acidez foi executado pelo método adaptado do Instituto Adolfo Lutz²¹⁵ conforme descrito na seção 4.2.7. Os valores do índice de acidez obtidos para os três lotes da matéria-prima analisada variaram de 234 ± 2 mg KOH g⁻¹ (lote: MKBQ 3766V1), 252 ± 12 mg KOH g⁻¹ (lote: 060M0142V1) e 258 ± 4 mg KOH g⁻¹ (lote: 035V08163). Considerando-se que o fabricante fornece como valor padrão um índice de acidez de 200 - 215 mg KOH g⁻¹ (Sigma-Aldrich®), pode-se concluir que as amostras de matéria-prima dos lotes analisados podem ter iniciado um processo de degradação, visto que os mesmos apresentaram acréscimos de 8 a 19% no índice de acidez, se comparados aos valores fornecidos pelo fabricante. Isso, possivelmente, também está associado ao aparecimento da mistura de picos para este componente quando analisado por SEC. Entretanto, esse resultado era previsível, uma vez que ésteres graxos são extremamente sensíveis a fatores como tempo de armazenamento, aquecimento e incidência de luz, o que provoca a formação de ácidos graxos livres em maior ou menor proporção²¹⁵.

Conforme evidenciado na Tabela 11, é possível observar que os constituintes TCC, MS e P80 da LNC apresentam volumes de retenção muito próximos, o que pode ocasionar a eluição da coluna cromatográfica no mesmo tempo de retenção. Essa hipótese está fundamentada no fato de que, quando componentes com volume de retenção muito próximos estão sendo analisados e, além disso, apresentam algum tipo de afinidade química, é possível que não sejam separados totalmente durante uma corrida cromatográfica.

Considerando-se o exposto, foi proposto avaliar o perfil de SEC para os materiais constituintes da LNC combinados entre si. Para isso, foram preparadas e analisadas formulações de nanoesferas (NS) (ausência de TCC) e nanoemulsão (NE) (ausência da PCL), com o objetivo de compará-las com a formulação LNC (Figura 12 e Tabela 12).

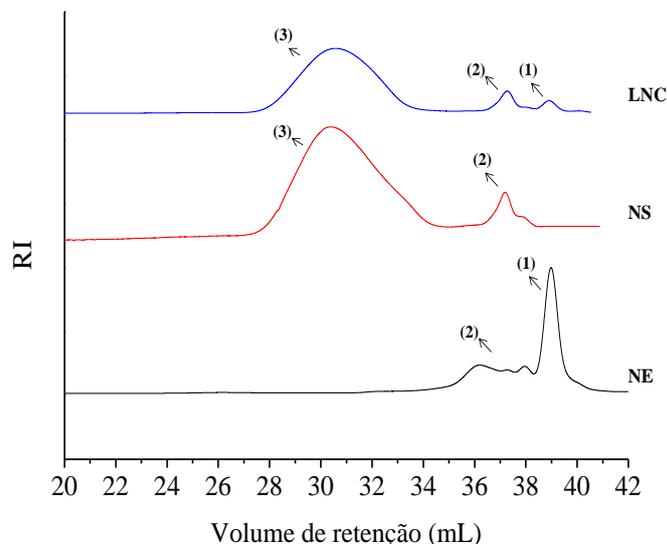


Figura 12. Perfis de distribuição de massa molar das nanodispersões por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). *LNC - pico (1) = TCC; pico (2) = mistura de P80 + MS; pico (3) = PCL; NS - pico (1) = ausente; pico (2) = mistura de P80 + MS; pico (3) = PCL; NE – pico (1) = TCC; pico (2) = mistura dos componentes moleculares da LNC (P80 + MS); pico (3) = ausente.

Tabela 12. Volume de retenção (mL), massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e dispersidade (\mathcal{D}), das nanodispersões obtidas a partir da mistura dos constituintes das LNC por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).

Formulação	Picos obtidos por SEC	Volume de retenção (mL)	M_n	M_w	\mathcal{D}
LNC	(1)	38,09	579	661	1,07
	(2)	37,28	1.647	1.779	1,08
	(3)	30,36	32.987	48.475	1,46
NS	(2)	37,28	1.214	1.505	1,24
	(3)	30,36	31.890	48.050	1,51
NE	(1)	38,09	533	572	1,07
	(2)	37,28	1.212	1.446	1,19

Para a NS foi possível observar a presença de um pico bem definido, com volume de retenção em 30,36 mL (referente à PCL) e um pico não tão intenso, com volume de retenção em 37,28 (referente à mistura P80 + MS) (Figura 12 e Tabela 12). Ainda, os valores de massa molar para os picos identificados como sendo da PCL (pico 3) e da

mistura P80 + MS (pico 2) foram de $31.890 \text{ g mol}^{-1} - M_n$; $48.050 \text{ g mol}^{-1} - M_w$ e $1.214 \text{ g mol}^{-1} - M_n$; $1.505 \text{ g mol}^{-1} - M_w$, respectivamente (Tabela 12). Complementarmente, o valor de dispersidade (\mathcal{D}) obtido para o pico (2) da NS (referente à mistura de P80 + MS) foi de 1,24, comprovando a presença de dois componentes no pico avaliado.

Quando se analisa o perfil de distribuição referente à NE, o qual é obtido quando todos os componentes moleculares da LNC são misturados, é possível assegurar que esses constituintes (P80, MS e TCC) são eluídos da coluna cromatográfica com volumes de retenção entre 37,28 e 38,09 mL. Entretanto, foi observada a presença de um pico adicional com volume de retenção em 38,09 mL, o qual não foi detectado para a formulação NS. Dessa forma, é possível assegurar que este pico é, de fato, referente ao TCC. Além disso, a distribuição de massa molar referente a este pico apresentou valores de $579 \text{ g mol}^{-1} - M_n$ e $661 \text{ g mol}^{-1} - M_w$, os quais convergem para o resultado exposto anteriormente quando esse componente é analisado isoladamente por SEC (Figura 9a). Por sua vez, os resultados de distribuição de massa molar obtidos a partir da integração da mistura de picos referente ao MS + P80, apresentam valores de $1.212 \text{ g mol}^{-1} - M_n$ e $1.446 \text{ g mol}^{-1} - M_w$, os quais corroboram os resultados mostrados para o pico (2) da NS.

Por fim, os resultados do perfil de distribuição de massa molar obtidos por SEC para a LNC, mostraram a presença de três picos principais (Figura 12). Esses picos apresentaram volumes de retenção de 30,36 mL (referente à PCL), de 37,28 mL (referente à mistura MS + P80) e de 38,09 mL (referente ao TCC). As massas molares e os volumes de retenção obtidos para cada componente estão descritos na Tabela 12. Diante dos resultados provenientes das comparações, foi considerado que a mistura dos dois picos se refere aos componentes moleculares (P80 e MS), que são eluídos no mesmo tempo de retenção.

5.1.2.5 Compatibilidade do método de separação escolhido para a análise das LNC

Complementarmente foi avaliada a compatibilidade do método de separação escolhido para análise das LNC. Para tanto, foram analisados os perfis de distribuição de massa molar para as amostras obtidas a partir de dois diferentes métodos de isolamento: separação por centrifugação e por evaporação de solvente. Os resultados dos métodos testados para a separação das LNC (e posterior análise por SEC) encontram-se na Figura 13. Além disso, é importante destacar que, para o método de separação por centrifugação, os perfis de ambos (sobrenadante e precipitado) estão representados.

Por outro lado, como no sobrenadante estão presentes apenas os constituintes secundários da LNC (não há PCL), os picos foram integrados em conjunto. Em contrapartida, pode ser afirmado que, no precipitado, estão presentes a PCL e parte dos componentes que têm maior afinidade com a parede das nanocápsulas, uma vez que os componentes hidrofóbicos presentes no núcleo das nanocápsulas (TCC e MS) podem estar interagindo entre si e/ou com a PCL, tanto por ligações de hidrogênio quanto de *van der Waals*. Baseando-se nessa hipótese, para as análises cinéticas realizadas durante o tempo de armazenamento, todos os picos que estiverem presentes no sobrenadante serão integrados em conjunto, a fim de prever a perda de massa total do sistema LNC.

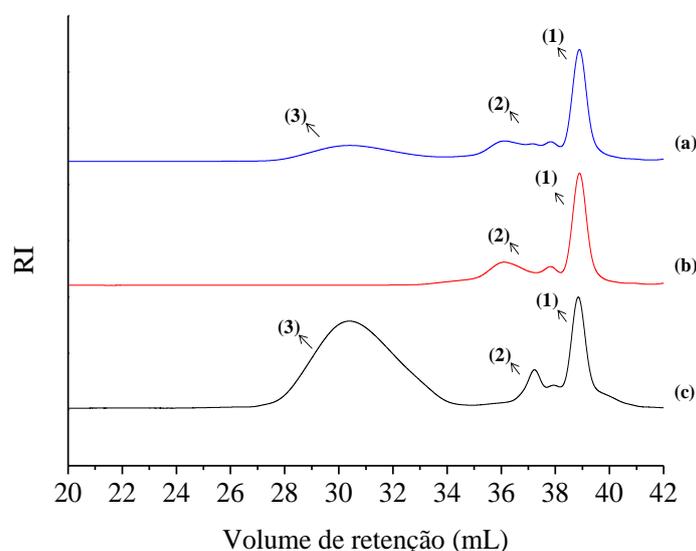


Figura 13. Perfis de massa molar para as LNC a partir de diferentes técnicas de isolamento, obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). (a): rotaevaporado; (b) sobrenadante extraído; (c) precipitado extraído.

Tabela 13. Volume de retenção (mL), massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e dispersidade (\mathcal{D}) das formulações de nanocápsulas separadas por dois diferentes métodos de isolamento, a partir de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). Inicialmente, os picos (1), (2) e (3) são equivalentes à massa molar do TCC, da mistura dos constituintes secundários MS e P80 e da PCL, respectivamente. (n=3).

Formulação	Picos obtidos por SEC	Volume de retenção (mL)	M_n	M_w	\mathcal{D}
LNC 1 – rotaevaporado	(1)	38,09	594	688	1,16
	(2)	37,28	1.688	1.809	1,07
	(3)	30,36	32.899	48.199	1,47
LNC 1 – sobrenadante extraído	(1)	~ 36,13 - 38,09	759	1.400	1,84
LNC 1 – precipitado extraído	(1)	38,09	580	672	1,16
	(2)	37,28	1.685	1.744	1,04
	(3)	30,36	32.914	48.201	1,46

A partir dos resultados obtidos, demonstrou-se que os dois métodos de isolamento (centrifugação e rotaevaporação) podem ser utilizados com sucesso. Para ambos os métodos testados, pode-se inferir que não ocorrem mudanças nos perfis de massa molar dos constituintes da LNC, bem como no volume de retenção, independente do procedimento de isolamento utilizado (Tabela 13).

Entretanto, pode-se observar uma diminuição da intensidade do pico relativo à PCL (cujo volume de retenção está em 30,36 mL) quando a amostra rotaevaporada é analisada sem realizar-se a separação dos componentes de maior e menor massa molar (precipitado e sobrenadante, respectivamente). Isso pode estar relacionado ao fato de que, quando se realiza a separação do precipitado e do sobrenadante pelo método da centrifugação, há um aumento da sensibilidade da análise em ambos os meios, visto que não ocorre a interferência das cadeias maiores no sobrenadante e das cadeias menores no precipitado.

Ainda, como o objetivo deste trabalho está fundamentado em uma análise aprofundada da cinética de degradação, considerou-se a separação entre precipitado e sobrenadante, a fim de tornar os valores das massas molares mais precisos. A escolha pelo método da centrifugação também se deve à fácil reprodutibilidade e acessibilidade do processo, uma vez que, ao contrário da rotaevaporação, não é necessário considerar os fatores tempo e temperatura no preparo das amostras.

Adicionalmente, foi avaliada a integridade da amostra quando a mesma é submetida à secagem após o isolamento. Para tanto, dois métodos de secagem foram avaliados: em dessecador (temperatura ambiente) e em estufa (a 30 °C), ambos durante 24 h. Os resultados dos perfis de distribuição de massa molar obtidos por SEC para ambas as amostras, encontram-se na Figura 14.

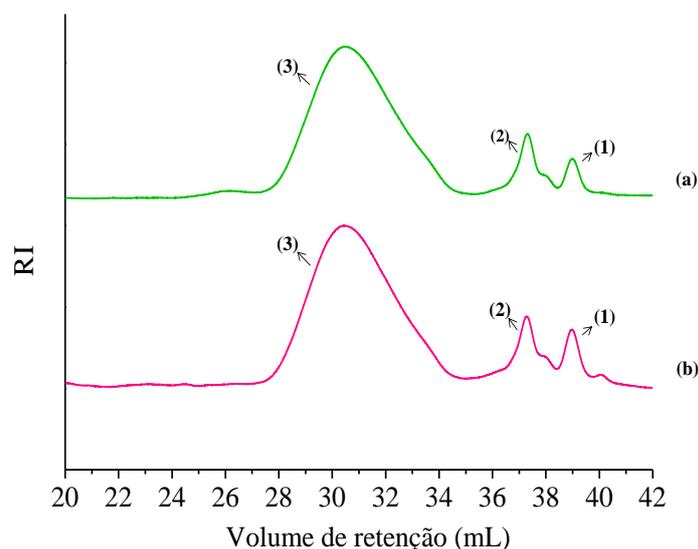


Figura 14. Perfis de distribuição de massa molar para a LNC a partir de diferentes técnicas de secagem após o isolamento da amostra, obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). (a) estufa (30 °C); (b) dessecador (temperatura ambiente).

Tabela 14. Volume de retenção (mL), massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e dispersidade (\mathcal{D}), das formulações de nanocápsulas obtidos a partir de diferentes métodos de secagem da amostra. Técnica: cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). Os picos (1), (2) e (3) são equivalentes à massa molar do TCC, à mistura de MS + P80 e à PCL, respectivamente. (n=3).

Formulação	Picos obtidos por SEC	Volume de retenção (mL)	M_n	M_w	\mathcal{D}
LNC – estufa	(1)	38,09	589	685	1,16
	(2)	37,28	1.679	1.760	1,05
	(3)	30,36	32.658	48.099	1,47
LNC – dessecador	(1)	38,09	593	690	1,16
	(2)	37,28	1.702	1.805	1,06
	(3)	30,39	32.865	48.395	1,47

A partir dos resultados de distribuição de massa molar obtidos por SEC e apresentados na Figura 14 e Tabela 14, foi possível inferir que ambos os métodos de secagem da amostra são indicados, uma vez que, ao analisar o perfil de distribuição de massa molar, bem como os volumes de retenção e os respectivos valores de M_n , M_w e dispersidade (\mathcal{D}), não é observada nenhuma modificação referente à massa molar desses sistemas quando se compara ambos os métodos.

5.1.2.6 Determinação da distribuição de massa molar das LNC antes e após a esterilização

Após conhecer o perfil de distribuição de massa molar de cada constituinte da LNC na técnica escolhida e validar a metodologia de isolamento e de secagem da amostra, foi necessário determinar a distribuição de massa molar das LNC antes e após a esterilização. O objetivo desta análise detalhada foi verificar se o processo de esterilização não causa alterações de perda de massa em nenhum dos constituintes das formulações avaliadas. Os resultados estão apresentados quanto aos valores obtidos para o precipitado e o sobrenadante das LNC, após o processo de extração (Figura 15).

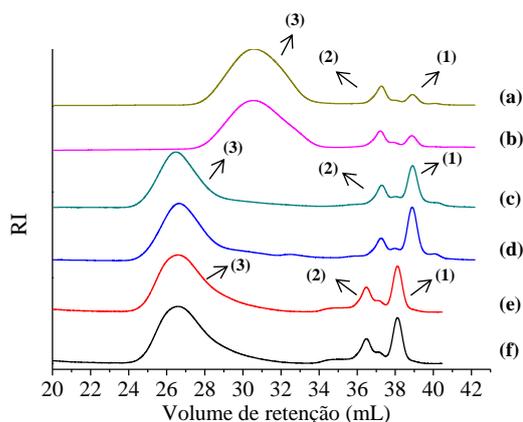
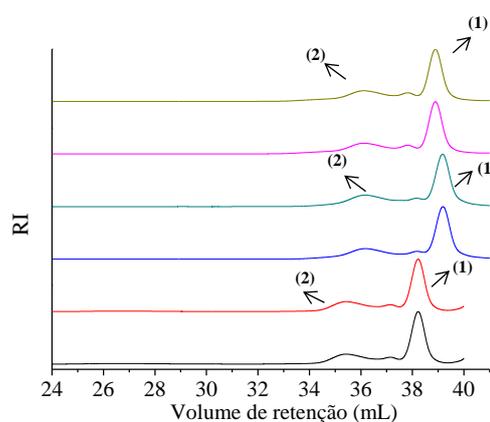
(1) precipitado**(2) sobrenadante**

Figura 15. Perfis de distribuição de massa molar para as LNC, antes e após a esterilização: 1) precipitado e 2) sobrenadante, obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). Em ambos os perfis, (a) = LNC 1 não estéril; (b) = LNC 1 estéril; (c) = LNC 2 não estéril; (d) = LNC 2 estéril; (e) = LNC 3 não estéril; (f) = LNC 3 estéril. Em (1), os picos (1), (2) e (3) são equivalentes à massa molar do TCC, MS + P80 e PCL, respectivamente.

A partir da visualização dos picos (1), (2) e (3), referentes à massa molar do TCC, MS + P80 e PCL (precipitado), e dos picos (1) e (2) (sobrenadante), foi possível observar que, aparentemente, não há alteração entre os perfis de distribuição antes e após a esterilização (Figura 15 (1) e (2)). Além disso, para comprovar que não houve perda de massa para nenhum dos constituintes da LNC, foi realizada uma análise detalhada da massa molar referente a cada pico (Tabela 15). O objetivo desta análise foi comprovar que, além da estabilidade química relativa à PCL ($M_n = 80.000 \text{ g mol}^{-1}$) após a esterilização (já relatada anteriormente por nosso grupo de pesquisa²¹²), os outros constituintes (TCC, MS e P80) avaliados neste trabalho, também não seriam afetados pelo processo de esterilização.

Tabela 15. Volume de retenção (mL), massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e dispersidade (\bar{D}) das LNC (precipitado), antes e após esterilização, a partir de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). Os picos (1), (2) e (3) são equivalentes à massa molar do TCC, MS + P80 e PCL, respectivamente. (n=3), análise de variância (ANOVA).

Formulação	Picos obtidos por SEC	Volume de retenção (mL)	M_n	M_w	\bar{D}
LNC 1 - não estéril	(1)	38,09	579	661	1,14
	(2)	37,28	1.647	1.779	1,08
	(3)	30,36	32.899	48.199	1,52
LNC 1 - estéril	(1)	38,09	576	631	1,09
	(2)	37,28	1.645	1.843	1,12
	(3)	30,36	32.030	47.630	1,48
LNC 2 – não estéril	(1)	38,09	637	731	1,15
	(2)	37,28	1.557	1.633	1,05
	(3)	26,94	72.660	153.100	2,10
LNC 2 - estéril	(1)	38,09	688	725	1,05
	(2)	37,28	1.710	1.730	1,01
	(3)	26,94	71.590	150.900	2,11
LNC 3 – não estéril	(1)	38,11	650	720	1,11
	(2)	36,50	1.712	2.010	1,17
	(3)	26,61	67.000	158.400	2,36
LNC 3 - estéril	(1)	38,11	649	715	1,10
	(2)	36,50	1.740	2.030	1,17
	(3)	26,61	65.800	155.900	2,37

Para as formulações LNC 1, LNC 2 e LNC 3 foi possível observar que os valores de massa molar obtidos para os picos (1), (2) e (3) se mantiveram inalterados, antes e após

a esterilização (Tabela 15). A partir desses resultados, pode-se afirmar que não houve redução significativa ($p > 0,05$) da massa molar referente aos picos (1) e (2), bem como para o pico (3), referente à PCL. Esses resultados indicam que o processo de esterilização pode ser realizado com segurança para este tipo de estrutura nanoparticulada e que a identidade química de todos os constituintes e do polímero são mantidas. Complementarmente, o sobrenadante foi coletado e avaliado por SEC. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 15 (2) e Tabela 16.

Tabela 16. Volume de retenção (mL), massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e dispersidade (\mathcal{D}) das LNC (sobrenadante) preparadas com diferentes proporções de parede polimérica, antes e após esterilização, a partir de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). Inicialmente, os picos (1) e (2) são equivalentes à massa molar do TCC e MS + P80, respectivamente. ($n=3$), análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey ($p < 0,05$).

Formulação	Picos obtidos por SEC	Volume de retenção			
		(mL)	M_n	M_w	\mathcal{D}
LNC 1 – não etéril	(1)	38,09	490	661	1,10
	(2)	37,28	2.020	1.779	1,08
LNC 1 – estéril	(1)	38,09	574	631	1,16
	(2)	37,28	1.685	1.843	1,09
LNC 2 – não estéril	(1)	38,09	657	723	1,10
	(2)	37,28	1.653	1.832	1,11
LNC 2 – estéril	(1)	38,09	688	725	1,05
	(2)	37,28	1.710	1.930	1,13
LNC 3 – não estéril	(1)	38,11	678	905	1,33
	(2)	36,50	1.690	2.000	1,18
LNC 3 - estéril	(1)	38,11	656	902	1,37
	(2)	36,50	1.740	1.980	1,14

A partir da análise dos resultados obtidos para os sobrenadantes avaliados, foi possível observar que, após a esterilização de ambas as amostras de LNC (constituídas pelas diferentes proporções de PCL), não houve perda de massa significativa ($p > 0,05$),

referente aos constituintes de menor massa molar. Esses dados corroboram os resultados obtidos para os respectivos precipitados, mostrados anteriormente.

Esses resultados podem ser considerados altamente promissores, pois permitem assegurar que nanocápsulas poliméricas constituídas tanto de PCL M_n 10.000 g mol^{-1} , quanto da mistura PCL M_n 80.000 e M_n 10.000 g mol^{-1} (9:1, m/m) podem ser esterilizadas, permanecendo estáveis quimicamente. Em uma mesma perspectiva, esses resultados somam-se àqueles obtidos e relatados por Paese e colaboradores (2017)²¹², os quais avaliaram a estabilidade química da PCL M_n 80.000 g mol^{-1} diante do mesmo processo de esterilização. Ainda, é possível afirmar que, além da estabilidade química relacionada à parede polimérica, a qual foi avaliada previamente por Paese e colaboradores (2017)²¹², os outros constituintes também não sofrem alterações de massa após o processo de esterilização, conforme demonstrado no presente estudo.

5.1.2.7 Determinação do grau de cristalinidade dos materiais constituintes das LNC e das formulações, antes e após a esterilização

A Figura 16 mostra os difratogramas de raios-x e a Tabela 17 os resultados de cristalinidade obtidos por difração de raios-x (DRX), conforme descrito no item 4.2.4. O objetivo desta análise foi o de investigar a relação entre o grau de cristalinidade e as diferentes massas molares da PCL comercial constituinte da parede polimérica das formulações de LNC, bem como das formulações LNC 1, LNC 2 e LNC 3, antes e após a esterilização.

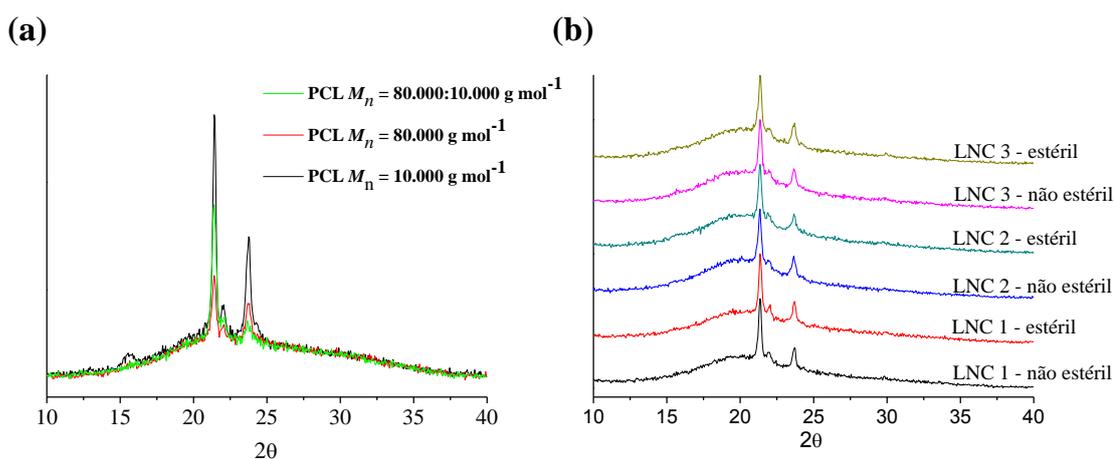


Figura 16. Difração de raios-x (a) PCL de diferentes massas molares constituintes das formulações LNC 1 (M_n 10.000 g mol^{-1}), LNC 2 (M_n 80.000 g mol^{-1}) e LNC 3 (mistura 9:1 M_n 80.000:10.000 g mol^{-1}). (b) Formulações de LNC, estéreis e não estéreis.

Tabela 17. Índice de cristalinidade das amostras de PCL comercial de diferentes massas molares e das formulações de LNC, antes e após a esterilização.

Amostra/material	Índice de cristalinidade (%)
LNC 1 – não estéril	65,9
LNC 1 – estéril	65,6
LNC 2 – não estéril	59,2
LNC 2 – estéril	59,6
LNC 3 – não estéril	62,8
LNC 3 – estéril	63,4
PCL 1*	83,1
PCL 2**	78,9
PCL 3***	64,1

* PCL 1 = M_n 10.000 g mol⁻¹

** PCL 2 = M_n 80.000 g mol⁻¹

*** PCL 3 = mistura 9:1 M_n 80.000:10.000 g mol⁻¹

A Figura 16 mostra os espectros de difração de raios-x para as amostras de PCL comercial (a) e para as formulações de LNC, antes e após a esterilização (b). Observa-se que a PCL apresenta um padrão de raios-X com dois picos de reflexão cristalina a $2\theta = 21-22^\circ$ e $23 - 24^\circ$, os quais correspondem a (110) e (220) dos planos cristalográficos na forma ortorrômbica, respectivamente. Adicionalmente, pode-se observar que após o processo de esterilização os picos não foram deslocados para ângulos menores e a distância entre os cristalitos não foi modificada. Quando comparados os resultados dos índices de cristalinidade para as amostras LNC 2 e LNC 3, pode-se observar um menor índice de cristalinidade para a LNC 2 (59,2%) com relação à LNC 3 (62,5%) (Tabela 17). Esse resultado está de acordo com o fenômeno de plastificação que foi relatado previamente na literatura^{242,243}, mostrando que a presença da PCL de menor massa molar ($M_n = 10.000$ g mol⁻¹) junto à PCL de maior massa molar ($M_n = 80.000$ g mol⁻¹) na LNC 2, atuou como plastificante, diminuindo a cristalinidade da amostra. Além disso, a diminuição do índice de cristalinidade para as formulações de nanocápsulas (Figura 16 (b)) quando comparadas com as amostras de PCL comercial (Figura 16 (a)), também poderia ser explicada pela ocorrência do fenômeno de plastificação, uma vez que os

constituintes de menor massa molar presentes nas LNC estariam atuando como agentes plastificantes.

5.1.2.8 Avaliação da estabilidade química e da cinética de degradação das LNC (estéreis e não estéreis), armazenadas a 5 °C

Análises de perda de massa foram realizadas a fim de avaliar a influência das condições de armazenamento na estabilidade química e na cinética de degradação das LNC (estéreis e não estéreis, com diferentes composições de parede polimérica - LNC 1, LNC 2 e LNC 3). As análises foram realizadas pela técnica da cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).

Os resultados dos perfis de distribuição de massa molar para as formulações (precipitado), LNC 1 – não estéril (a) e estéril (b); LNC 2 – não estéril (c) e estéril (d) e LNC 3 – não estéril (e) e estéril (f), armazenadas a 5 °C e avaliadas durante 0, 10, 15, 30 e 60 dias, encontram-se na Figura 17.

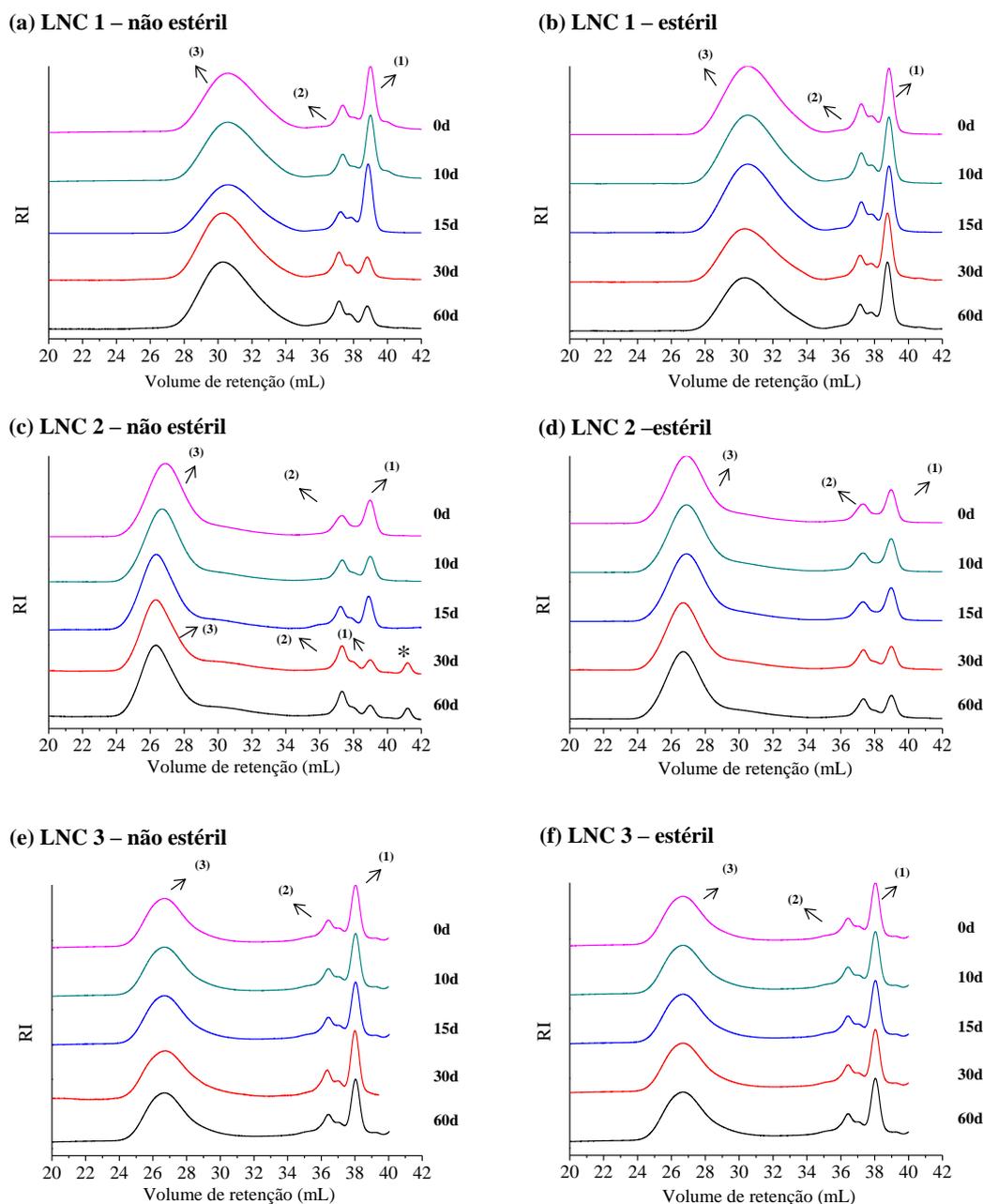


Figura 17. Perfis de distribuição de massa molar para as formulações LNC 1, LNC 2 e LNC 3, não estéreis (a, c e e) e estéreis (b, d e f), armazenadas a 5 °C, durante 60 dias.

Resultados obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) para o precipitado extraído. Inicialmente, os picos (1), (2) e (3) são equivalentes à massa molar do TCC, MS + P80 e PCL, respectivamente. $n=3$.

Pode-se afirmar que todas as formulações não estéreis avaliadas apresentaram maiores modificações nos perfis de distribuição de massa molar, se comparadas às respectivas formulações estéreis. Sabendo-se que os picos (1) e (2) são referentes aos constituintes TCC (pico 1) e à mistura MS + P80 (pico 2), pode-se sugerir que após 30 e

60 dias esses constituintes estariam iniciando um processo de degradação. No entanto, essa hipótese só pode ser confirmada após a análise cinética detalhada dos resultados de massa molar obtidos por SEC. Cabe salientar, que o surgimento desse pico de baixa massa molar, pode estar relacionado à degradação do TCC, ou ainda, à degradação das cadeias de PCL acompanhada da formação de oligômeros e/ou monômeros que estariam sendo eluídos em alto volume de retenção (> 40 mL).

Considerando que o objetivo do presente estudo é avaliar a estabilidade química do sistema LNC integralmente, os picos (1), (2) e (3) presentes no precipitado foram integrados separadamente e os resultados são referentes a cada pico isolado a fim de elucidar quanto à cinética de degradação da parede polimérica, bem como dos outros constituintes da LNC. Para isso, os resultados de massa molar foram examinados através de equações de análise cinética, avaliando-se parâmetros de taxa de degradação ($\Delta M_w\%$), de dispersidade (\mathcal{D}) e de modificações das massas molares (massa molar numérica média (M_n) e massa molar ponderal média (M_w)).

Na Figura 18, são apresentados os resultados da taxa de degradação ($\Delta M_w\%$), obtidos a partir da Equação 4, descrita no item 4.2.2 deste trabalho, para a PCL (pico 3), MS + P80 (pico 2) e TCC (pico 1).

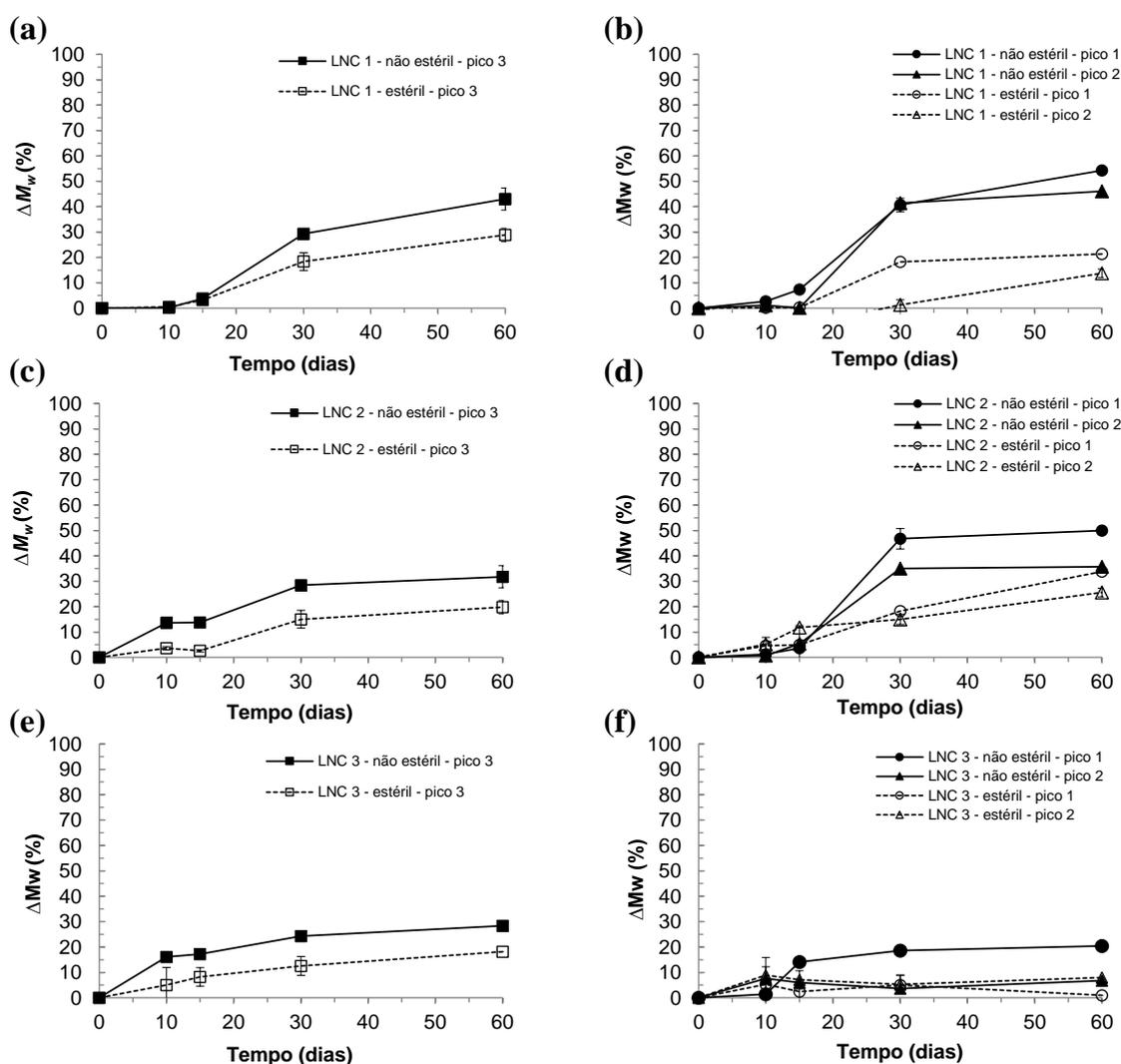


Figura 18. Perfis de perda de massa (ΔM_w %) para as formulações de nanocápsulas, não estéreis e estéreis, armazenadas a 5 °C durante 60 dias ($n = 3$). Resultados obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). Pico (1) = TCC; Pico (2) = mistura de P80 + MS; Pico (3) = PCL.

Na Figura 19, são mostradas as mudanças na massa molar numérica média (M_n) e de dispersidade (\mathcal{D}), para a PCL (pico 3). Do mesmo modo, na Figura 20, pode-se visualizar as mudanças na massa molar numérica média (M_n) para os picos 1 e 2, referentes ao TCC (pico 1) e à mistura P80 + MS (pico 2).

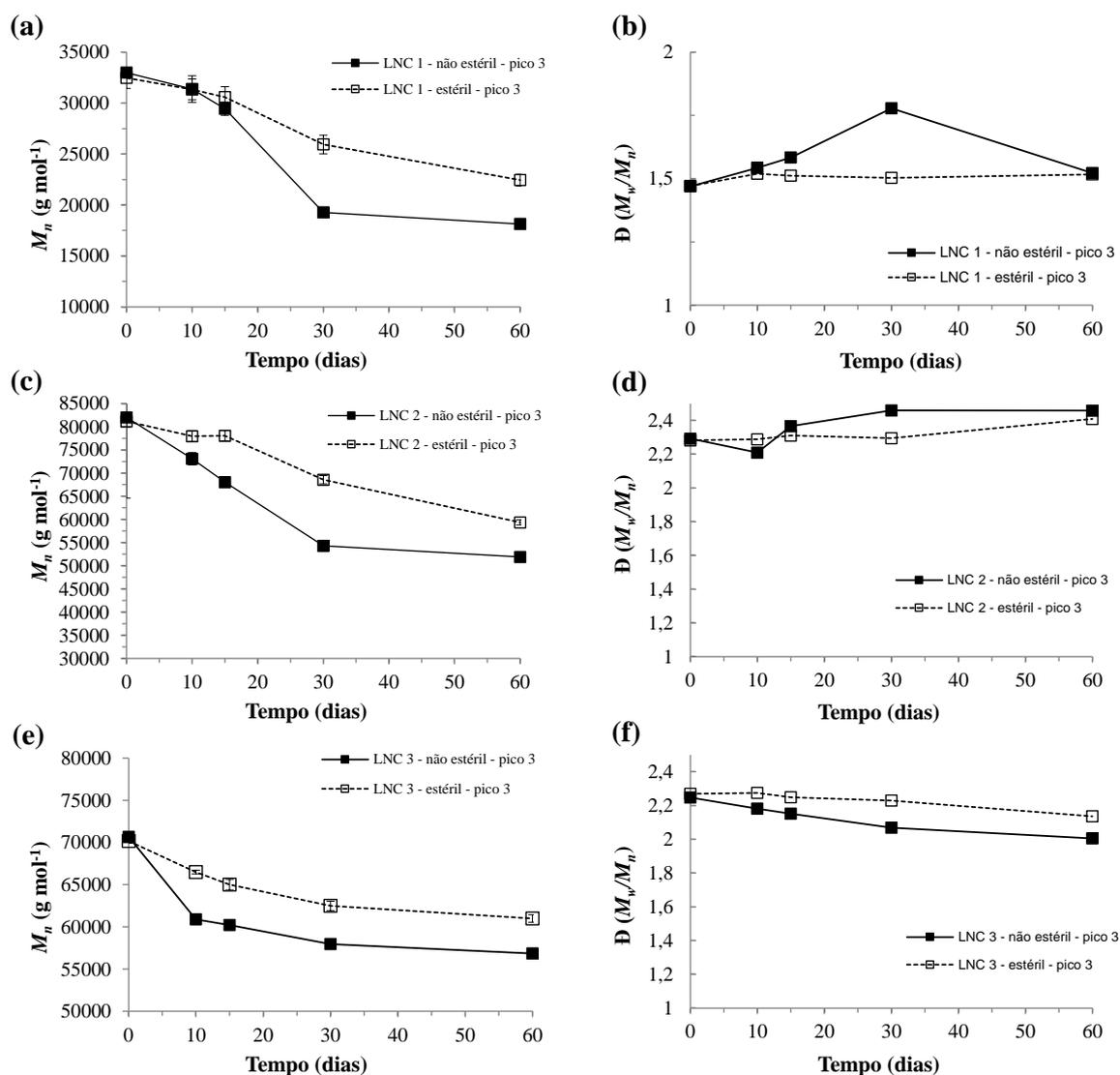


Figura 19. Mudanças na massa molar numérica média (M_n) e de dispersidade (\bar{D}), para o pico 3, referente à PCL, das formulações de nanocápsulas não estéreis e estéreis, armazenadas a 5 °C durante 60 dias (n = 3). Resultados obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).

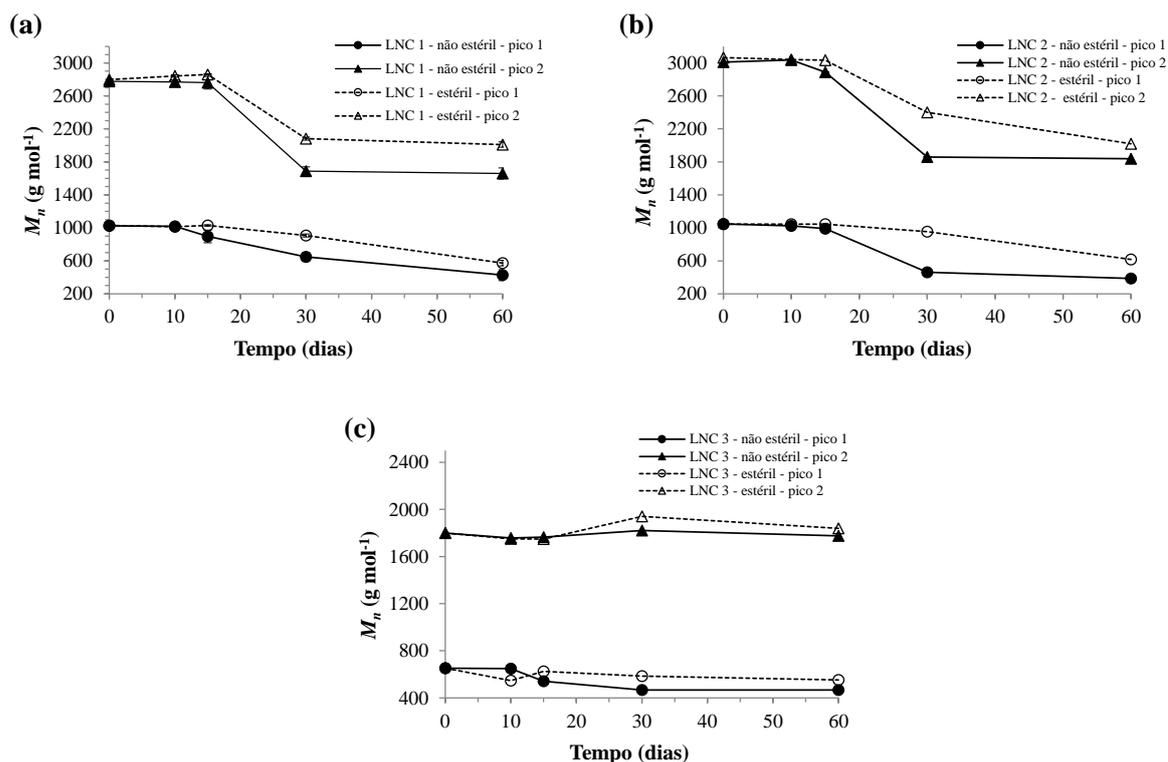


Figura 20. Mudanças na massa molar numérica média (M_n) para os picos 1 e 2, referentes ao TCC (pico 1) e à mistura P80 + MS (pico 2), das formulações de nanocápsulas não estéreis e estéreis, armazenadas a 5 °C durante 60 dias ($n = 3$).

Resultados obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).

Os resultados obtidos e mostrados nas Figuras 18, 19 e 20 foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) com dois fatores, via modelos lineares generalizados, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni ($p < 0,05$). Essa escolha está fundamentada no fato de que quando se analisa mais de um fator e além disso, deseja-se saber se há a interação entre os fatores avaliados, deve-se fazer o uso de ferramentas estatísticas específicas, nesse caso, a ANOVA multifatorial^{244,245}. Visto que a análise de variância (ANOVA) via modelos lineares generalizados mostrou interação entre os fatores "condição" (estéril e não estéril) e "tempo", para todas as variáveis analisadas (perda de massa, dispersidade (\mathfrak{D}), M_n e M_w) foi possível comparar os resultados obtidos nos diferentes tempos e condições. Nas Tabelas 5A e 6A (ver *Anexos*), são apresentados os valores de perda de massa ($\Delta M_w\%$), índice de polidispersidade (\mathfrak{D}), M_n e M_w com tratamento de análise estatística para todos os picos avaliados.

Dessa forma, foram realizadas duas análises distintas: na primeira, avaliou-se as diferenças estatísticas para cada LNC ao longo do tempo (0, 10, 15, 30 e 60 dias);

enquanto que, na segunda, foi realizada a comparação entre as LNC estéreis e não estéreis nos diferentes tempos de armazenamento (ver *Anexos* – Tabela 5A e 6A). A discussão dos resultados referentes às Figuras 18, 19 e 20 foi realizada com base nas diferenças estatísticas que se encontram descritas em *Anexos* (Tabelas 5A e 6A).

Como pode ser visualizado nas Figuras 18, 19 e 20, a estabilidade das formulações foi influenciada pela composição da parede polimérica da LNC. Nesse contexto, obteve-se o maior valor de perda de massa ($\Delta M_w\%$) para a formulação constituída da PCL de menor massa molar (LNC 1 não estéril) (Figura 18). Além disso, foi possível notar claramente que o processo de esterilização retardou o processo de degradação de todas as formulações, nas condições avaliadas.

A Figura 18 também compara a perda de massa ($\Delta M_w\%$) de todos os constituintes (pico 1, 2 e 3) das formulações não estéreis e estéreis durante o armazenamento (60 dias) a 5 °C. O pico 1 da LNC 1 não estéril e da LNC 1 estéril (Figura 18 (a)), apresentou uma perda de massa significativa ($p < 0,05$) após 30 dias (LNC 1 – não estéril = 41%; LNC 1 - estéril = 18%), aumentando esses valores após 60 dias (LNC 1 – não estéril = 54%) (LNC 1 – estéril = 24%). Para o pico 2 da LNC 1 – não estéril observou-se uma perda de massa significativa após 30 dias ($p < 0,05$) (41%), totalizando 46% após 60 dias, enquanto que para a formulação LNC 1 - estéril, apenas após 60 dias foi observado perda de massa significativa (14%) (Figura 18 (b) - Tabela 5A – ver *Anexos*). Por sua vez, o pico 3 mostrou uma perda de massa significativa ($p < 0,05$) após 30 dias (LNC 1 – não estéril = 29%; LNC 1 – estéril = 18%), aumentando esses valores para 43% (LNC 1 – não estéril) e 29% (LNC 1 - estéril), após 60 dias (Figura 18 (b) - Tabela 5A – ver *Anexos*). Além disso, os valores de dispersidade (\mathcal{D}) (Figura 19 (b)) para o pico 3 dessa formulação apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$), de 1,47 para 1,78, após 30 dias de armazenamento, o que é um indicativo da degradação do sistema LNC 1 não estéril.

Os valores de M_n para o pico 3 (PCL) da formulação LNC 1 não estéril e estéril (Figura 19 (a) e Tabela 6A em *Anexos*), apresentaram diminuição significativa após 30 dias de armazenamento ($p < 0,05$) (LNC 1 não estéril - $M_n = 42\%$; LNC 1 estéril - $M_n = 20\%$). Do mesmo modo, para o pico 2 (Figura 20 (a) e Tabela 6A em *Anexos*), observou-se que após 30 dias ocorreu uma variação significativa dos valores de M_n obtidos ($p < 0,05$), representando uma diminuição de 39% e 26%, para as formulações LNC 1 não estéril e LNC 1 estéril, respectivamente. Por outro lado, para o pico 1 da LNC 1 não estéril (Figura 19 (a) e Tabela 6A em *Anexos*) foi possível observar que já nos primeiros 15 dias ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de cerca de 13% dos valores de M_n

permanecendo constante até 30 dias ($p>0,05$). Por sua vez, para a mesma formulação estéril, somente após 30 dias observou-se redução significativa nos valores de M_n (12%).

Para a LNC 2, nos primeiros 10 dias de armazenamento, o pico 3 apresentou uma perda de massa significativa ($p<0,05$) (14%), enquanto que para a mesma formulação estéril, somente após 30 dias ocorreu uma perda de massa significativa para o mesmo pico (15%). Após 60 dias, esses valores foram de 32% e 20%, para as formulações LNC 2 não estéril e estéril, respectivamente (Figura 18 (c) - Tabela 5A – ver *Anexos*). Por sua vez, os picos 1 e 2 apresentaram uma perda de massa significativa após 30 dias para ambas as formulações. Após 60 dias, a perda de massa para o pico 1 variou de 34 e 50% para as formulações de LNC 2, estéril e não estéril, respectivamente, enquanto que para o pico 2 os valores de perda de massa variaram de 26 a 36% (Figura 18 (d) - Tabela 5A – ver *Anexos*).

Os resultados de M_n para a formulação LNC 2 estão representados nas Figuras 19 e 20. Pode-se observar que para a formulação LNC 2 não estéril, o pico 3 (Figura 19 (c) e Tabela 6A em *Anexos*), apresentou uma diminuição significativa ($p<0,05$) de 28% após 30 dias. Por outro lado, para a mesma formulação estéril, os valores de M_n apresentaram uma redução de seus valores de 9%. Ainda, para o pico 2 (Figura 20 (b) e Tabela 6A em *Anexos*) pode-se observar uma diminuição de cerca de 38% e 22% para as formulações, LNC 2 não estéril e LNC 2 estéril, respectivamente após 60 dias. Com relação ao pico 1 da formulação LNC 2, pode-se observar que para a formulação não estéril ocorreu uma diminuição de cerca de 56% após 30 dias ($p<0,05$), mantendo-se constante até 60 dias ($p>0,05$). Contrariamente, para a formulação estéril observou-se que, somente após 60 dias, os valores de M_n para o pico 1 diminuíram significativamente ($p<0,05$), totalizando uma redução de cerca de 41% ao final de 60 dias de armazenamento.

A formulação constituída da PCL de maior massa molar (LNC 3) mostrou uma maior estabilidade quanto aos picos 1 e 2, uma vez que para a formulação LNC 3 não estéril pode-se observar que somente o pico 1 apresentou perda de massa significativa após 30 dias de armazenamento, enquanto que o pico 2 não apresentou perda de massa significativa para o período avaliado ($p>0,05$) (Figura 18 (f) - Tabela 5A – ver *Anexos*). Ainda, para a formulação estéril, as massas molares de ambos os picos, 1 e 2, permaneceram inalteradas após 60 dias de armazenamento ($p>0,05$). Muito embora a formulação não estéril tenha apresentado uma pequena redução no valor de perda de massa para o pico 1, destaca-se o fato de que 80% da massa molar inicial do pico 1 manteve-se inalterada após 60 dias de armazenamento. Corroborando esses dados, pode-

se observar que o pico referente à PCL (pico 3) para a formulação não estéril apresentou uma perda de massa significativa ($p < 0,05$) nos primeiros 10 dias de armazenamento (16%), enquanto que para a mesma formulação estéril somente após 30 dias foi observada uma perda de massa significativa ($p < 0,05$) (12,5%). Ainda, após 60 dias, os valores de perda de massa variaram de 28 a 18% para a formulação LNC 3 não estéril e estéril, respectivamente (Figura 18 (e) - Tabela 5A – ver *Anexos*).

Ao observar os valores de M_n para o pico 3 (PCL) da formulação LNC 3 (Figura 19 (e) - Tabela 6A – ver *Anexos*), nota-se que ao contrário das formulações LNC 1 e LNC 2, já nos primeiros 10 dias ocorreu uma diminuição significativa (14%) ($p < 0,05$) da massa molar para a PCL (pico 3). No entanto, cabe salientar, que após essa redução inicial, esses resultados permaneceram constantes até 60 dias, para ambas as formulações ($p > 0,05$). Nesse sentido, os valores de M_n para o pico 3 da formulação não estéril reduziram cerca de 14%, enquanto que para a formulação estéril a redução foi de 5% ao final de 60 dias de armazenamento. Adicionalmente, ao observar-se os resultados de M_n para os picos 1 e 2 (Figura 20 (c) - Tabela 6A – ver *Anexos*), nota-se que os valores de M_n para o pico 2 permaneceram inalterados durante o período avaliado ($p > 0,05$) para ambas as formulações. Por sua vez, o pico 1 para a formulação não estéril apresentou redução significativa dos valores de M_n nos primeiros 15 dias ($p < 0,05$) de cerca de 17%, enquanto que os valores de M_n para o pico 1 da formulação estéril permaneceram inalterados durante todo o período avaliado ($p > 0,05$).

Em resumo, a estabilidade das formulações foi influenciada pela composição da parede polimérica da LNC. Nesse contexto, obteve-se o maior valor de perda de massa para a formulação constituída da PCL de menor massa molar (LNC 1). Além disso, foi possível notar claramente que o processo de esterilização retardou o processo de degradação de todas as formulações nas condições avaliadas.

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que a maior perda de massa observada para as formulações de LNC não estéreis poderia ser explicada pelo fato de que a hidrólise estaria ocorrendo nos terminais da cadeia, enquanto que em meio abiótico (LNC estéril), estaria ocorrendo uma hidrólise aleatória das ligações ésteres. Além disso, a maior estabilidade das formulações estéreis pode ser atribuída à ausência de fatores bióticos que poderiam auxiliar na degradação através da hidrólise passiva das ligações ésteres, uma vez que é sabido que os fatores bióticos influenciam na degradação de poliésteres alifáticos^{166,172,246–250} e, especificamente, na degradação da PCL^{186,196,251–254}. Nesse sentido, cabe salientar que, até a publicação dos dados apresentados neste trabalho,

a influência exercida por fatores bióticos e abióticos no armazenamento de nanopartículas poliméricas ainda não havia sido investigada.

Adicionalmente, os resultados da perda de massa também indicam uma forte influência da parede polimérica (pico 3) na estabilidade das formulações de LNC. Nesse sentido, foi verificado que nos primeiros dias de hidrólise (15 dias), as formulações LNC 2 e LNC 3 apresentaram maior perda de massa quando comparadas à formulação LNC 1. De fato, isso pode ser atribuído ao maior grau de cristalinidade da PCL constituinte da formulação LNC 1 (Figura 16), a qual seria responsável por evitar a degradação inicial da amostra, uma vez que os domínios cristalinos são menos permeáveis à penetração da água, protegendo as regiões amorfas, mais suscetíveis à hidrólise^{162,255,256}. Além disso, após o período inicial de hidrólise (15 dias), a perda de massa referente ao pico 3 (PCL) foi mais rápida para a LNC 1 quando comparada à LNC 2 e à LNC 3. Esse comportamento pode ser explicado pela presença de um maior número de terminações de cadeia (hidroxilas) na parede das nanocápsulas preparadas com a PCL $M_n = 10.000 \text{ g mol}^{-1}$ (LNC 1), contribuindo para uma maior disponibilidade desses grupos e conseqüentemente, aumentando a probabilidade de ocorrer cisão de cadeia.

Com o objetivo de obter respostas acerca do que estaria ocorrendo com as cadeias de menor massa molar, o sobrenadante foi coletado e avaliado por SEC e os perfis de distribuição de massa molar dos sobrenadantes para as formulações LNC 1 e LNC 2 foram obtidos (Figura 5A (a) e (b), LNC 1 não estéril e estéril, (c) e (d), LNC 2 não estéril e estéril, (e) e (f), LNC 3 não estéril e estéril - ver *Anexos*).

A partir da visualização do perfil de distribuição de massa molar dos sobrenadantes referentes às formulações LNC 1, LNC 2 e LNC 3, não estéreis e estéreis, pode-se observar variações antes e após o armazenamento (Figura 5A, ver *Anexos*). Com o objetivo de investigar a cinética de degradação associada aos constituintes de menor massa molar das LNC, presentes no sobrenadante, os resultados de massa molar foram examinados através dos cálculos de perda de massa ($\Delta M_w\%$) e da avaliação das massas molares (M_n e M_w). Considerando-se que as espécies moleculares presentes no sobrenadante possuem massa molar muito próximas, ou seja, não há uma polidispersão significativa entre as espécies, não foram mostrados os resultados de dispersidade (\mathbb{D}).

Na Figura 21 encontram-se os resultados de perda de massa ($\Delta M_w\%$) para as formulações não estéreis e estéreis, LNC 1 (a), LNC 2 (b) e LNC 3 (c), obtidos a partir da Equação 4 (descrita no item 4.2.2 deste trabalho). Os valores descritos foram calculados a partir da integração da região de baixa massa molar (30 a 42 mL - volume

de retenção), para os sobrenadantes coletados. As amostras foram denominadas com o prefixo “SOB” seguida do nome da respectiva formulação.

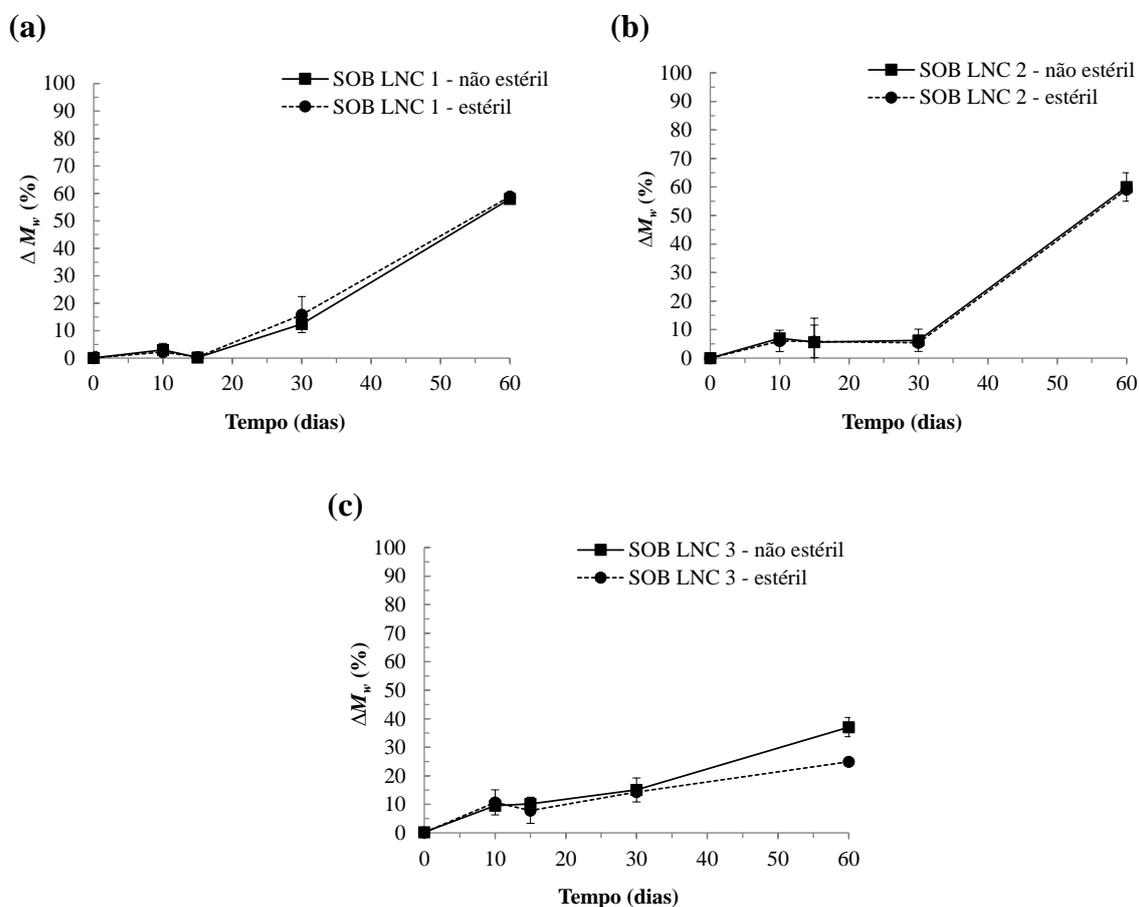


Figura 21. Perfis de perda de massa para o sobrenadante coletado das formulações LNC 1 (a), LNC 2 (b) e LNC 3 (c), não estéreis e estéreis, armazenadas a 5 °C, durante 60 dias. Resultados obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). n=3.

Na Figura 22, estão os resultados de M_n (a), (c) e (e) e de M_w (b), (d) e (f) para os sobrenadantes das formulações LNC 1((a) e (b)), LNC 2 ((c) e (d)) e LNC 3 ((e) e (f)), respectivamente.

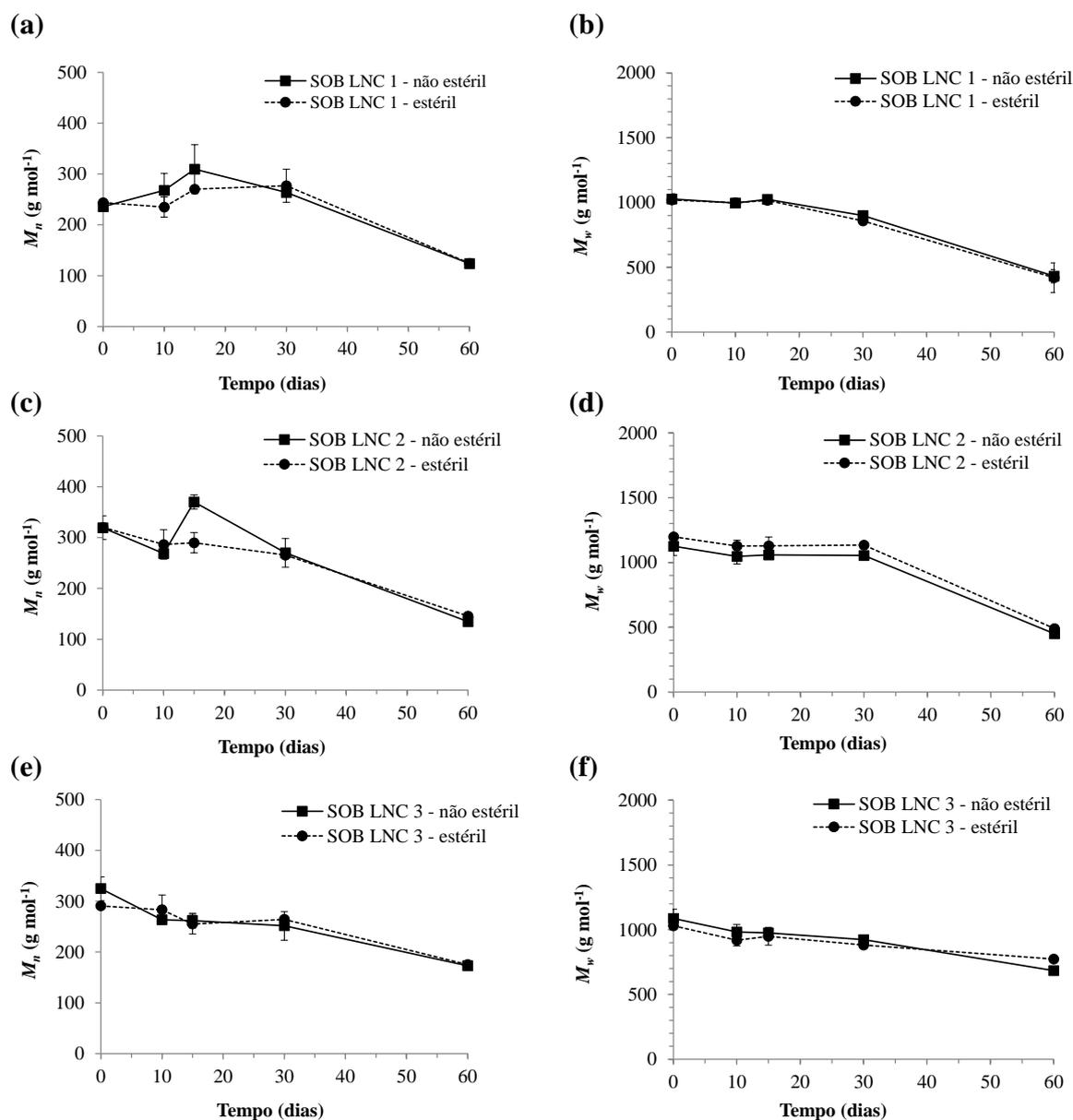


Figura 22. Mudanças na massa molar numérica média (M_n) ((a), (c), (e)) e massa molar ponderal média (M_w) ((b), (d), (f)), para o sobrenadante coletado das formulações LNC 1 não estéril e estéril (a) e (b), LNC 2 não estéril e estéril (b) e (c) e LNC 3 não estéril e estéril (e) e (f), armazenadas a 5 °C, durante 60 dias. Resultados obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). n=3.

Todos os resultados obtidos, representados nas Figuras 21 e 22 foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) com dois fatores via modelos lineares generalizados, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni ($p < 0,05$). Visto que a análise de variância (ANOVA) via modelos lineares generalizados mostrou interação entre os fatores "condição" (estéril e não estéril) e "tempo", para todas as variáveis

analisadas (perda de massa, M_n e M_w) foi possível comparar os resultados obtidos nos diferentes tempos e condições.

Dessa forma, foram realizadas duas análises distintas: na primeira, avaliou-se as diferenças estatísticas para cada LNC ao longo do tempo (0, 10, 15, 30 e 60 dias); enquanto que, na segunda, foi realizada a comparação entre as LNC estéreis e não estéreis nos diferentes tempos de armazenamento (Tabela 6A e 7A - ver *Anexos*).

Como pode ser visualizado na Figura 21, os sobrenadantes das formulações LNC 1 (estéril e não estéril (a)) e LNC 2 (estéril e não estéril (b)) apresentaram perfis similares de perda de massa e, conseqüentemente, a mesma semelhança pode ser observada para o perfil de diminuição das massas molares relacionadas ao M_n e ao M_w (Figura 22).

Ao observar os dados de perda de massa obtidos para o sobrenadante das formulações LNC 1 não estéril e estéril (Tabela 6A - ver *Anexos*), pode-se observar cerca de 58% e 58,8% de perda de massa ao final de 60 dias de armazenamento, respectivamente. Igualmente, para a formulação LNC 2 não estéril e estéril, observou-se uma perda de massa de cerca de 60% e 59%, respectivamente, após 60 dias (Tabela 6A - ver *Anexos*). Ao comparar a condição estéril com a condição não estéril, para as duas formulações (LNC 1 e LNC 2), não houve diferença significativa entre os valores de perda de massa ($p > 0,05$ - Bonferroni). Por sua vez, para a formulação LNC 3 não estéril foi possível observar uma perda de massa de 37% ao final de 60 dias, enquanto que para a mesma formulação estéril, esses valores foram da ordem de 25%. Além disso, para o tempo de 60 dias houve diferença significativa nos valores de perda de massa ($p < 0,05$ - Bonferroni), comparando-se as condições estéril e não estéril (Tabela 6A - ver *Anexos*).

Ao analisar os resultados de M_n para as formulações LNC 1 estéril e não estéril, a mesma tendência observada para os resultados de perda de massa pode ser notada (Figura 22 e Tabela 7A - ver *Anexos*). Para ambas as formulações observou-se que somente após 60 dias ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos valores de M_n , totalizando cerca de 46,6% e 48,7% para as formulações LNC 1 não estéril e LNC 1 estéril, respectivamente ($p > 0,05$ - Bonferroni) (Tabela 7A - ver *Anexos*). Da mesma forma, para a formulação LNC 2, os resultados mostraram que somente após 60 dias ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos valores de M_n , totalizando cerca de 57,8% e 54,3% para as formulações LNC 2 não estéril e LNC 2 estéril, respectivamente (Figura 22 e Tabela 7A - ver *Anexos*). Ao comparar a condição estéril com a condição não estéril, não houve diferença significativa entre os valores de M_n e M_w para as duas formulações ($p > 0,05$ - Bonferroni) (Tabela 7A - ver *Anexos*). Por sua vez, para a formulação LNC 3

observou-se que após 60 dias ocorreu a diminuição dos valores de M_n foi de 46,7% e 40,7% para as formulações LNC 3 não estéril e LNC 3 estéril, respectivamente (Figura 22 e Tabela 7A - ver *Anexos*), não sendo observada diferença significativa para as duas formulações ($p>0,05$ - Bonferroni).

Os resultados obtidos permitem afirmar que o perfil cinético dos sobrenadantes avaliados independe da condição de esterilidade da formulação (estéril ou não estéril), já que os valores obtidos para essas duas condições não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$), ao final de 60 dias de armazenamento para as formulações LNC 1 e LNC 2. Complementarmente, pode-se afirmar que esses resultados estariam relacionados à formação de monômeros oriundos da quebra das cadeias de maior massa molar da PCL, bem como da degradação dos constituintes moleculares (tensoativos e óleo), que estariam migrando do precipitado para o sobrenadante, fazendo com que ocorra um aumento do número de cadeias de menor massa molar no sobrenadante. Dessa forma, pode-se afirmar que a análise dos sobrenadantes fornece informações complementares àquelas obtidas a partir da análise do precipitado, uma vez que, os resultados corroboram os dados de perda de massa do precipitado.

5.1.2.8.1 Fração de cadeias clivadas na LNC

O cálculo de fração de cadeias clivadas (f) que permite obter informações acerca das cisões de cadeia que estariam ocorrendo nas formulações, foi obtido a partir da Equação 3 (descrita no item 4.2.2).

Na Figura 23 ((1), (2) e (3)), está representada a fração de cadeias clivadas (f) para as formulações LNC 1, LNC 2 e LNC 3, respectivamente, em função do tempo de armazenamento.

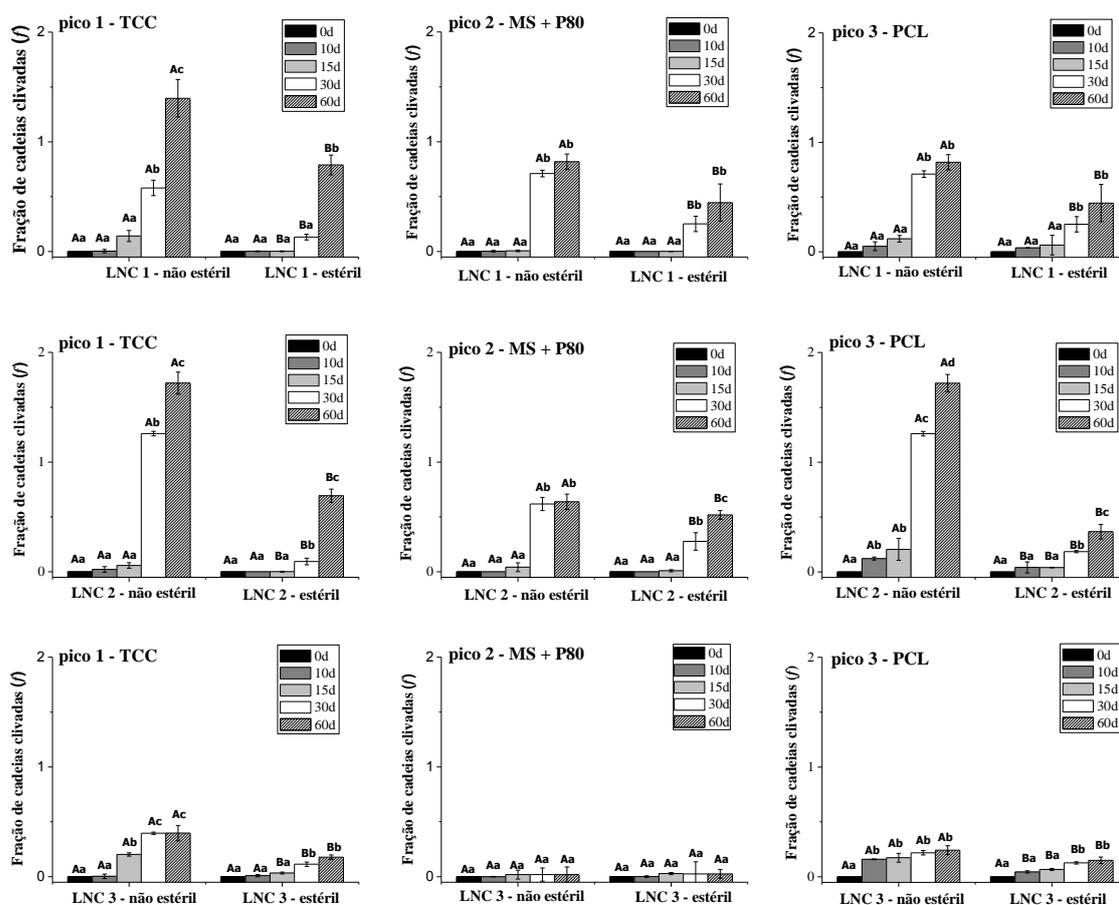


Figura 23. Fração de cadeias clivadas (f) para as LNC com diferentes proporções de parede polimérica (LNC 1, LNC 2 e LNC 3), estéreis e não estéreis, avaliadas durante 60 dias de armazenamento, a 5 °C. Resultados obtidos a partir de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). Os valores são representados como a média de três experimentos independentes ($n=3$). ^{a,b,c,d} letras minúsculas correspondem à análise realizada entre os diferentes tempos para cada formulação independente (estéril e não estéril); A,B letras maiúsculas correspondem à análise realizada comparando a condição (estéril e não estéril) nos diferentes tempos; *letras iguais significa equivalência estatística para os dados (ANOVA via dois fatores, com pós-teste de Bonferroni e $p<0,05$).

Como pode ser visualizado na Figura 23, a maior clivagem de cadeia para os três picos avaliados foi observada para as formulações LNC 1 não estéril e LNC 2 não estéril. Além disso, os resultados de fração de cadeias clivadas para as formulações não estéreis foram notoriamente maiores daqueles obtidos para as respectivas formulações estéreis.

Ao analisar os valores de cisão de cadeia para o pico 1 da formulação LNC 1 não estéril é possível observar que somente após 30 dias ocorreu um aumento significativo na fração de cadeias clivadas ($f=0,58$) ($p<0,05$), o qual tornou a aumentar após 60 dias ($f=1,39$), indicando diferença significativa entre 30 e 60 dias ($p<0,05$). Da mesma forma, para os picos 2 e 3, nos primeiros 15 dias de armazenamento, os valores de cisão de cadeia não tiveram variação significativa quando comparados ao tempo zero ($p>0,05$). Para o pico 2 e para o pico 3, após 30 dias, ocorreu um aumento significativo dos valores de f ($p<0,05$), totalizando 0,818 e 0,711, respectivamente, os quais se mantiveram constantes até 60 dias ($p>0,05$). Por outro lado, para o pico 1 da formulação estéril, somente após 60 dias de armazenamento foi observado uma variação significativa nos valores referentes à fração de cadeias clivadas ($p<0,05$) ($f=0,79$). Entretanto, para os picos 2 e 3, após 30 dias de armazenamento ocorreu um aumento significativo desses valores ($p<0,05$), totalizando $f=0,446$ e $f=0,352$, respectivamente. Ainda, esses valores se mantiveram constantes até 60 dias, não sendo observada diferença significativa entre 30 e 60 dias ($p>0,05$). Através do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, foi possível concluir que, somente nos tempos de 30 e 60 dias, os resultados de cisão de cadeia obtidos para as formulações LNC 1 estéril e não estéril foram significativamente diferentes ($p<0,05$) para os picos 2 e 3. Por outro lado, para o pico 1, após 15 dias pode ser observada diferença significativa ($p<0,05$) quando comparadas as condições estéril e não estéril.

Para os picos 1 e 2 da formulação LNC 2 não estéril, não foram observadas alterações significativas ($p>0,05$) nos valores de fração de cadeias clivadas (f) até o 15º dia de armazenamento. Entretanto, para o pico 1, após 30 dias, o valor de f foi igual 1,26 ($p<0,05$), tornando a aumentar significativamente ($p<0,05$) após 60 dias ($f=1,72$). Por sua vez, para o pico 2, os resultados de fração de cadeias clivadas aumentaram significativamente após 30 dias ($f=0,638$) ($p<0,05$), mantendo-se constantes até 60 dias ($p>0,05$). Para o pico 3, após 10 dias, foi observada uma variação significativa nos valores de cadeias clivadas ($p<0,05$) ($f=0,122$), os quais mantiveram-se constantes até 15 dias ($p>0,05$), tornando a aumentar após 30 ($f=1,26$) e 60 dias ($f=1,72$), com diferença significativa entre esses tempos ($p<0,05$). Para os três picos avaliados da formulação estéril, foi possível observar mudanças significativas nos valores de fração de cadeias clivadas (f) ($p<0,05$) somente após 30 dias. Para o pico 1, os valores de f após 30 e 60 dias foram iguais a 0,094 e 0,69, respectivamente, com diferença significativa ($p<0,05$) entre eles. Da mesma forma, para o pico 2, os valores de f após 30 e 60 dias foram iguais a 0,277 e 0,52, respectivamente, com diferença significativa ($p<0,05$) entre eles. Para o

pico 3, os valores de f após 30 e 60 dias foram iguais a 0,185 e 0,37, respectivamente, com diferença significativa ($p < 0,05$) entre eles. Ainda, foi possível concluir que, ao comparar-se as condições estéril e não estéril, houve diferença significativa entre os valores de fração de cadeias clivadas nos tempos de 10, 15, 30 e 60 dias de armazenamento ($p < 0,05$ - Bonferroni) para o pico 3. Por sua vez, o pico 2 mostrou diferença significativa entre as condições estéril e não estéril, nos tempos de 30 e 60 dias, enquanto que para o pico 1 pode ser observada diferença significativa nos tempos de 15, 30 e 60 dias.

Para a formulação LNC 3 não estéril, a variação dos valores de fração de cadeias clivadas para o pico 1 foi significativa a partir do tempo de 15 dias ($p < 0,05$) ($f = 0,203$). Da mesma forma, ocorreu um aumento significativo desses valores ($p < 0,05$) no tempo de 30 dias ($f = 0,397$), o qual se manteve constante até 60 dias ($p > 0,05$). Por outro lado, para o pico 2, não houve variação significativa dos valores de fração de cadeias clivadas, os quais se mantiveram constantes em todos os tempos avaliados ($p > 0,05$). Para o pico 3 foi possível observar que no tempo de 10 dias ocorreu um aumento dos valores de fração de cadeias clivadas ($p < 0,05$), entretanto, após 15, 30 e 60 dias esse valor se manteve constante ($f = 0,243$) ($p > 0,05$) até o final do período de armazenamento não sendo observada diferença significativa entre os tempos de 10, 15, 30 e 60 dias. Para os picos 1 e 3 da formulação LNC 3 estéril, foram observadas alterações significativas ($p < 0,05$) nos valores de fração de cadeias clivadas somente a partir de 30 dias, os quais se mantiveram constantes até 60 dias ($p > 0,05$), totalizando $f = 0,178$ e $f = 0,15$, para os picos 1 e 3, respectivamente. Por outro lado, para o pico 2, não houve variação significativa dos valores de fração de cadeias clivadas, os quais se mantiveram constantes em todos os tempos avaliados ($p > 0,05$). Através do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, foi possível concluir que, para o pico 1, os resultados de cisão de cadeia obtidos para as formulações LNC 3 estéril e não estéril diferiram significativamente ($p < 0,05$) em todos os tempos avaliados, enquanto que para o pico 3, houve diferença significativa a partir do tempo de 10 dias quando se comparou as condições estéril e não estéril. Por outro lado, para o pico 2 não houve variação significativa ($p > 0,05$) entre todos os tempos avaliados quando se comparou as duas condições.

Em resumo, esse conjunto de resultados corroborou os dados mostrados anteriormente de perda de massa e diminuição de M_n , uma vez que, a formulação LNC 3, se mostrou mais estável se comparada às outras duas formulações avaliadas (LNC 1 e LNC 2). Ainda, esses resultados evidenciam que a parede polimérica composta por 100%

de PCL $M_n = 80.000 \text{ g mol}^{-1}$ da formulação LNC 3, estaria protegendo os outros constituintes presentes nas nanocápsulas, uma vez que a degradação e conseqüentemente, as frações de cadeias clivadas, foram menores para os picos 1 e 2 na formulação LNC 3.

As diferenças entre a estabilidade das formulações LNC 2 e LNC 3 podem ser explicadas pelo fenômeno de plastificação que ocorre para a LNC 2. Este fenômeno é obtido pela combinação de um polímero com baixa massa molar à outro de maior massa molar. Essa combinação implica em uma redução da cristalinidade e em um aumento da flexibilidade das cadeias poliméricas. Cabe salientar que esse fenômeno já foi relatado na literatura para misturas de polímeros de diferente massa molar^{243,257}, bem como para sistemas de liberação constituídos dessa mistura^{258,259}. Por fim, os resultados da cisão da cadeia atestam novamente as diferenças entre as condições estéreis e não estéreis, os quais mostraram a ocorrência de um número de cisões de cadeia mais elevado para as formulações não estéreis.

5.1.2.8.2 Hidrólise autocatalisada e hidrólise não catalisada

Com o objetivo de elucidar o tipo de hidrólise que ocorre nas LNC (autocatalisada ou não catalisada), quando armazenadas a 5 °C, durante 60 dias, foram empregadas as expressões descritas pelas Equações (1) e (2) (seção materiais e métodos) para a análise cinética de todas as formulações avaliadas. A partir das Equações (1) e (2) (seção 4.2.2 de materiais e métodos), $\ln(M_n)$ e $1/M_n$ foram plotadas em função do tempo de degradação e uma linha de tendência foi usada para ajustar os pontos dos dados. A equação que fornece o melhor ajuste linear, maiores valores de r^2 , indica o mecanismo dominante (auto-catalisado ou não-catalisado)¹⁷¹. Os valores de r^2 estão representados na Tabela 18.

Tabela 18. Valores de r^2 para as formulações de LNC estéreis e não estéreis, em função do tempo de armazenamento (60 dias), descritos pelos mecanismos de hidrólise auto-catalisado e não-catalisado.

Mecanismo de hidrólise	Pico obtido por SEC	LNC 1 – não estéril	LNC 1 – estéril	LNC 2 – não estéril	LNC 2 – estéril	LNC 3 – não estéril	LNC 3 – estéril
Auto-catalisado	(1)	0,9715	0,9046	0,8488	0,8867	0,7205	0,3570
	(2)	0,7595	0,7947	0,7676	0,9325	0,0018	0,2312
	($\ln(M_n) - r^2$)	0,8373	0,9698	0,8488	0,9790	0,6048	0,8411
Não-catalisado	(1)	0,9708	0,8842	0,8800	0,8690	0,7337	0,3593
	(2)	0,7633	0,8028	0,7685	0,9427	0,0019	0,2365
	($1/M_n - r^2$)	0,8451	0,9751	0,8653	0,9796	0,6305	0,8547

Ao analisar os valores de r^2 mostrados na Tabela 18, é possível observar que para os picos 2 e 3 de todas as formulações, o mecanismo predominante foi do tipo não catalisado, uma vez que os valores de r^2 foram maiores para essa reação quando comparados aos valores de r^2 para o mecanismo auto-catalisado. Por sua vez, para o pico 1 (TCC) da LNC 1 estéril e não estéril e da LNC 2 não estéril, o mecanismo predominante foi do tipo auto-catalisado. Isso pode ser atribuído ao efeito autocatalítico das cadeias carboxílicas do constituinte triglicérido.

Ainda, ao comparar-se os resultados da Tabela 18, pode-se afirmar que a maior taxa de hidrólise ocorreu para os constituintes da formulação LNC 1, seguida da formulação LNC 2. A formulação LNC 3 apresentou os menores valores de r^2 para todos os picos avaliados. Além disso, todas as formulações não estéreis apresentaram uma cinética mais rápida se comparada àquela das formulações estéreis, para ambos os mecanismos (autocatalisado e não catalisado). Adicionalmente, os dados da cinética de degradação das formulações LNC 1 e LNC 2 não estéreis corroboram os resultados anteriores, os quais mostraram maiores taxas de perda de massa e de cisão de cadeia quando comparadas à formulação LNC 3 não estéril. Esses resultados confirmam a hipótese de que a presença da PCL de menor massa molar ($M_n=10.000 \text{ g mol}^{-1}$) na LNC 2 estaria influenciando o perfil de hidrólise, sendo esta preferencialmente hidrolisada.

Esses resultados demonstram que o mecanismo de hidrólise do tipo não catalisado é a predominante na maioria das LNC estudadas. Esse tipo de hidrólise já foi observada para poliésteres alifáticos em sua forma macromolecular^{147,171,260,261}, para micropartículas de PCL¹⁸⁹ e para nanopartículas da mistura de copolímeros de PLGA/PDLLA/PEO⁴⁰.

Os primeiros relatos referentes ao processo de degradação em poliésteres alifáticos foram realizados pelo grupo de Pitt e colaboradores^{147,153,158,260}. Esses estudos sugeriram que o processo de hidrólise inicia com a absorção de água pelo material, que atua como um nucleófilo atacando o carbono do grupo éster e originando produtos de degradação na forma de monômeros e oligômeros. Após essa etapa inicial, tem início o mecanismo de autocatálise, no qual os produtos de degradação, geralmente grupos carboxílicos terminais (formados a partir das cisões de cadeia que ocorrem no processo não catalisado), irão atuar como catalisadores acelerando a segunda etapa do processo de degradação.

Cabe salientar, que na primeira etapa da degradação, conhecida como erosão superficial, somente os terminais de cadeia são clivados. Nesse estágio, é comum ser observado que os valores da massa total diminuem enquanto que os valores de M_w permanecem constantes, ou diminuem mais lentamente quando comparados aos valores de M_n . Ainda, no segundo estágio (autocatalisado), terá início o processo “random”, caracterizado pela probabilidade de clivagem de toda a cadeia aleatoriamente, levando à diminuição dos valores de M_w . Contudo, este estágio só irá ocorrer quando grande parte das menores cadeias e da parte amorfa do polímero tiver sido hidrolisada²⁶². Adicionalmente, quando na presença de microrganismos a degradação irá prosseguir por processos biologicamente ativos (meio biótico), ou ainda pela clivagem hidrolítica passiva. Entretanto, segundo Lam e colaboradores (2008)²⁶¹, a degradação biótica de poliésteres alifáticos de alta massa molar, só terá início quando o $M_n < 5000$ KDa.

Mais especificamente, estudos referentes à degradação de nanopartículas poliméricas, propuseram que o mecanismo de degradação ocorre inicialmente com a cisão de terminais de cadeia seguida da erosão desses sistemas²⁶³. Nesse sentido, Vezin e Florence (1980)²⁶³, propuseram que a taxa de degradação, k , para nanopartículas de polialquilcianoacrilatos (PACA), com massa molar na faixa de $10^3 < M_n < 10^4$, em tampão pH 7,88, seria proporcional à relação $1/M_n$. Isto foi atribuído ao fato de que existe uma relação inversamente proporcional entre o número de cadeias na superfície das nanopartículas e o M_n (Equação 11), e que a partir disso, seria possível determinar o k .

$$Mn = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} \quad (11)$$

onde, M_i = a massa total do sistema polimérico e n_i = número total de moléculas do sistema.

Dessa forma, o mecanismo de erosão da superfície estaria relacionado com uma diminuição do tamanho de partícula²⁶³⁻²⁶⁵. No entanto, há também uma chance de que as partículas aumentem de tamanho por mecanismos de floculação/agregação, ou ainda por causa do fenômeno de inchamento causado pela absorção de água na estrutura supramolecular destes sistemas^{40,266,267}.

5.1.2.9 Determinação da distribuição de diâmetros de LNC estéreis e não estéreis em função do tempo de armazenamento

Com relação ao fenômeno de inchamento, diversos estudos relataram a observação do aumento dos diâmetros para outros tipos de nanopartículas poliméricas. Cabe salientar, que nanopartículas de PLGA mostraram uma tendência ao aumento dos seus diâmetros quando avaliadas frente à degradação *in vitro*, a qual foi atribuída ao fenômeno de inchamento devido à absorção de água^{40,268}. Em outro estudo²⁶⁷, o mesmo fenômeno foi explicado pelo fato de que as diferenças de concentração iônica através de uma membrana semipermeável (parede polimérica) provocaria um gradiente de pressão osmótica, resultando em uma força expansiva capaz de inchar o sistema até que a força interna seja equilibrada pela força elástica da rede polimérica.

A fim de investigar a hipótese da ocorrência do fenômeno de inchamento ou de erosão superficial para as formulações estudadas, os diâmetros médios das LNC, após o armazenamento, foram avaliados por análise de difração de laser. Os resultados de distribuição de tamanho para ambas as formulações de LNC não estéreis (LNC 1, LNC 2 e LNC 3) e estéreis (LNCS 1, LNCS 2 e LNCS 3), antes e após o armazenamento, são mostrados na Figura 24.

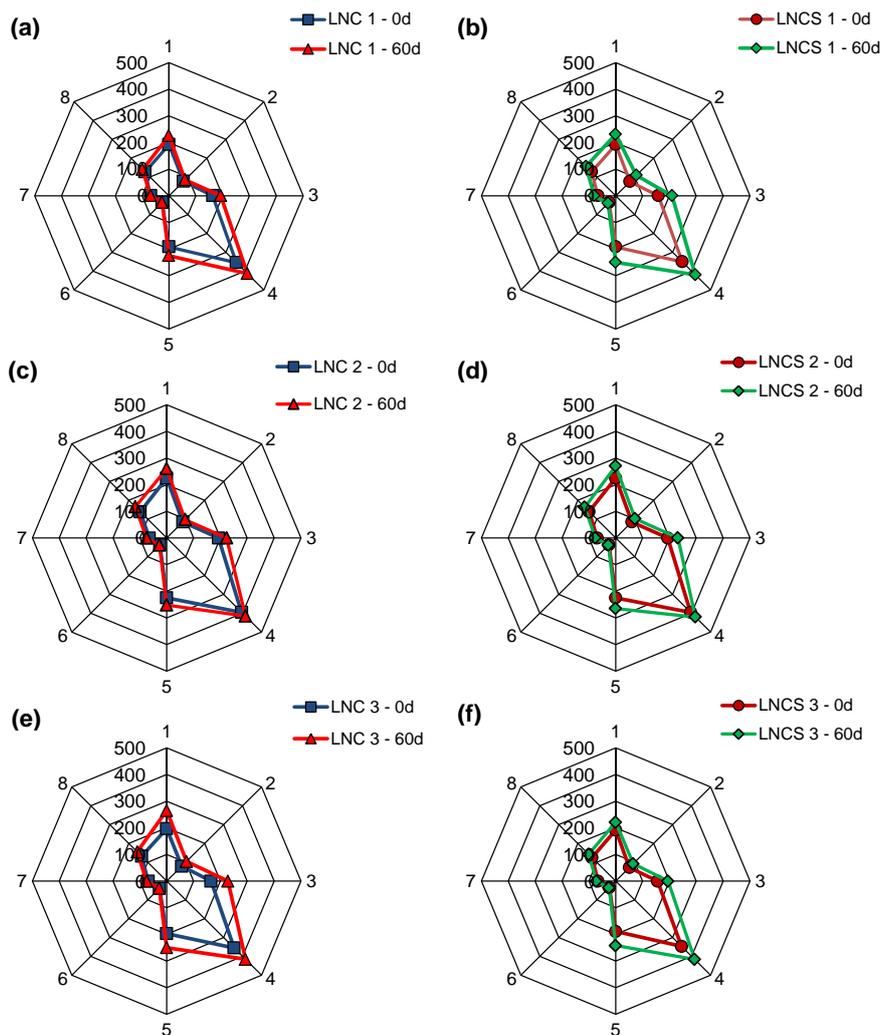


Figura 24. Distribuição de tamanho de partícula por percentual de volume e número das formulações preparadas com diferentes proporções de parede polimérica, não estéreis (LNC 1 (a), LNC 2 (c) e LNC 3 (e) antes e após 60 dias e estéreis (LNCS 1 (b), LNCS 2 (d) e LNCS 3 (f) antes e após 60 dias. Técnica: difração de laser (meio dispersante: água). n = 3. [eixos: 1- diâmetro de esfera equivalente, por volume, $d[4,3]v$; 2- diâmetro cumulativo em volume de 10% da população total, $d[0,1]v$; 3- diâmetro cumulativo em volume de 50% da população total, $d[0,5]v$; 4- diâmetro cumulativo em volume de 90% da população total, $d[0,9]v$; 5- diâmetro de esfera equivalente, por número, $d[4,3]n$; 6- diâmetro cumulativo em número de 10% da população total, $d[0,1]n$; 7- diâmetro cumulativo em número de 50% da população total, $d[0,5]n$; 8- diâmetro cumulativo em número de 90% da população total, $d[0,9]n$].

Ao visualizar a Figura 24, observa-se que todas as formulações avaliadas (estéreis e não estéreis), após 60 dias de armazenamento, apresentaram apenas uma população

nanométrica. Embora possa ser observado um alargamento no perfil de gráfico radar para as LNC não estéreis após 60 dias, esses aumentos não foram considerados significativos ($p>0,05$). Adicionalmente, na Tabela 9A (ver *Anexos*), estão descritas detalhadamente as variações nos respectivos diâmetros calculados e obtidos a partir de difração de laser.

As formulações também foram avaliadas através de espalhamento de luz dinâmico, com o objetivo de aumentar a exatidão para a detecção de populações submicrométricas, bem como das modificações relacionadas ao diâmetro hidrodinâmico das partículas. Os resultados obtidos para as formulações LNC 1, LNC 2 e LNC 3, estéreis e não estéreis, antes e após 60 dias de armazenamento, estão representados na Tabela 19.

Tabela 19. Caracterização das formulações de nanocápsulas preparadas com diferentes proporções de parede polimérica, antes e após esterilização, a partir de espalhamento de luz dinâmico (DLS). (n=3), análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey ($p<0,05$).

Formulação	Tempo (dias)	DLS (método dos cumulantes)		DLS (algoritmo <i>CONTIN</i>)	
		d_h (<i>Z-ave</i>) (nm)	PDI (adim.)	d_h (r.nm)	Largura do pico(r.nm)
LNC 1 - não estéril	0	198 ± 10	0,10 ± 0,03	221 ± 12	65 ± 8
	60	213 ± 4	0,11 ± 0,02	238 ± 2	69 ± 5
LNC 1 - estéril	0	200 ± 3	0,11 ± 0,04	222 ± 4	65 ± 13
	60	205 ± 16	0,10 ± 0,03	221 ± 16	67 ± 14
LNC 2 - não estéril	0	207 ± 9	0,10 ± 0,03	231 ± 15	65 ± 11
	60	211 ± 3	0,11 ± 0,01	235 ± 11	72 ± 4
LNC 2 – estéril	0	202 ± 5	0,13 ± 0,01	229 ± 11	72 ± 5
	60	218 ± 2	0,13 ± 0,03	240 ± 9	78 ± 3
LNC 3 - não estéril	0	202 ± 9	0,12 ± 0,01	224 ± 2	71 ± 8
	60	211 ± 14	0,11 ± 0,02	234 ± 17	70 ± 11
LNC 3 - estéril	0	185 ± 2	0,09 ± 0,00	200 ± 1	56 ± 2
	60	184 ± 3	0,10 ± 0,01	204 ± 6	58 ± 10

d_h = diâmetro hidrodinâmico; *PDI* = índice de polidispersão

A análise da luz espalhada para a formulação LNC 1, aplicando-se o método dos cumulantes, resultou em valores de diâmetro (*Z-average*) similares para todas as

formulações avaliadas, antes e após 60 dias. O algoritmo CONTIN forneceu resultados de diâmetro ligeiramente maiores quando comparados ao (*Z-average*), com largura de pico inferiores a 78 nm (Tabela 19). Importante ressaltar que embora tenham sido observados valores de diâmetro (*Z-average*) ligeiramente maiores para todas as LNC após 60 dias de armazenamento, as análises estatísticas permitiram concluir que essas variações não foram significativas ($p > 0,05$).

Merece destaque o fato de que após 60 dias de armazenamento, para todas as formulações estudadas, foi observada somente a presença de populações nanométricas. Isso pode ser relacionado com o fato de que devido às nossas LNC estarem revestidas com um tensoativo estabilizante de superfície (polissorbato 80), os fenômenos físico-químicos de agregação em "*clusters*" que poderiam ocorrer quando a repulsão Coulômbica diminui, estariam exercendo pouca influência na estabilidade físico-química destes sistemas. Esses resultados estão de acordo com resultados observados previamente por Calvo e colaboradores (1996)⁴⁸, para nanocápsulas de PCL (núcleo lipídico de Migliol 840), os quais mostraram que após 3 meses de armazenamento não houve alteração dos diâmetros para as formulações armazenadas a temperatura ambiente. Embora tenha ocorrido degradação das nanopartículas, o diâmetro médio das NC e NS se mantiveram constantes, demonstrando que apenas a caracterização de diâmetros não é suficiente para acessar fenômenos de interface/superfície.

5.1.3 Análises de pH e de potencial zeta

Análises de pH e de potencial *zeta* foram realizadas para avaliar como as características de físico-química de superfície das LNC (estéreis e não estéreis) estariam sendo afetadas durante o armazenamento a 5 °C (Figura 25).

Todos os resultados obtidos, mostrados na Figura 25, foram tratados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) com dois fatores via modelos lineares generalizados, seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni ($p < 0,05$). Visto que a análise de variância (ANOVA) via modelos lineares generalizados não mostrou interação entre os fatores condição (estéril e não estéril) e tempo para as variáveis analisadas (pH e potencial *zeta*), os resultados foram tratados como sendo independentes, não sendo possível comparar os resultados entre as diferentes condições nos diferentes tempos. Dessa forma, foram avaliadas as diferenças entre os dias (0, 10, 15, 30 e 60 dias) para cada grupo independente de LNC.

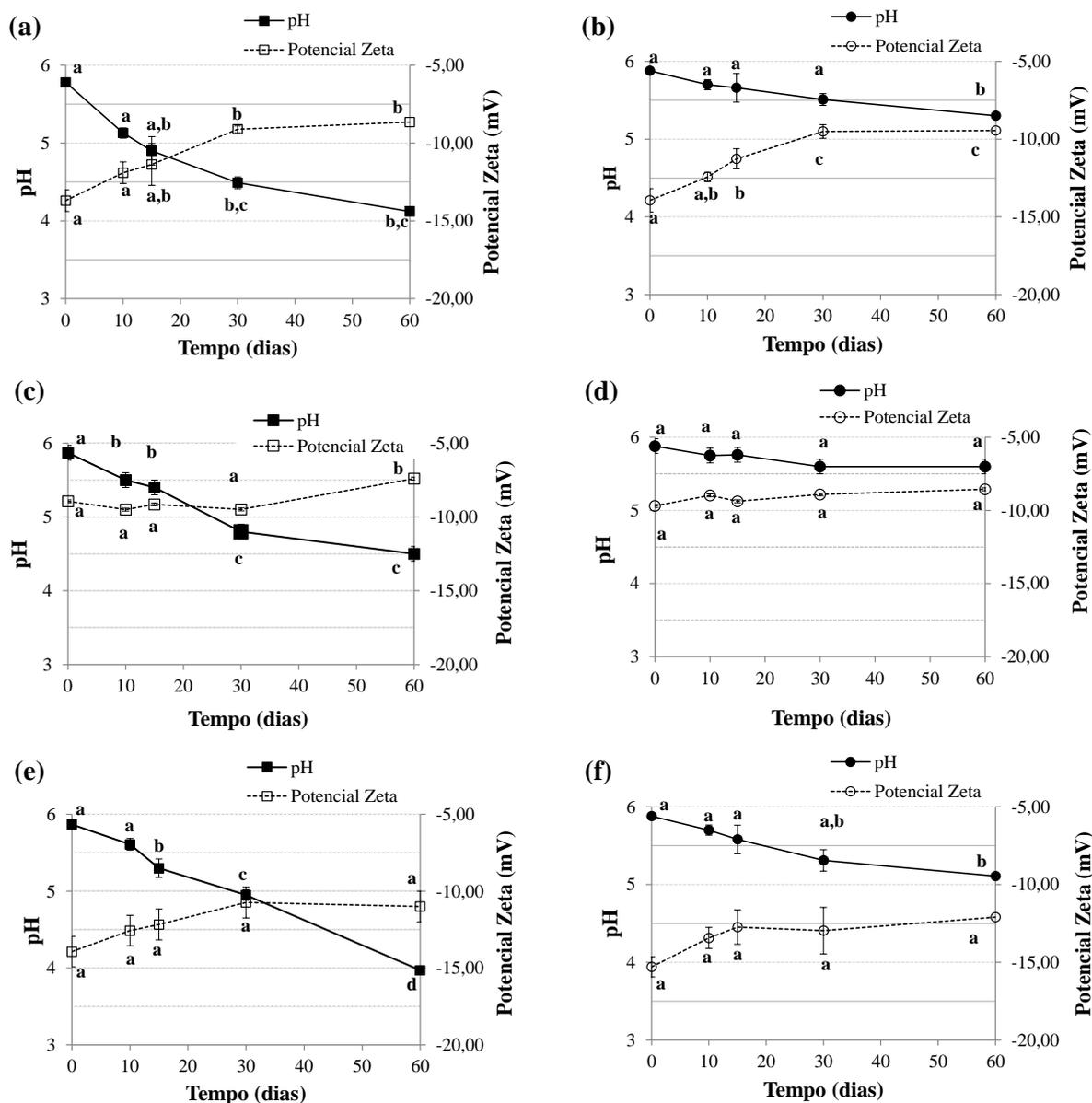


Figura 25. Variação do potencial *zeta* e do pH em função do tempo de armazenamento para as formulações LNC 1 não estéril (a) e estéril (b), LNC 2 não estéril (c) e estéril (d) e LNC 3 não estéril (e) e estéril (f). $n=3$. ^{a,b,c,d,e} letras minúsculas correspondem à análise realizada entre os diferentes tempos para cada formulação independente (estéril e não estéril); *letras iguais significa equivalência estatística para os dados (ANOVA via dois fatores, com pós-teste de Bonferroni e $p<0,05$).

Os resultados de potencial *zeta* e de pH, antes e após a esterilização, não apresentaram modificação significativa para todas as formulações avaliadas ($p>0,05$). Esses resultados corroboram aqueles mostrados anteriormente por Paese e colaboradores (2017)²¹², os quais esterilizaram LNC constituídas de PCL $Mn = 80.000 \text{ g mol}^{-1}$ e não

verificaram modificações nos valores de potencial *zeta*. Os autores sugeriram que o equilíbrio de adsorção/dessorção do surfactante não iônico na superfície da nanopartícula não foi afetado pelo processo de autoclavagem das formulações. Ainda, é relatado que formulações coloidais contendo tensoativos não iônicos, tal como o polissorbato 80 na interface partícula/água, terão uma maior influência de impedimento estérico do que uma repulsão eletrostática, como mecanismo físico de estabilização²⁶⁹.

Ao visualizar a Figura 25, os resultados de pH e de potencial *zeta*, obtidos em função do tempo de armazenamento, permitem observar que as formulações não estéreis (a), (c) e (e) apresentam um perfil típico de uma reação irreversível de consumo, no qual o ponto de intersecção entre as curvas de pH e de potencial *zeta* seria o ponto de equilíbrio reacional, caracterizado pelo fim da reação de consumo de reagentes e transformação em produtos. Por sua vez, as formulações estéreis (b), (d) e (f), mostraram um perfil típico de uma reação em equilíbrio, podendo ser observada a tendência à estabilização dos resultados tanto de pH quanto de potencial *zeta*. Além disso, as análises estatísticas comprovam essa tendência, visto que poucas mudanças significativas ($p > 0,05$) referentes aos valores de pH e potencial *zeta* podem ser observadas.

Para a formulação LNC 1 não estéril, observou-se uma diminuição significativa dos valores de potencial *zeta* (em módulo) ($p < 0,05$) após 30 e 60 dias, os quais variaram de $-13,70 \pm 0,70$ para $-9,11 \pm 0,22$ e $-8,65 \pm 0,47$. Os resultados de pH também diminuíram significativamente após 30 e 60 dias ($p < 0,05$), variando de $5,78 \pm 0,37$ para $4,49 \pm 0,03$ e $4,12 \pm 0,03$, respectivamente. Para a mesma formulação estéril, pode ser observada uma ínfima diminuição dos valores absolutos de potencial *zeta* após 15 dias ($p < 0,05$), variando de $-13,93 \pm 0,75$ para $-11,27 \pm 0,65$, os quais se mantiveram constantes após esse período ($p > 0,05$). Por outro lado, os valores de pH se mantiveram inalterados ($p > 0,05$) até 30 dias, diminuindo significativamente ($p < 0,05$) de $5,88 \pm 0,04$ para $5,30 \pm 0,07$ após 60 dias de armazenamento.

Para a formulação LNC 2 não estéril, observou-se uma diminuição significativa dos valores de potencial *zeta* (em módulo) ($p < 0,05$) somente após 60 dias, os quais variaram de $-8,93 \pm 1,36$ (início), para $-7,40 \pm 0,80$ (60 dias). Os resultados de pH diminuíram significativamente após 10 dias ($p < 0,05$), sendo mantido constantes até 15 dias, variando de $5,87 \pm 0,10$ (início) para $5,40 \pm 0,06$. Após 30 dias, uma diminuição significativa foi observada ($p < 0,05$) ($4,80 \pm 0,21$), sendo mantida constante até 60 dias ($p > 0,05$). Por outro lado, para a formulação LNC 2 estéril, os valores de pH e de potencial *zeta* se mantiveram inalterados durante todo o período avaliado ($p > 0,05$).

Por sua vez, para a formulação LNC 3, estéril e não estéril, os valores de potencial *zeta* se mantiveram inalterados para ambas as formulações ($p > 0,05$). Para a formulação LNC 3 não estéril, os valores de pH diminuíram significativamente ($p < 0,05$) nos tempos de 15,30 e 60 dias, variando de $5,87 \pm 2,20$ (pH inicial) para $4,51 \pm 1,41$, após 60 dias. Por outro lado, para a mesma formulação estéril, observa-se que somente após 30 dias ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$), a qual variou de $5,89 \pm 0,08$ para $5,31 \pm 0,14$.

A partir do conjunto de dados obtidos, pode-se observar que, de um modo geral, o pH e os valores de potencial *zeta* (em módulo) das formulações diminuíram durante o armazenamento. Este declínio pode ser explicado pela ocorrência da hidrólise da PCL, a qual estaria gerando ácido 6-hidroxyhexanóico como principal produto de degradação que, por sua vez seria responsável pela diminuição do pH das formulações. Além disso, pode ser inferido que as formulações de LNC não estéreis estariam sofrendo um mecanismo de degradação acelerada, caracterizado pelos menores valores de pH e de potencial *zeta*, quando comparados às respectivas formulações estéreis.

Esses resultados corroboram os resultados obtidos por Calvo e colaboradores (1996)⁴⁸, que, ao estudarem a estabilidade de nanocápsulas de PCL ($M_w = 40 \text{ kg mol}^{-1}$) frente ao armazenamento em temperatura ambiente, observaram a redução dos valores tanto de pH quanto de potencial *zeta* (em módulo) para as formulações armazenadas. Foi verificado redução do pH com valores iniciais entre 5 e 5,5 para valores entre 3 e 3,3, após 180 dias. Igualmente, os valores de potencial *zeta* diminuíram (em módulo) de -60 mV para -30 mV, após 6 meses de armazenamento. No entanto, os autores afirmaram que esse decréscimo não seria suficiente para ocasionar a coalescência das formulações. Esses resultados foram atribuídos, inicialmente, à hidrólise dos triglicerídeos que compõem o Migliol® 840 e dos fosfolipídeos utilizados como tensoativos, os quais geram ácidos graxos livres em solução. O declínio dos valores de pH também foi atribuído à formação do ácido 6- hidróxihexanóico, principal produto de degradação da PCL. Os resultados obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho corroboram os dados de pH, mostrando que, em até 2 meses de armazenamento, não foi observada alteração dos perfis de distribuição de massa molar da PCL, enquanto que, após 6 meses de armazenamento, a análise visual dos perfis de distribuição de massa molar da PCL indicaram a ocorrência de degradação para as formulações avaliadas. Contudo, a perda de massa não foi calculada naquele estudo.

Adicionalmente, Lemoine e colaboradores (1996)⁴⁹ avaliaram a estabilidade química de nanopartículas poliméricas de PCL ($M_w = 78.000$ e 29.400), PLA ($M_w = 50.000$) e PLA37.5GA25 ($M_w = 96.8000$), armazenadas (meio aquoso) em diferentes temperaturas. Foi observado uma diminuição do pH quando essas formulações foram armazenadas em temperatura ambiente. Os valores de pH, para as formulações de PCL ($M_w = 78.000$), PLA50, PLA37.5GA25 e PLA25GA50, armazenadas em temperatura ambiente, após 1 ano, foram iguais a 1,37, 0,70, 1,94 e 1,31, respectivamente. Para a mesma condição (temperatura ambiente) e tempo de armazenamento (1 ano), as perdas de massa para as formulações de PCL, PLA50, PLA37.5GA25 e PLA25GA50 foram iguais a 35, 26, 67 e 100%, respectivamente. O decréscimo na massa molar da PCL ($M_w = 78.000$) para as formulações armazenadas a $4\text{ }^\circ\text{C}$ foi de cerca de 12% após 6 meses, enquanto que para as mesmas formulações armazenadas a $37\text{ }^\circ\text{C}$ a taxa de degradação foi de 63%. Embora esses resultados indiquem a ocorrência de perda de massa para as formulações armazenadas em temperatura ambiente, os autores afirmaram que as formulações de PCL e de PLA poderiam ser mantidas por até 1 ano nessas condições (temperatura ambiente ou a $4\text{ }^\circ\text{C}$). No entanto, os autores sugeriram que a degradação destes poliésteres alifáticos seria dependente de muitos fatores e que a extrapolação dessas conclusões a nanopartículas preparadas por diferentes métodos e constituídas de diferentes polímeros (massa molar inicial, razão D, L-lactídeos (PLA, PLAGA), relação glicolato-lactato) e armazenadas em diferentes condições (temperatura, pH, força iônica, exposição à radiação gama) deveria ser cautelosa.

Diante do exposto, acredita-se que a diferença acerca da estabilidade observada ao comparar os resultados descritos por Calvo e colaboradores⁴⁸, Lemoine e colaboradores⁴⁹ e os resultados obtidos no presente estudo, estaria relacionada aos diferentes procedimentos de análise utilizados em cada estudo. Nesse sentido, as análises cinéticas considerando resultados de cisão de cadeia (baseados nos valores de M_n), permitiram prever respostas relacionadas ao período inicial de hidrólise, as quais não podem ser observadas quando se realiza somente análises de M_w , que é o caso dos estudos citados. Além disso, em nosso estudo, o método de análise proporcionou que as nanopartículas fossem avaliadas integralmente e não apenas quanto às modificações da parede polimérica.

Nesse sentido, resultados similares, também foram observados para a PCL em sua forma macromolecular¹⁷¹, bem como para nanopartículas de PCL³⁹. Previamente, Höglund, Hakkarainen e Albertsson (2007)¹⁷¹, investigaram a influência da forma

macroscópica da PCL (discos lineares e estrutura porosa), na cinética de degradação (37 °C e pH 7,4). Os resultados obtidos mostraram comportamentos diferentes para os valores de M_w e M_n . Ao avaliar a perda de massa relacionada ao M_w , observou-se uma diminuição da massa molar (relativa ao M_w) de cerca de 16% após 364 dias, enquanto que os resultados de M_n mostraram uma diminuição de cerca de 70% para a mesma estrutura avaliada (discos lineares), nas mesmas condições. Interessantemente, Coffin e McGivinity (1992)³⁹, ao avaliarem a estabilidade de nanopartículas de PCL e PLA, do tipo pseudolatex, em meio aquoso a 5 °C, observaram um aumento dos valores de M_w nos primeiros 28 dias de armazenamento, sendo que ao final de 350 dias, pequenas mudanças nos valores de M_w ocorreram. Os autores sugeriram que esse aumento inicial observado para os valores de M_w estaria relacionado à uma maior taxa de degradação das menores cadeias quando comparada à taxa de degradação das cadeias de maior massa molar. Isso fortalece a necessidade da avaliação da modificação dos valores de M_n , além do M_w quando se deseja acessar respostas dos períodos iniciais da cinética de degradação de sistemas poliméricos.

Ainda, outra explicação estaria baseada nas características de cada sistema avaliado. Visto que as nanopartículas estudadas por Lemoine e colaboradores (1996)⁴⁹ eram do tipo nanoesferas, constituídas somente por parede polimérica e tensoativos e que nas LNC o polímero, constituinte da parede polimérica, estaria embebido numa interface núcleo-água (óleo do núcleo lipídico e a água da fase externa)^{23,72,92}, poderia ser esperado que a cinética de degradação fosse afetada por essas características, não sendo possível comparar o comportamento desse sistema específico (LNC) com outros já estudados.

No que diz respeito aos resultados de perda de massa obtidos para as formulações estudadas, pode-se afirmar que o comportamento frente ao armazenamento, observado para as formulações LNC 1 e LNC 3 era esperado, uma vez que os polímeros apresentam comportamento assintótico. Esse comportamento prediz que maiores alterações nas propriedades do material polimérico ocorrem em moléculas de menor massa molar, quando comparadas com a influência das alterações em moléculas de maior massa molar²⁷⁰. Isso se fundamenta no fato de que quanto maior a massa molar, maior é o entrelaçamento das cadeias (aleatório) e conseqüentemente maior será a resultante do somatório das forças intermoleculares (*Forças de London*) que atuam no material polimérico. Além disso, a rigidez das cadeias poliméricas em polímeros semicristalinos está relacionada diretamente à atração entre monômeros não ligados quimicamente²⁷¹. Desse modo, como a PCL de maior massa molar ($M_n = 80 \text{ kg mol}^{-1}$) apresenta um

somatório de maior número de regiões cristalinas e, conseqüentemente, maior entrelaçamento de cadeias, sua taxa de degradação será menor quando comparada à taxa de degradação do mesmo polímero constituído de distribuição de cadeias de menor massa molar (PCL $M_n = 10 \text{ kg mol}^{-1}$). Somado-se a isto, um maior número de terminações de cadeia (hidroxilas) está presente na parede de nanocápsulas preparadas com a PCL de $M_n = 10 \text{ kg mol}^{-1}$, contribuindo para uma maior disponibilidade desses grupos e conseqüentemente, aumentando a probabilidade de ocorrer cisão de cadeia.

Conforme já mencionado anteriormente, as diferenças entre a estabilidade das formulações LNC 2 e LNC 3 podem ser explicadas pelo fenômeno de plastificação que estaria ocorrendo para a LNC 2. Este fenômeno é bem conhecido e reportado pela comunidade científica, o qual indica que a presença de oligômeros e/ou monômeros junto à polímeros de maior massa molar pode atuar como plastificante, fazendo com que as propriedades mecânicas e térmicas sejam modificadas^{243,257}. Dessa forma, a hipótese de que a LNC constituída da mistura de PCL de menor massa molar (LNC 2) tivesse sua taxa de degradação aumentada quando comparada com a LNC 3 foi comprovada.

Nesse sentido, estudos também exploraram essas propriedades em sistemas de liberação^{259,262,272}. Cai e colaboradores (2002) investigaram a cinética de liberação do quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) em blendas compostas de PLA, PLGA e PCL em diferentes proporções. Os resultados obtidos mostraram que a liberação foi proporcional à fração de lactidil/glicolidil presente, obedecendo a seguinte ordem: (PLGA 50/50 > PLGA 70/30 > PLGA 90/10). A maior proporção de lactato em relação ao glicolato aumentou a estabilidade frente à liberação, uma vez que o ácido láctico é menos hidrofílico, absorvendo menos água e diminuindo a taxa de degradação²⁵⁹.

Outra evidência acerca da influência da mistura de polímeros de diferente massa molar na composição de "pellets" utilizados como sistemas de liberação também foram relatadas por Bodmeier e colaboradores (1989)¹³⁶. Os autores avaliaram a adição de oligômeros de PLA a um PLA de maior massa molar na composição de "pellets" frente à liberação de um fármaco. Foi observado que ocorreu um aumento da permeabilidade da matriz polimérica para o sistema constituído da mistura de PLA, acarretando em uma maior liberação do fármaco. Isso foi associado ao fato de que no PLA de menor massa molar, haveria um maior número de grupos carboxila e terminais de cadeia, os quais favoreceriam à hidrólise.

Recentemente, Gamba (2013)²⁷³, estudou a degradação *in vitro* (tampão fosfato, pH = 7,4) de filmes de PDLLA/PLLA para utilização em engenharia de tecidos,

mostrando que quando maiores quantidades de PLLA de baixa massa molar foram adicionadas a um PDLLA de alta massa molar, uma maior taxa de degradação polimérica foi observada. Segundo o autor, isto estaria relacionado à degradação preferencial das menores cadeias, e conseqüentemente a uma maior acessibilidade do meio aquoso às cadeias de maior massa molar.

A partir dos resultados obtidos para as formulações estéreis e não estéreis, foi possível afirmar que para as formulações não estéreis, além da hidrólise química abiótica (clivagem das ligações ésteres), estaria ocorrendo uma catálise enzimática pela presença de microrganismos (biótica). Ainda, merece destaque o fato de que para a formulação LNC 1 não estéril foram detectadas bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos leveduriformes, enquanto que para as formulações LNC 2 e LNC 3, somente bactérias Gram positivas e Gram negativas foram detectadas. Por outro lado, quando as mesmas formulações são esterilizadas e armazenadas, a taxa de degradação é menor, uma vez que para esta última, não foram detectados a presença dos fatores bióticos que poderiam auxiliar na degradação através da hidrólise passiva das ligações ésteres. Cabe salientar que, até o momento da publicação dos dados apresentados nessa tese, a hipótese da influência exercida por fatores bióticos e abióticos no armazenamento de nanocápsulas ainda não havia sido investigada na avaliação da estabilidade química de nanopartículas poliméricas quando armazenadas.

Nesse sentido, estudos acerca da influência de fatores bióticos na degradação de poliésteres alifáticos^{166,172,246,248,249,274} e da PCL em sua forma macromolecular já foram relatados^{185,186,251-254,275}. Em um estudo desenvolvido por Hakkarainem e colaboradores (2000)¹⁶⁶, foi comprovado que a presença de uma cultura mista de microrganismos foi responsável por reduzir filmes de PLLA a um pó fino após 5 semanas de compostagem, enquanto que, na ausência de fatores bióticos, as amostras de PLLA permaneceram intactas. Os autores propuseram que, devido à rápida diminuição da massa molar observada para as amostras em meio biótico, a hidrólise estaria ocorrendo nos terminais de cadeia, enquanto que, em meio abiótico, teria ocorrido hidrólise aleatória das ligações éster, caracterizada pela menor perda de massa. Em outro estudo, Torres e colaboradores (1996)¹⁷², investigaram a degradação de moldes de PDLLA em uma cultura mista de *Fusarium moniliforme* e *Pseudomonas putida* a 30 °C e observaram que, inicialmente, ocorreu hidrólise química e que os microrganismos atuaram somente após a quebra das cadeias, sendo responsáveis apenas pela bioassimilação dos sub produtos formados.

Estudos prévios relataram que filmes de PCL são biodegradáveis em culturas fúngicas puras^{183,184}, mistura de culturas de fungos¹⁸⁵, de bactérias e de leveduras¹⁸⁶. Benedict e colaboradores (1983) realizou dois estudos comparando a degradação de filmes de PCL em culturas de fungos¹⁸⁵ e em cultura mista de bactérias e de leveduras¹⁸⁶. Os autores afirmaram que a bactéria gram negativa *Cryptococcus laurenti* foi responsável pelas menores taxas de degradação para filmes de PCL de maior massa molar quando comparada à cultura de fungos.

Com base nessas afirmações, além do fator massa molar da PCL, as maiores taxas de degradação para a formulação LNC 1 não estéril quando comparada à LNC 2 e LNC 3 não estéreis, poderia ser explicada pela detecção da presença de leveduras, além de bactérias Gram negativas e Gram positivas. Em resumo, pode-se estabelecer que dois mecanismos atuaram na degradação das LNC durante o seu armazenamento à 5 °C:

i) Hidrólise química (abiótica)

- observada para as LNC estéreis e caracterizada pela quebra aleatória das ligações ésteres da PCL (superfície das LNC), a partir do contato da região amorfa com o meio aquoso. A água atua como nucleófilo atacando o carbono ligado ao grupamento éster e gerando grupos terminais carboxílicos;

- os resultados de perda de massa para as formulações estéreis comprovaram que a hidrólise predominante no período avaliado estaria ocorrendo pela quebra aleatória das ligações ésteres (caracterizada pela menor perda de massa);

- o mecanismo de hidrólise do tipo não catalisado prevaleceu para a formulação estéril;

- os grupos terminais carboxílicos gerados no estágio inicial da hidrólise (quebra aleatória das ligações ésteres) somente atuariam como catalisadores do mecanismo de degradação no segundo estágio de hidrólise (autocatalisado). Assim, não foi verificada a ocorrência desse estágio para as formulações estéreis no período do estudo realizado.

ii) Hidrólise química (abiótica) combinada à hidrólise biótica

- esse mecanismo foi observado para as LNC não estéreis, no qual a hidrólise química (explicada no item i)), atuou em conjunto a uma hidrólise biótica catalisada por microrganismos. Bactérias Gram negativas e Gram positivas (LNC 1, LNC 2 e LNC 3) e leveduras (LNC 1) foram detectadas, mostrando atividade mesmo à baixa temperatura (5 °C) de armazenamento;

- a hidrólise combinada (abiótica e biótica) foi responsável pela taxa de degradação consideravelmente maior quando comparado aos resultados das LNC estéreis;

- à rápida diminuição da massa molar observada para as amostras em meio biótico seria explicada pelo fato de que a hidrólise estaria ocorrendo nos terminais de cadeia, enquanto que, em meio abiótico, teria ocorrido hidrólise aleatória das ligações éster. Essa afirmação é comprovada pelos resultados de cisão de cadeia obtidos, os quais mostraram a ocorrência de um maior número de cisões de cadeia para as formulações não estéreis;

- embora os resultados tenham sido muito próximos, o mecanismo de hidrólise não catalisado foi predominante na formulação não estéril, no período avaliado;

- o ácido 6-hidroxyhexanóico gerado como principal produto da degradação da PCL, acarretou na diminuição do pH, e, teoricamente, será responsável pelo mecanismo de autocatálise, o qual dará prosseguimento ao processo de hidrólise sendo responsável por degradar as regiões mais internas das nanocápsulas.

A partir do exposto, nossos resultados podem ser considerados altamente promissores, uma vez que foi possível estabelecer uma metodologia sistematizada para a avaliação da estabilidade química de nanopartículas poliméricas, contribuindo para um melhor entendimento acerca dos parâmetros que devem ser avaliados quando se deseja investigar a estabilidade química desses sistemas.

Além disso, cabe salientar, que até o momento, o fator esterilidade não havia sido considerado em estudos de estabilidade química de sistemas de liberação frente ao armazenamento. Dessa forma estes dados esclarecem aspectos acerca do tipo de hidrólise que ocorre quando estes sistemas são armazenados, mostrando que somente baixa temperatura não é suficiente para prevenir a degradação desses sistemas em meio aquoso.

Adicionalmente, foi possível comprovar que é possível obter formulações estáveis em meio aquoso por até 60 dias, quando as mesmas são esterilizadas. Isso reforça o potencial destes sistemas como uma plataforma adequada para a administração intravenosa, bem como para a administração oral e ocular, sem que seja necessária a utilização de métodos de secagem.

Combinando esse conjunto de resultados, acreditamos que esses dados possam ser utilizados para elucidar quanto às condições ideais de armazenamento desses complexos sistemas supramoleculares dispersos em água, uma vez que a fabricação de produtos líquidos injetáveis compostos por nanopartículas poliméricas ainda é um desafio. Formulações estéreis podem ser, de fato, uma escolha melhor para garantir a integridade

de todos os constituintes das LNC, uma vez que os resultados mostraram que o armazenamento a baixas temperaturas (5 °C), sem esterilização, não garante a estabilidade química das nanocápsulas poliméricas preparadas com materiais biodegradáveis. Além disso, visto que as características físico-químicas da parede polimérica e as interações moleculares dos componentes da LNC influenciam a resposta biológica, os resultados sobre a estabilidade química das LNC dispersas em meio aquoso podem contribuir para explicar futuras respostas quanto à aplicação desses sistemas.

5.2 Avaliação da ecotoxicidade das LNC em meio aquático

5.2.1 Preparação e caracterização das formulações de nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNC) utilizadas nos estudos de ecotoxicidade e de biodegradação em solos

As formulações foram obtidas como líquidos macroscopicamente homogêneos e esbranquiçados com efeito *Tyndall*. As análises de difração de laser mostraram perfis de diâmetros de esfera equivalente ($d_{4.3}$), em percentual de volume, com valores entre 185 ± 25 nm e baixa polidispersão (Tabela 20). Os diâmetros cumulativos em número de 50% da população total ($d_{0.5}$) apresentou valores menores que 100 nm (Tabela 20). A faixa de valores dos diâmetros hidrodinâmicos, determinados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foram próximos a 200 nm (Tabela 20), com índices de polidispersão (PDI) de 0.10 ± 0.04 .

Por sua vez, os valores do potencial zeta foram ligeiramente negativos ($-9,6 \pm 2$ mV) e o pH levemente ácido ($4,9 \pm 0,3$) (Tabela 20). Os resultados do NTA mostraram valores de diâmetro médio de 125 ± 58 nm. (Tabela 20).

Tabela 20. Caracterização físico-química das formulações de LNC por difração de laser, espalhamento de luz dinâmico (DLS), microeletroforese, potenciometria e rastreamento de nanopartículas (NTA). (n=3). (Média ± desvio padrão).

Método e parâmetro analisado	Resultado
Difração de laser	
$d[4,3]_v$ (nm)	185 ± 25
Span	1,5 ± 0,1
$d(0.5)_n$ (nm)	66 ± 2,5
Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	
z-Average diameter (nm)	183 ± 17
PDI	0,10 ± 0,04
Microeletroforese	
Potencial <i>zeta</i> (mV)	- 9,6 ± 2
Potenciometria	
pH	4,9 ± 0,3
Rastreamento de nanopartículas (NTA)	
Diâmetro médio nm	125 ± 58
D(0.5) nm	112 ± 60
Concentração de partículas na formulação (particles mL⁻¹)	(6,4 ± 0,2) × 10 ¹³

As densidades de número de partículas obtidas por NTA foram próximas a $6,0 \times 10^{13}$ partículas por mL e este valor foi utilizado para calcular a concentração micromolar de nanocápsulas nas formulações líquidas. Os resultados mostraram uma concentração de $4,11 \times 10^{-2}$ μmol de nanocápsulas por litro de formulação. A concentração baseada no número de moles de nanocápsulas por litro foi utilizada para calcular a dose de cada formulação aplicada nos ensaios de ecotoxicidade da LNC nos diferentes níveis tróficos.

5.2.2 Ensaios de ecotoxicidade em diferentes níveis tróficos

5.2.2.1 Ecotoxicidade para algas – *Pseudokirchneriella subcaptata*

A inibição de crescimento das algas foi avaliada após 72h de exposição para determinar a toxicidade do nanocarreador (LNC) para esse nível trófico (Figura 26).

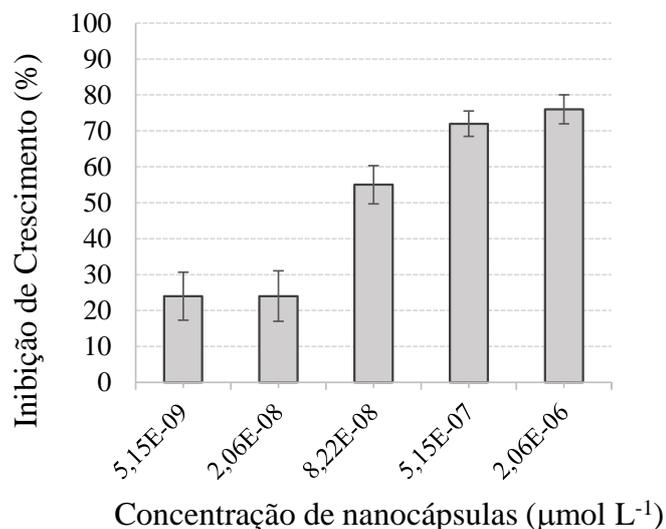


Figura 26. Inibição do crescimento algal em função da concentração de LNC durante 72h de exposição. Os dados representam a média ($n=3$) \pm desvio padrão.

A partir da análise dos resultados da Figura 26 é possível notar que as menores concentrações de LNC testadas ($5,15 \times 10^{-9}$ e $2,06 \times 10^{-8} \mu\text{mol L}^{-1}$) afetaram o crescimento da população algal em 24%. Ainda, o IC_{50} (concentração que inibe o crescimento de 50% das células algais) foi de $6,34 \times 10^{-8} \mu\text{mol L}^{-1}$, equivalente a $6,24 \text{ mg L}^{-1}$ de formulação. No entanto, este resultado não pode ser atribuído como sendo um efeito tóxico das LNC para os organismos, uma vez que possa estar ocorrendo à interferência na passagem de luz pela turbidez característica das LNC em meio aquoso.

Nesse sentido, estudos anteriores afirmam que o uso de amostras coloridas e/ou turvas pode afetar os estudos de toxicidade de algas, uma vez que, nesses casos, é difícil afirmar se o crescimento populacional de algas foi realmente afetado pela interação da amostra ou se foi afetada porque parte da luz foi absorvida pela amostra³⁷. Bhattacharya et al. (2010)²¹⁰ investigaram o efeito da adsorção de partículas de poliestireno (tamanho de 20 nm) na fotossíntese de algas. Os resultados mostraram que uma concentração de 1,8-6,5 mg L^{-1} prejudicou a fotossíntese de algas e estimulou a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), os quais foram relacionados à redução da intensidade da luz ocasionada pelas nanopartículas poliméricas. Devido à isso, os resultados obtidos nesse estudo podem ser atribuídos à turbidez inerente da LNC em meio aquoso. Ainda, pode-se afirmar que para as LNC é imprescindível que outros níveis tróficos sejam avaliados a

fim de elucidar quanto as concentrações seguras que podem estar em contato com o meio aquático durante eventuais contaminações ambientais.

De acordo com o documento publicado pelo NANoREG em 2016¹⁹³, o qual avaliou a ecotoxicidade de diferentes grupos de nanopartículas para algas *Pseudokirchneriella subcapitata*, foi possível observar que os diferentes laboratórios colaboradores obtiveram variabilidade nos dados de ecotoxicidade gerados para esse nível trófico. Nesse sentido, o grupo laboratorial, GNano/IFSC-USP, obteve um $IC_{50}=0,25 \text{ mg L}^{-1}$ para AgNPs, enquanto que os resultados de outro laboratório (NMBU), mostraram um $EC_{50}=0,008 \text{ mg L}^{-1}$ e o laboratório SINTEF relatou um IC_{50} de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ para dois ensaios realizados com esse mesmo nível trófico com nanopartículas de prata (AgNPs).

Ensaio realizado pelo grupo GNano/IFSC-USP para nanopartículas de ZnO mostraram um $IC_{50}=0,07 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto que para nanopartículas de TiO_2 o mesmo grupo relatou um valor de $EC_{50}=50,57 \text{ mg L}^{-1}$. Nesse sentido, os ensaios realizados pelo laboratório colaborador, IK4-Tekniker, mostraram um $EC_{50}=0,27 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto que o laboratório SINTEF relatou $EC_{50}=11,34-18,77 \text{ mg L}^{-1}$ para as mesmas nanopartículas de TiO_2 . Para nanopartículas de CeO_2 , o laboratório colaborador, IK4-Tekniker, obteve um resultado de $IC_{50}=1,24 \text{ mg L}^{-1}$. Dessa forma, este documento classificou as NPs avaliadas em ordem de toxicidade decrescente: $AgNPs > ZnONPs > CeO_2NPs \approx TiO_2NPs$. Analisando os resultados relatados pelo documento NANoREG, para este nível trófico, é possível concluir que, apesar de uma metodologia padrão comum, a obtenção de dados de ecotoxicidade reprodutíveis em diferentes laboratórios mostra-se como um desafio, uma vez que, os mesmos tipos de partículas mostraram resultados consideravelmente diferentes nos valores de toxicidade. Dessa forma, cabe ressaltar que a comparação entre diferentes tipos de partículas ainda é arriscada.

5.2.2.2 Ecotoxicidade para microcrustáceos – *Daphnia simillis*

A imobilidade dos microcrustáceos, *Daphnia simillis*, foi avaliada após 48h de exposição e os resultados mostraram que as formulações de LNC ocasionaram 5% de imobilidade nos organismos-teste na menor concentração avaliada ($2,06 \times 10^{-6} \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) para esse nível trófico (Figura 27).

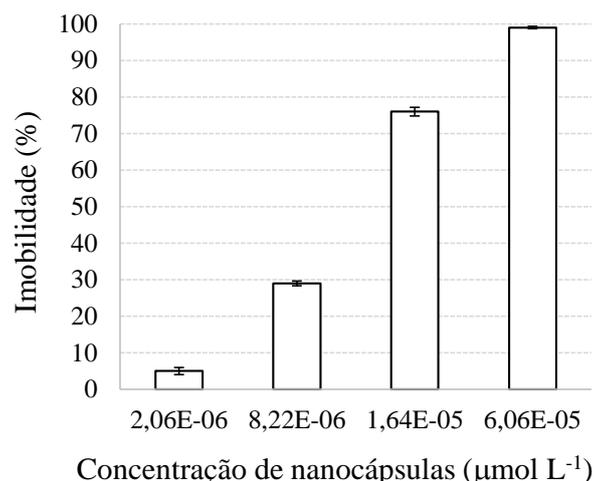


Figura 27. Imobilização dos microcrustáceos, *Daphnia similis*, em função da concentração de LNC durante 48h de exposição. Os dados representam a media (n=3) \pm desvio padrão.

Os resultados mostraram que o EC_{50} para esse nível trófico foi de $1,3 \times 10^{-5} \mu\text{mol L}^{-1}$, equivalente a $65,65 \text{ mg L}^{-1}$ de formulação.

Ao comparar esses resultados com outros estudos utilizando esses mesmos organismos e outro tipos de nanopartículas é possível sugerir que as LNC apresentam segurança ambiental. Nesse sentido, alguns estudos que avaliaram a toxicidade para *Daphnia similis* utilizando AgNP (nanopartículas de prata) mostraram um EC_{50} de $4,70 \mu\text{g L}^{-1}$ ($0,0047 \text{ ppm}$)²⁰³ e em outro estudo, foram obtidos resultados similares e um EC_{50} de $6,90 \mu\text{g L}^{-1}$ ($0,0069 \text{ ppm}$) quando se utilizou as mesmas partículas (AgNP) e os mesmos organismos²⁰⁷.

O órgão NANOREG¹⁹³ publicou em 2016 um documento com resultados obtidos por diferentes laboratórios colaboradores de estudos que investigaram a toxicidade de alguns tipos de nanopartículas utilizando microcrustáceos *Daphnia magna*.

Para nanopartículas de prata (AgNPs), o GNano/IFSC-USP e o IK4-Tekniker, dois laboratórios colaboradores, relataram um EC_{50} de cerca de $0,076 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,028 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Da mesma forma, o grupo UOS encontrou um EC_{50} de cerca de $0,019$ a $0,032 \text{ mg L}^{-1}$, após exposições de 48 e 72 horas.

Ensaio realizados pelo grupo GNano/IFSC-USP para nanopartículas de ZnO mostraram um $EC_{50}=1,44 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto que para nanopartículas de TiO_2 o mesmo grupo relatou um valor de $EC_{50}=131,14 \text{ mg L}^{-1}$, definido como não tóxico. Da mesma forma, o laboratório UOS, encontrou valores de EC_{50} maiores que 100 mg L^{-1} para NPs

de TiO₂. Ainda, os estudos realizados pelo grupo IK4-Tekniker mostraram valores de EC₅₀ = 2,05 mg L⁻¹ para SiO₂ NPs e 33,84 mg L⁻¹ para NPs de CeO₂. Por fim, o documento publicado pelo NANoREG classificou as nanopartículas analisadas em ordem decrescente de toxicidade: AgNPs>ZnONPs>SiO₂NPs>CeO₂NPs>TiO₂NPs. Assim, quando comparados nossos resultados de EC₅₀ (65,65 mg L⁻¹) obtidos para *Daphnia similis* com a definição publicada pelo NANoREG para esta faixa de concentração (EC₅₀> 0,1 mg L⁻¹), é recomendada a realização dos ensaios para o 3º nível trófico (vertebrados).

No que se refere à nanopartículas poliméricas, Besseling et al., (2014)²⁰⁸ avaliaram os efeitos de nanopartículas de poliestireno (nano-PS) (~70 nm) no crescimento, mortalidade, desenvolvimento de neonatos e malformação dos organismos de *Daphnia magna*. Os resultados mostraram uma redução no tamanho do corpo e alterações na reprodução dos organismos para concentrações de nano-PS entre 0,22 e 103 mg L⁻¹. Ainda, as malformações ocorreram em concentrações acima de 30 mg L⁻¹ de nano-PS.

Sabendo que os microcrustáceos são considerados um “organismo chave” para estudos de avaliação da ecotoxicidade aquática devido a alta sensibilidade dos mesmos à contaminantes ambientais, esses resultados podem ser considerados promissores. Cabe salientar que em uma concentração de nanocápsulas de 2,06x10⁻⁶ μmol L⁻¹ foi observada uma baixa imobilidade (5%) para os organismos de *Daphnia similis* se comparado à estudos com outros tipos de nanopartículas. Além disso, esses organismos representam uma ligação entre os produtores primários e consumidores secundários, visto que se alimentam de algas e servem de alimento para peixes. Complementarmente, alguns autores indicam que o ensaio com microcrustáceos poderia ser considerada a primeira escolha para estudos ecotoxicológicos utilizando nanomateriais^{276,277}. Pela primeira vez, esse importante parâmetro ambiental foi avaliado para LNC.

5.2.2.3 Ecotoxicidade para peixes – *Pimephales promelas*

A mortalidade para os peixes *Pimephales promelas*, foi avaliada após 24 e 48h de exposição dos organismos às diferentes concentrações de LNC (Figura 28A e B).

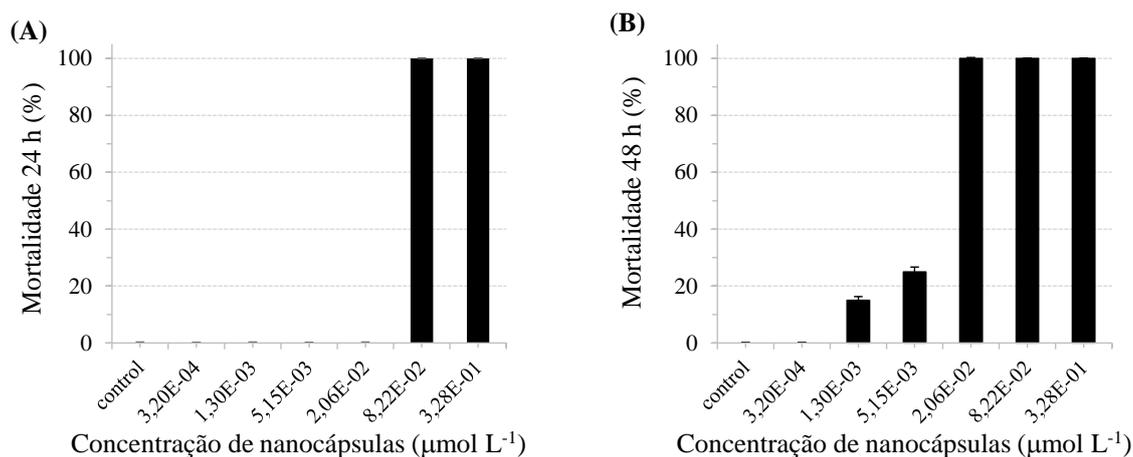


Figura 28. Mortalidade (%) de peixes *Pimephales promelas*, em função da concentração de LNC durante 24h (A) e 48h (B) de exposição. Os dados representam a média ($n=3$) \pm desvio padrão.

A partir da análise dos resultados da Figura 28, é possível afirmar que nas primeiras 24 horas não pode ser observada toxicidade para concentrações menores do que $8,22 \times 10^{-2} \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 28A). Após 48h, a dose letal mediana (DL_{50}) foi próxima às doses mais elevadas de LNC testadas ($5,81 \times 10^{-3} \mu\text{mol L}^{-1}$) (Figura 28B) e esse valor foi equivalente a $986,02 \text{ mg L}^{-1}$ de formulação.

Alguns estudos que avaliaram a toxicidade de nanopartículas inorgânicas para este nível trófico (peixes) mostraram diferentes resultados de DL_{50} . Nesse sentido, Asharani et al. (2008)²⁰⁰ avaliaram a toxicidade do AgNP para embriões de *Danio rerio* e relataram valores de $CL_{50}=25$ e 50 mg L^{-1} . Xin et al. (2015)²⁰⁹ avaliaram a toxicidade de AgNPs para embriões de peixe-zebra (*zebrafish*) e os resultados mostraram valores de $CL_{50}=4,12 \text{ mg L}^{-1}$ e $5,91 \text{ mg L}^{-1}$.

Ainda, o documento publicado pelo NANoREG¹⁹³ em 2016, avaliou a toxicidade de diferentes nanopartículas para o nível trófico dos vertebrados, utilizando a espécie *Danio rerio*. Os ensaios realizados pelo grupo GNano/IFSC-USP para AgNPs mostraram um $EC_{50}=1 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto que outro laboratório colaborador, o UOS, obteve um $EC_{50}=0,59 \text{ mg L}^{-1}$. Para NPs de TiO_2 , o laboratório GNano/IFSC-USP obteve valores de EC_{50} acima de 100 mg L^{-1} e concluiu que as nanopartículas de TiO_2 não são tóxicas para o nível trófico avaliado (*D. rerio*). Da mesma forma, a Embrapa Meio Ambiente avaliou a toxicidade de nanopartículas de ZnO e observou que nas doses máximas testadas (100 mg L^{-1}) não foram observados efeitos letais ou subletais nos peixes da espécie *Danio*

rerio. Para nanopartículas de SiO₂, o grupo UOS relatou baixa toxicidade para o nível trófico avaliado e os valores de EC₅₀ foram acima de 100 mg L⁻¹.

Assim, quando comparado o nosso resultado de EC₅₀ (986,02 mg L⁻¹) com a definição publicada pelo NAnoREG em 2016, a qual classificou como não tóxica a faixa de concentração de EC₅₀>100 mg L⁻¹, é possível afirmar que as LNC são classificadas como não tóxicas para os organismos desse nível trófico.

Adicionalmente, foram realizadas análises físico-químicas da água de diluição utilizada nos estudos de peixes após a adição das diferentes concentrações de LNC (Tabela 21).

Tabela 21. Parâmetros físico-químicos da água de diluição utilizada no ensaios de toxicidade com peixes *Pimephales promelas*. (n = 3)

Concentração de nanocápsulas (μmol L ⁻¹)	Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹ O ₂)	Condutividade (μS cm ⁻¹)	pH	Temperatura (°C)	Dureza (mg L ⁻¹ CaCO ₃)
-	8,6	191	7,5	23	41
3,20x10 ⁻⁴	8,5	190	7,5	23	41
1,30x10 ⁻³	8,4	187	7,5	23	41
5,15x10 ⁻³	8,4	185	7,5	23	41
2,06x10 ⁻²	8,1	184	7,5	23	41
8,22x10 ⁻²	8,0	172	7,4	23	41
3,28x10 ⁻¹	7,7	160	7,1	23	41

Os resultados das análises da água de diluição utilizada nos ensaios com peixes mostraram que os valores dos parâmetros físico-químicos tais como oxigênio dissolvido (OD, 7,7 mg L⁻¹), pH (7,1) e condutividade (160 μS cm⁻¹) permaneceram constantes e de acordo com a legislação vigente mesmo para a maior concentração de LNC utilizada. A legislação 357 do CONAMA estabelece valores de pH entre 5 e 9 para os lançamentos em corpos hídricos²⁷⁸. Ainda, para os valores de OD, essa mesma legislação prevê que os mesmos não sejam inferiores a 6 mg L⁻¹ para águas da Classe 1 (destinada ao abastecimento)²⁷⁹.

Esses resultados permitem afirmar que a realização de testes de toxicidade torna-se imprescindível na caracterização e no controle de efluentes, uma vez que as análises

usuais não mostraram alterações mesmo quando as maiores concentrações de amostra foram adicionadas à água.

Os resultados dos ensaios de ecotoxicidade permitem concluir que as LNC podem ser consideradas um sistema seguro de liberação de fármacos para os níveis tróficos avaliados e utilizando as condições descritas pelas normatizações específicas. O presente estudo, também possibilita definir as concentrações seguras quando esses sistemas nanoparticulados forem descartados em efluentes. Adicionalmente, pode-se afirmar que esses ensaios podem ser utilizados como bons indicadores para a avaliação da toxicidade de outros tipos de nanocarreadores em estudos futuros.

Complementarmente, os presentes resultados confirmam resultados anteriores de nosso grupo de pesquisa que avaliaram a toxicidade *in vivo* desses sistemas. Uma vez que quando avaliou-se a toxicidade aguda e subcrônica *in vivo* usando modelos animais, não foi observada toxicidade da LNC^{29-31,280}. Assim, estas descobertas combinadas podem confirmar a segurança tanto *in vivo* quanto ambiental do sistema LNC.

5.3 PERFIL DE BIODEGRAÇÃO DAS LNC EM SOLOS

A Figura 29 mostra as emissões cumulativas de CO₂ detectadas após 90 dias. A geração de CO₂ em função do tempo de incubação foi detectada para as diferentes amostras de polipropileno (PP) (controle negativo), papel filtro (controle positivo) e formulação LNC.

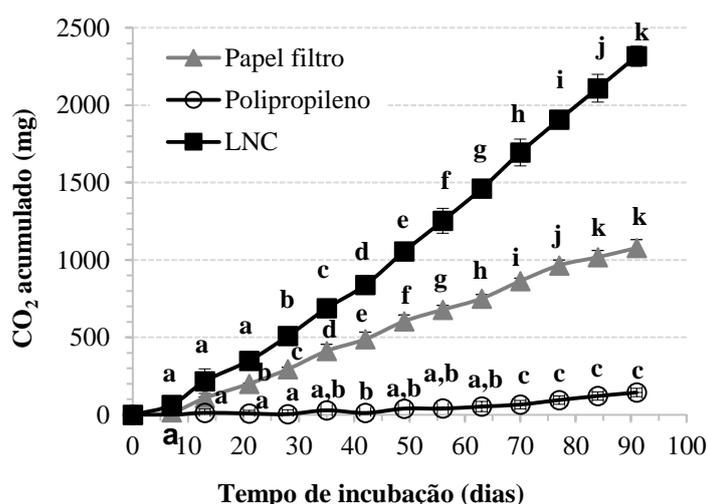


Figura 29. Geração de dióxido de carbono (CO₂) após exposição das amostras de LNC, controle positivo (celulose) e controle negativo (polipropileno) em ensaio de solo simulado durante 90 dias. *letras iguais significa equivalência estatística para os dados (análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey (p<0,05).

Os resultados mostraram uma quantidade maior de CO₂ liberado como produto metabolizado das amostras de LNC e de papel de filtro (controle positivo) em comparação com o controle negativo (polipropileno) (Figura 29). Esses resultados podem indicar a presença de um ambiente favorável ao desenvolvimento e nutrição dos microrganismos presentes nas amostras de solo. Portanto, isso garante a confiabilidade desse ensaios de biodegradação em solo simulado²⁸¹.

Observou-se um aumento significativo da produção de CO₂ para a formulação LNC, a partir do 30º dia ($p < 0,05$). Ainda, a curva de biodegradação referente à LNC não apresenta tendência à estabilização ($p < 0,05$), o que significa que a degradação biótica desse material continuará se a amostra for submetida a períodos mais longos de incubação. No entanto, não é esperado que 100% do carbono presente na amostra seja convertido em CO₂, uma vez que uma parte da cadeia polimérica é convertida em substâncias orgânicas e biomassa pelos microrganismos¹²⁹.

Esses resultados encontram-se de acordo com estudos anteriores que utilizaram o mesmo sistema de ensaios de biodegradação em solo simulado^{282,283}. No estudo realizado por Montagna et al., (2014)²⁸⁴ que investigou a biodegradação de polipropileno com aditivos pró degradantes, as amostras com o aditivo não mostraram tendência à estabilização até o período avaliado (100 dias). Porém, cabe salientar que a produção de CO₂ no estudo realizado com o polipropileno foi de cerca de 20 mg. Assim, como poderia ser esperado, observa-se o maior potencial de biodegradabilidade da PCL em relação ao polipropileno modificado. Uma vez que o início do processo de biodegradação depende do ataque dos microrganismos na superfície polimérica, preferencialmente hidrofílica, e que o polipropileno é composto somente de grupamentos CH₂ (hidrofóbicos), sua baixa biodegradabilidade é bem reportada na literatura. Por outro lado, conforme já mencionado anteriormente, os poliésteres alifáticos são conhecidos pela facilidade da hidrólise das ligações éster¹⁵⁵.

Como mencionado na seção de introdução, podem ser encontrados alguns estudos acerca da biodegradabilidade da PCL em meios como a compostagem¹⁸⁷, o lodo ativado¹⁶⁷ e em diferentes tipos de solos^{168,169,188}. Cabe salientar que, embora a biodegradação da PCL em sua forma macroscópica tenha sido avaliada, a biodegradação deste polímero em nanopartículas ainda não havia sido investigada.

Além disso, embora as nanopartículas poliméricas (LNC) investigadas na presente tese, sejam constituídas majoritariamente por PCL, há também a presença de outros materiais biodegradáveis, como os triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (TCC), e

os tensoativos, polisorbato 80 (P80) e monoestearato de sorbitano (MS). Nesse sentido, é possível encontrar alguns estudos que foram realizados avaliando a biodegradação e a segurança desses materiais. A biodegradabilidade de ésteres e polissorbatos de ácidos graxos de sorbitano, como o polissorbato 80 e monoestearato de sorbitano, tem sido amplamente comprovada, uma vez que eles também possuem usos extensivos aprovados pela FDA (Food and Drug Administration), como agentes antiespumantes, aromatizantes sintéticos, estabilizadores e emulsificantes em alimentos e em uma variedade de cosméticos e produtos medicinais²⁸⁵. Além disso, em 2005, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) publicou um documento²⁸⁵ que resume informações sobre os ésteres e polissorbatos de ácidos graxos de sorbitano, tais como suas propriedades físico-químicas, efeitos toxicológicos, perfil de exposição e destino ambiental e ecotoxicidade. Em relação ao destino ambiental, este documento destaca a existência limitada de estudos que avaliem esse parâmetro para os polissorbatos. Com base em estudos de biodegradação relatados para sorbitanos (monolaurato de sorbitano, monooleato de sorbitano e outros ácidos graxos), que sofrem biodegradação moderada no meio ambiente (60-83% em 28 dias), este documento ressalta a possibilidade de ser afirmado que, por analogia, pode ser esperado que os polissorbatos tenham características semelhantes no ambiente²⁸⁵.

Diante disso, os resultados obtidos quanto à biodegradação das LNC em solo, refutam a hipótese de que a estrutura supramolecular dos materiais na LNC não afetou sua biodegradabilidade. Adicionalmente, pela primeira vez, a biodegradação de LNC foi avaliada usando um teste respirométrico adaptado baseado em protocolos padronizados sob as diretrizes ASTM D 5338-98²²⁰ e D6003²²¹.

6. Conclusões

A partir do conjunto de resultados obtidos pode-se afirmar que, ao contrário do que foi previamente relatado, o armazenamento em temperaturas baixas (5 °C), sem esterilização, não garante a estabilidade química de nanocápsulas poliméricas preparadas com materiais biodegradáveis. No entanto, quando se esteriliza as formulações de LNC, os sistemas coloidais permanecem físico-quimicamente estáveis por 60 dias, sem que mudanças significativas de perda de massa sejam observadas por SEC após extração dos materiais. Esses resultados demonstram que produtos líquidos contendo dispersão aquosa de LNC são quimicamente estáveis após esterilização e armazenamento a 5 °C por 60 dias, demonstrando potencial aplicação para seu uso por via intravenosa, oral e/ou ocular.

Complementarmente, conclui-se que a composição da parede polimérica afetou significativamente a taxa de degradação das LNC por hidrólise. Assim, pode ser afirmado que a escolha da parede polimérica constituída de 100% da PCL $M_n=80\ 00\ \text{g mol}^{-1}$ (LNC 3) é indicada quando se deseja aumentar a estabilidade desses sistemas.

A detecção de microrganismos (bactérias e fungos leveduriformes) nas formulações não estéreis, permitiu concluir que a hidrólise química (abiótica) atuou em conjunto a uma hidrólise biótica catalisada por microrganismos. Adicionalmente, as maiores taxas de degradação das formulações não estéreis comprovam que os microrganismos mostraram atividade mesmo à baixa temperatura (5 °C) de armazenamento.

No período de tempo avaliado, o mecanismo de hidrólise não catalisado prevaleceu para ambas as formulações, estéreis e não estéreis. A formação do ácido 6-hidroxyhexanóico, gerado como principal produto da degradação da PCL, acarretou na diminuição do pH e dos valores de potencial zeta (em módulo).

Além disso, a técnica de SEC, bastante difundida na área de polímeros, mas ainda pouco utilizada em estudos para avaliar a estabilidade química de estruturas supramoleculares, mostrou ter alto potencial para a avaliação de todos os constituintes das nanocápsulas e não apenas da parede polimérica. Dessa forma, foi possível estabelecer uma metodologia sistematizada para a avaliação da estabilidade química de nanocápsulas poliméricas, contribuindo para um melhor entendimento acerca dos parâmetros que devem ser avaliados quando se deseja investigar a cinética de degradação desses sistemas.

Os ensaios de ecotoxicidade aquática permitiram estabelecer uma concentração de segurança (nível de exposição) referente à formulação (LNC) que pode estar presente no ambiente aquático em diferentes níveis tróficos (algas, micro crustáceos e peixes) sem causar efeitos nocivos. Assim, o presente estudo serve como suporte para a harmonização e uniformidade das metodologias utilizadas para futuras padronizações de testes de ecotoxicidade de nanopartículas em meio aquático.

Além disso, o teor de geração de CO₂ da formulação (LNC) em ensaio de biodegradação em solo simulado foi considerado satisfatório ao comparar com o teor de geração dos controles positivo (celulose) e negativo (polipropileno). Os resultados permitem afirmar a alta biodegradabilidade desses sistemas. Em conclusão, a estrutura supramolecular dos materiais constituintes da LNC, não afetou sua biodegradabilidade.

Por conseguinte, o resultado global desse trabalho consistiu não somente em uma importante contribuição no estabelecimento dos mecanismos envolvidos na hidrólise de nanocápsulas dispersas em água, mas também em resultados bastante promissores acerca da sistematização de uma metodologia de análise que permitiu avaliar esses sistemas de maneira integral. Adicionalmente, esses resultados contribuirão para o desenvolvimento de uma avaliação de risco de nanopartículas poliméricas, uma vez que essas informações são cruciais para melhorar os padrões de testes de bioensaios e estabelecer diretrizes quanto à segurança ambiental desses sistemas em aplicações futuras devido à inexistência de uma legislação vigente quanto ao impacto de sistemas nanoparticulados no meio ambiente.

7. Perspectivas futuras

- Analisar e identificar os microrganismos presentes nos ensaios de solo simulado, responsáveis pela biodegradação das LNC;
- Avaliar o perfil de biodegradação das nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNC) em meio aquoso através da proposta de um sistema que possibilite o monitoramento da geração de CO₂ (similar ao utilizado nos ensaios em solo simulado) e, além disso, de uma metodologia que permita avaliar a perda de massa das nanocápsulas ao final do período de exposição;
- Investigar o perfil de biodegradação em solos das nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNC) carregadas com fármacos, bem como funcionalizadas em sua superfície;
- Investigar o perfil de biodegradação em solos das nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNC) constituídas com diferentes paredes poliméricas (LNC 2 e LNC 3);
- Avaliar a ecotoxicidade das nanocápsulas poliméricas de núcleo lipídico (LNC) carregadas com fármacos, bem como funcionalizadas em sua superfície, a fim de propor uma tabela com as concentrações de lançamento em corpos hídricos que não causem efeitos nocivos aos níveis tróficos aquáticos.

8. Referências

- (1) Shi, J.; Votruba, A. R.; Farokhzad, O. C.; Langer, R. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. *Nano Lett.* **2010**, *10* (9), 3223–3230.
- (2) Torchilin, V. P. Drug Targeting. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *11 Suppl 2*, S81-91.
- (3) Barratt, G. Colloidal Drug Carriers: Achievements and Perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60* (1), 21–37.
- (4) Fontana, M. C.; Coradini, K.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R.; Beck, R. C. R. Nanoencapsulation as a Way to Control the Release and to Increase the Photostability of Clobetasol Propionate: Influence of the Nanostructured System. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2009**, *5* (3), 254–263.
- (5) Shen, Y.; Jin, E.; Zhang, B.; Murphy, C. J.; Sui, M.; Zhao, J.; Wang, J.; Tang, J.; Fan, M.; Van Kirk, E.; et al. Prodrugs Forming High Drug Loading Multifunctional Nanocapsules for Intracellular Cancer Drug Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (12), 4259–4265.
- (6) Aslan, B.; Ozpolat, B.; Sood, A. K.; Lopez-Berestein, G. Nanotechnology in Cancer Therapy. *J. Drug Target.* **2013**, *21* (10), 904–913.
- (7) Couvreur, P.; Barratt, G.; Fattal, E.; Legrand, P.; Vauthier, C. Nanocapsule Technology: A Review. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **2002**, *19* (2), 99–134.
- (8) Mora-Huertas, C. E.; Fessi, H.; Elaissari, A. Polymer-Based Nanocapsules for Drug Delivery. *Int. J. Pharm.* **2010**, *385* (1–2), 113–142.
- (9) Rong, X.; Xie, Y.; Hao, X.; Chen, T.; Wang, Y.; Liu, Y. Applications of Polymeric Nanocapsules in Field of Drug Delivery Systems. *Curr. Drug Discov. Technol.* **2011**, *8* (3), 173–187.
- (10) Rosset, V.; Ahmed, N.; Zaanoun, I.; Stella, B.; Fessi, H.; Elaissari, A. Elaboration of Argan Oil Nanocapsules Containing Naproxen for Cosmetic and Transdermal Local Application. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **2012**, *1* (2), 218–224.
- (11) Rawat, M.; Singh, D.; Saraf, S.; Saraf, S. Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29* (9), 1790–1798.
- (12) Contri, R. V.; Kaiser, M.; Poletto, F. S.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. Simultaneous Control of Capsaicinoids Release from Polymeric Nanocapsules. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, *11* (3), 2398–2406.

- (13) Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. de L.; Pohlmann, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nov.* **2003**, *26* (5), 726–737.
- (14) Dimer, F. A.; Friedrich, R. B.; Beck, R. C. R.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. *Quim. Nov.* **2013**, *36* (10), 1520–1526.
- (15) Cruz, L.; Schaffazick, S. R.; Dalla Costa, T.; Soares, L. U.; Mezzalira, G.; da Silveira, N. P.; Schapoval, E. E. S.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. Physico-Chemical Characterization and in Vivo Evaluation of Indomethacin Ethyl Ester-Loaded Nanocapsules by PCS, TEM, SAXS, Interfacial Alkaline Hydrolysis and Antiedematogenic Activity. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6* (9–10), 3154–3162.
- (16) Gupta, S.; Vyas, S. P. Development and Characterization of Amphotericin B Bearing Emulsomes for Passive and Active Macrophage Targeting. *J. Drug Target.* **2007**, *15* (3), 206–217.
- (17) Rieux, A. des; Fievez, V.; Garinot, M.; Schneider, Y.-J.; Pr eat, V. Nanoparticles as Potential Oral Delivery Systems of Proteins and Vaccines: A Mechanistic Approach. *J. Control. Release* **2006**, *116* (1), 1–27.
- (18) Torchilin, V. P. Multifunctional Nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 302–315.
- (19) Jalil, R.; Nixon, J. R. Microencapsulation Using Poly(DL-Lactic Acid) III: Effect of Polymer Molecular Weight on the Release Kinetics. *J. Microencapsul.* **1990**, *7* (3), 357–374.
- (20) Sinha, V. R.; Bansal, K.; Kaushik, R.; Kumria, R.; Trehan, A. Poly-ε-Caprolactone Microspheres and Nanospheres: An Overview. *Int. J. Pharm.* **2004**, *278* (1), 1–23.
- (21) Teixeira, M.; Alonso, M. J.; Pinto, M. M. M.; Barbosa, C. M. Development and Characterization of PLGA Nanospheres and Nanocapsules Containing Xanthone and 3-Methoxyxanthone. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2005**, *59* (3), 491–500.
- (22) Bernardi, A.; Braganhol, E.; J ager, E.; Figueir o, F.; Edelweiss, M. I.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Battastini, A. M. O. Indomethacin-Loaded Nanocapsules Treatment Reduces in Vivo Glioblastoma Growth in a Rat Glioma Model. *Cancer Lett.* **2009**, *281* (1), 53–63.

- (23) Ourique, A. F.; Azoubel, S.; Ferreira, C. V.; Silva, C. B.; Marchiori, M. C. L.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Beck, R. C. R. Lipid-Core Nanocapsules as a Nanomedicine for Parenteral Administration of Tretinoin: Development and in Vitro Antitumor Activity on Human Myeloid Leukaemia Cells. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2010**, *6* (3), 214–223.
- (24) Bernardi, A.; Zilberstein, A. C. C. V.; Jäger, E.; Campos, M. M.; Morrone, F. B.; Calixto, J. B.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Battastini, A. M. O. Effects of Indomethacin-Loaded Nanocapsules in Experimental Models of Inflammation in Rats. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *158* (4), 1104–1111.
- (25) Cattani, V. B.; Fiel, L. A.; Jäger, A.; Jäger, E.; Colomé, L. M.; Uchoa, F.; Stefani, V.; Costa, T. D.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Lipid-Core Nanocapsules Restrained the Indomethacin Ethyl Ester Hydrolysis in the Gastrointestinal Lumen and Wall Acting as Mucoadhesive Reservoirs. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *39* (1–3), 116–124.
- (26) Frozza, R. L.; Bernardi, A.; Paese, K.; Hoppe, J. B.; da Silva, T.; Battastini, A. M. O.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Salbego, C. Characterization of Trans-Resveratrol-Loaded Lipid-Core Nanocapsules and Tissue Distribution Studies in Rats. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2010**, *6* (6), 694–703.
- (27) Bender, E. A.; Cavalcante, M. F.; Adorne, M. D.; Colomé, L. M.; Guterres, S. S.; Abdalla, D. S. P.; Pohlmann, A. R. New Strategy to Surface Functionalization of Polymeric Nanoparticles: One-Pot Synthesis of ScFv Anti-LDL(–)-Functionalized Nanocapsules. *Pharm. Res.* **2014**, *31* (11), 2975–2987.
- (28) Drewes, C.; Fiel, L.; Bexiga, C.; Asbahr, A. C.; Uchiyama, M.; Cogliati, B.; Araki, K.; Guterres, S.; Pohlmann, A.; Farsky, S. Novel Therapeutic Mechanisms Determine the Effectiveness of Lipid-Core Nanocapsules on Melanoma Models. *Int. J. Nanomedicine* **2016**, *11*, 1261.
- (29) Bulcão, R. P.; Freitas, F. A.; Venturini, C. G.; Dallegrave, E.; Durgante, J.; Göethel, G.; Cerski, C. T. S.; Zielinsky, P.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; et al. Acute and Subchronic Toxicity Evaluation of Poly(ϵ -Caprolactone) Lipid-Core Nanocapsules in Rats. *Toxicol. Sci.* **2013**, *132* (1), 162–176.
- (30) Bulcão, R. P.; de Freitas, F. A.; Dallegrave, E.; Venturini, C. G.; Baierle, M.; Durgante, J.; Sauer, E.; Cassini, C.; Cerski, C. T.; Zielinsky, P.; et al. In Vivo Toxicological Evaluation of Polymeric Nanocapsules after Intradermal Administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2014**, *86* (2), 167–177.

- (31) Bulcão, R. P.; Bubols, G. B.; Nascimento, S. N.; Gauer, B.; Sauer, E.; Baierle, M.; Charão, M. F.; Moro, A.; Brucker, N.; Bruinsmann, F. A.; et al. Do Poly(Epsilon-Caprolactone) Lipid-Core Nanocapsules Induce Oxidative or Inflammatory Damage after in Vivo Subchronic Treatment? *Toxicol. Res. (Camb)*. **2015**, *4* (4), 994–1005.
- (32) Charão, M. F.; Souto, C.; Brucker, N.; Barth, A.; Jornada, D. S.; Fagundez, D.; Ávila, D. S.; Eifler-Lima, V. L.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R.; et al. Caenorhabditis Elegans as an Alternative in Vivo Model to Determine Oral Uptake, Nanotoxicity, and Efficacy of Melatonin-Loaded Lipid-Core Nanocapsules on Paraquat Damage. *Int. J. Nanomedicine* **2015**, *10*, 5093–5106.
- (33) Lead, J. R.; Wilkinson, K. J. Aquatic Colloids and Nanoparticles: Current Knowledge and Future Trends. *Environ. Chem* **2006**, *3*, 159–171.
- (34) Rand, G. M. *Fundamentals of Aquatic Toxicology : Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*, 2nd ed.; Taylor & Francis: Washington D.C., 1995.
- (35) Gherardi-Goldstein, E.; Bertoletti, E.; Zagatto, P. A.; Araújo, R. P. de A.; Ramos, M. de L. L. de C.; Ambiental, C. de T. de S. Procedimentos Para Utilização de Testes de Toxicidade No Controle de Efluentes Líquidos. *CETESB série manuais* **1990**.
- (36) Ribo, J. M. Interlaboratory Comparison Studies of the Luminescent Bacteria Toxicity Bioassay. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **1997**, *12* (4), 283–294.
- (37) Reginatto, V. Avaliação Do Ensaio de Toxicidade Com a Alga Scenedesmus Subspicatus Para o Estudo de Efluentes Industriais, UNICAMP, 1998.
- (38) Spenlehauer, G.; Vert, M.; Benoit, J. P.; Boddaert, A. In Vitro and in Vivo Degradation of Poly(D,L Lactide/Glycolide) Type Microspheres Made by Solvent Evaporation Method. *Biomaterials* **1989**, *10* (8), 557–563.
- (39) Coffin, M. D.; McGinity, J. W. Biodegradable Pseudolatexes: The Chemical Stability of Poly(D,L-Lactide) and Poly (ϵ -Caprolactone) Nanoparticles in Aqueous Media. *Pharm. Res.* **1992**, *09* (2), 200–205.
- (40) Zweers, M. L. T.; Engbers, G. H. M.; Grijpma, D. W.; Feijen, J. In Vitro Degradation of Nanoparticles Prepared from Polymers Based on DL-Lactide, Glycolide and Poly(Ethylene Oxide). *J. Control. Release* **2004**, *100* (3), 347–356.
- (41) Mohammad, A. K.; Reineke, J. J. Quantitative Detection of PLGA Nanoparticle Degradation in Tissues Following Intravenous Administration. *Mol. Pharm.* **2013**, *10* (6), 2183–2189.

- (42) Campos, D. A.; Madureira, A. R.; Sarmiento, B.; Pintado, M. M.; Gomes, A. M. Technological Stability of Solid Lipid Nanoparticles Loaded with Phenolic Compounds: Drying Process and Stability along Storage. *J. Food Eng.* **2017**, *196*, 1–10.
- (43) Bittner, B.; Mäder, K.; Kroll, C.; Borchert, H. H.; Kissel, T. Tetracycline-HCl-Loaded Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Microspheres Prepared by a Spray Drying Technique: Influence of Gamma-Irradiation on Radical Formation and Polymer Degradation. *J. Control. Release* **1999**, *59* (1), 23–32.
- (44) Blanco, M. D.; Sastre, R. L.; Teijón, C.; Olmo, R.; Teijón, J. M. Degradation Behaviour of Microspheres Prepared by Spray-Drying Poly(D,L-Lactide) and Poly(d,l-Lactide-Co-Glycolide) Polymers. *Int. J. Pharm.* **2006**, *326* (1–2), 139–147.
- (45) Zolnik, B. S.; Burgess, D. J. Effect of Acidic PH on PLGA Microsphere Degradation and Release. *J. Control. Release* **2007**, *122* (3), 338–344.
- (46) Belbella, A.; Vauthier, C.; Fessi, H.; Devissaguet, J.-P.; Puisieux, F. In Vitro Degradation of Nanospheres from Poly(D,L-Lactides) of Different Molecular Weights and Polydispersities. *Int. J. Pharm.* **1996**, *129* (1–2), 95–102.
- (47) Rodrigues, J. Primaquine-Loaded Poly(Lactide) Nanoparticles: Physicochemical Study and Acute Tolerance in Mice. *Int. J. Pharm.* **1995**, *126* (1–2), 253–260.
- (48) Calvo, P.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J. Comparative in Vitro Evaluation of Several Colloidal Systems, Nanoparticles, Nanocapsules, and Nanoemulsions, as Ocular Drug Carriers. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85* (5), 530–536.
- (49) Lemoine, D.; Francois, C.; Kedzierewicz, F.; Preat, V.; Hoffman, M.; Maincent, P. Stability Study of Nanoparticles of Poly(ϵ -Caprolactone), Poly(d,l-Lactide) and Poly(d,l-Lactide-Co-Glycolide). *Biomaterials* **1996**, *17* (22), 2191–2197.
- (50) Paul, M.; Fessi, H.; Laatis, A.; Boulard, Y.; Durand, R.; Deniau, M.; Astier, A. Pentamidine-Loaded Poly(D,L-Lactide) Nanoparticles: Physicochemical Properties and Stability Work. *Int. J. Pharm.* **1997**, *159* (2), 223–232.
- (51) Chen, D. .; Bei, J. .; Wang, S. . Polycaprolactone Microparticles and Their Biodegradation. *Polym. Degrad. Stab.* **2000**, *67* (3), 455–459.
- (52) Chen, D. .; Bei, J. .; Wang, S. . Polycaprolactone Microparticles and Their Biodegradation. *Polym. Degrad. Stab.* **2000**, *67* (3), 455–459.
- (53) Lenaerts, V.; Couvreur, P.; Christiaens-Leyh, D.; Joiris, E.; Roland, M.; Rollman, B.; Speiser, P. Degradation of Poly (Isobutyl Cyanoacrylate) Nanoparticles.

- Biomaterials* **1984**, 5 (2), 65–68.
- (54) Brum, A. A. S.; Santos, P. P. dos; Silva, M. M. da; Paese, K.; Guterres, S. S.; Costa, T. M. H.; Pohlmann, A. R.; Jablonski, A.; Flôres, S. H.; Rios, A. de O. Lutein-Loaded Lipid-Core Nanocapsules: Physicochemical Characterization and Stability Evaluation. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2017**, 522, 477–484.
- (55) Woodruff, M. A.; Hutmacher, D. W. The Return of a Forgotten Polymer— Polycaprolactone in the 21st Century. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, 35 (10), 1217–1256.
- (56) Franks, F. Freeze-Drying of Bioproducts: Putting Principles into Practice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, 45 (3), 221–229.
- (57) 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. *Int. J. Pharm.* **2006**, 309 (1–2), 178–188.
- (58) Abdelwahed, W.; Degobert, G.; Fessi, H. Investigation of Nanocapsules Stabilization by Amorphous Excipients during Freeze-Drying and Storage. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, 63 (2), 87–94.
- (59) de Chasteigner, S.; Cavé, G.; Fessi, H.; Devissaguet, J.-P.; Puisieux, F. Freeze-Drying of Itraconazole-Loaded Nanosphere Suspensions: A Feasibility Study. *Drug Dev. Res.* **1996**, 38 (2), 116–124.
- (60) Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; Dalla-Costa, T.; Guterres, S. S. Freeze-Drying Polymeric Colloidal Suspensions: Nanocapsules, Nanospheres and Nanodispersion. A Comparative Study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2003**, 56 (3), 501–505.
- (61) Chacón, M.; Molpeceres, J.; Berges, L.; Guzmán, M.; Aberturas, M. R. Stability and Freeze-Drying of Cyclosporine Loaded Poly(D,L Lactide-Glycolide) Carriers. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1999**, 8 (2), 99–107.
- (62) Pohlmann, A. R.; Weiss, V.; Mertins, O.; Pesce da Silveira, N.; Guterres, S. S. Spray-Dried Indomethacin-Loaded Polyester Nanocapsules and Nanospheres: Development, Stability Evaluation and Nanostructure Models. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2002**, 16 (4), 305–312.
- (63) Cao, G. *Nanostructures & Nanomaterials : Synthesis, Properties & Applications*; Imperial College Press, 2004.
- (64) Sahoo, S. K.; Parveen, S.; Panda, J. J. The Present and Future of Nanotechnology

- in Human Health Care. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2007**, *3* (1), 20–31.
- (65) Comission, E. L 275/38. *J. Of. da União Eur.* **2011**, 38–40.
- (66) Miyazaki, K.; Islam, N. Nanotechnology Systems of Innovation—An Analysis of Industry and Academia Research Activities. *Technovation* **2007**, *27* (11), 661–675.
- (67) Sozer, N.; Kokini, J. L. Nanotechnology and Its Applications in the Food Sector. *Trends Biotechnol.* **2009**, *27* (2), 82–89.
- (68) Park, K. Nanotechnology: What It Can Do for Drug Delivery. *J. Control. Release* **2007**, *120* (1–2), 1–3.
- (69) Jong, W. H. De; Borm, P. J. A. Drug Delivery and Nanoparticles: Applications and Hazards. *Int. J. Nanomedicine* **2008**, *3* (2), 133–149.
- (70) Sanguansri, P.; Augustin, M. A. Nanoscale Materials Development – a Food Industry Perspective. *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, *17* (10), 547–556.
- (71) Ahmed, N.; Fessi, H.; Elaissari, A. Theranostic Applications of Nanoparticles in Cancer. *Drug Discov. Today* **2012**, *17* (17), 928–934.
- (72) Jäger, A.; Stefani, V.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Physico-Chemical Characterization of Nanocapsule Polymeric Wall Using Fluorescent Benzazole Probes. *Int. J. Pharm.* **2007**, *338* (1–2), 297–305.
- (73) Couvreur, P.; Dubernet, C.; Puisieux, F. Controlled Drug Delivery with Nanoparticles : Current Possibilities and Future Trends. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1995**, *41* (1), 2–13.
- (74) Letchford, K. A Review of the Formation and Classification of Amphiphilic Block Copolymer Nanoparticulate Structures: Micelles, Nanospheres, Nanocapsules and Polymersomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *65* (3), 259–269.
- (75) Kumari, A.; Yadav, S. K.; Yadav, S. C. Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2010**, *75* (1), 1–18.
- (76) Acharya, S.; Sahoo, S. K. PLGA Nanoparticles Containing Various Anticancer Agents and Tumour Delivery by EPR Effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63* (3), 170–183.
- (77) Ferrari, M.; Onuoha, S. C.; Pitzalis, C. Trojan Horses and Guided Missiles: Targeted Therapies in the War on Arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2015**, *11* (6),

- 328–337.
- (78) Alexis, F.; Pridgen, E.; Molnar, L. K.; Farokhzad, O. C. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2008**, *5* (4), 505–515.
- (79) Bertrand, N.; Wu, J.; Xu, X.; Kamaly, N.; Farokhzad, O. C. Cancer Nanotechnology: The Impact of Passive and Active Targeting in the Era of Modern Cancer Biology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *66*, 2–25.
- (80) Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C. Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Practice. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53* (2), 283–318.
- (81) Magenheim, B.; Benita, S. Nanoparticle Characterization : A Comprehensive Physicochemical Approach. *S.T.P. Pharma Sci.* **1991**, *1* (4), 221–241.
- (82) Delie, F.; Blanco-Príeto, M. J. Polymeric Particulates to Improve Oral Bioavailability of Peptide Drugs. *Molecules* **2005**, *10* (1), 65–80.
- (83) Steichen, S. D.; Caldorera-Moore, M.; Peppas, N. A. A Review of Current Nanoparticle and Targeting Moieties for the Delivery of Cancer Therapeutics. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *48* (3), 416–427.
- (84) Pérez-Herrero, E.; Fernández-Medarde, A. Advanced Targeted Therapies in Cancer: Drug Nanocarriers, the Future of Chemotherapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *93*, 52–79.
- (85) Jung, T.; Kamm, W.; Breitenbach, A.; Kaiserling, E.; Xiao, J. X.; Kissel, T. Biodegradable Nanoparticles for Oral Delivery of Peptides: Is There a Role for Polymers to Affect Mucosal Uptake? *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50* (1), 147–160.
- (86) Vila, A.; Sánchez, A.; Tobío, M.; Calvo, P.; Alonso, M. J. Design of Biodegradable Particles for Protein Delivery. *J. Control. Release* **2002**, *78* (1–3), 15–24.
- (87) Jäger, E.; Venturini, C. G.; Poletto, F. S.; Colomé, L. M.; Pohlmann, J. P. U.; Bernardi, A.; Battastini, A. M. O.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Sustained Release from Lipid-Core Nanocapsules by Varying the Core Viscosity and the Particle Surface Area. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2009**, *5* (1), 130–140.
- (88) Venturini, C. G.; Jäger, E.; Oliveira, C. P.; Bernardi, A.; Battastini, A. M. O.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Formulation of Lipid Core Nanocapsules. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2011**, *375* (1), 200–208.

- (89) Oliveira, C. P.; Venturini, C. G.; Donida, B.; Poletto, F. S.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. An Algorithm to Determine the Mechanism of Drug Distribution in Lipid-Core Nanocapsule Formulations. *Soft Matter* **2013**, *9* (4), 1141–1150.
- (90) Müller, C. R.; Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; de Lucca Freitas, L.; Pesce da Silveira, N.; Dalla Costa, T.; Guterres, S. S. Spray-Dried Diclofenac-Loaded Poly(Epsilon-Caprolactone) Nanocapsules and Nanospheres. Preparation and Physicochemical Characterization. *Pharmazie* **2001**, *56* (11), 864–867.
- (91) Cruz, L.; Soares, L. U.; Dalla, T.; Mezzalira, G.; Nadya, P.; Guterres, S.; Pohlmann, A. R. Diffusion and Mathematical Modeling of Release Profiles from Nanocarriers. **2006**, *313*, 198–205.
- (92) Poletto, F. S.; De Oliveira, C. P.; Wender, H.; Regent, D.; Donida, B.; Teixeira, S. R.; Guterres, S. S.; Rossi-Bergmann, B.; Pohlmann, A. R. How Sorbitan Monostearate Can Increase Drug-Loading Capacity of Lipid-Core Polymeric Nanocapsules. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2015**, *15* (1), 827–837.
- (93) Fiel, L. A.; Rebêlo, L. M.; Santiago, T. de M.; Adorne, M. D.; Guterres, S. S.; Sousa, J. S. de; Pohlmann, A. R. Diverse Deformation Properties of Polymeric Nanocapsules and Lipid-Core Nanocapsules. *Soft Matter* **2011**, *7*, 7240–7247.
- (94) Brum, T. L. De; Fiel, L. A.; Contri, R. V; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Polymeric Nanocapsules and Lipid-Core Nanocapsules Have Diverse Skin Penetration. **2015**, *15* (1), 773–780.
- (95) Folkman, J.; Long, D. M. THE USE OF SILICONE RUBBER AS A CARRIER FOR PROLONGED DRUG THERAPY. *J. Surgical Res.* **1964**, *4*, 139–142.
- (96) Langer, R.; Folkman, J. Polymers for the Sustained Release of Proteins and Other Macromolecules. *Nature* **1976**, *263* (5580), 797–800.
- (97) Higuchi, T.; Kuramoto, R. Study of Possible Complex Formation between Macromolecules and Certain Pharmaceuticals. II. Polyvinylpyrrolidone with p-Aminobenzoic Acid, Aminopyrine, Benzoic Acid, Salicylic Acid, p-Hydroxybenzoic Acid, m-Hydroxybenzoic Acid, Citric Acid, and Phenobarbi. *J. Am. Pharm. Assoc.* **1954**, *43* (7), 398–401.
- (98) Roseman, T. J.; Higuchi, W. I.; Moyer, D. L. Release of Medroxyprogesterone Acetate from a Silicone Polymer. *J. Pharm. Sci.* **1970**, *59* (3), 353–357.
- (99) Roseman, T. J.; Roseman, T. J.; Higuchi, T.; Busse, L. W.; Wurster, D. E. Release of Steroids from a Silicone Polymer. *J. Pharm. Sci.* **1972**, *61* (1), 46–50.

- (100) Peppas, N. A.; Merrill, E. W. Development of Semicrystalline Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogels for Biomedical Applications. *J. Biomed. Mater. Res.* **1977**, *11* (3), 423–434.
- (101) Langer, R. S.; Peppas, N. A. Present and Future Applications of Biomaterials in Controlled Drug Delivery Systems. *Biomaterials* **1981**, *2* (4), 201–214.
- (102) Heller, J. Controlled Release of Biologically Active Compounds from Bioerodible Polymers. *Biomaterials* **1980**, *1* (1), 51–57.
- (103) Heller, J.; Himmelstein, K. J. Poly(Ortho Ester) Biodegradable Polymer Systems. *Methods Enzymol.* **1985**, *112*, 422–436.
- (104) Lassalle, V.; Ferreira, M. L. PLA Nano- and Microparticles for Drug Delivery: An Overview of the Methods of Preparation. *Macromol. Biosci.* **2007**, *7* (6), 767–783.
- (105) Madhavan Nampoothiri, K.; Nair, N. R.; John, R. P. An Overview of the Recent Developments in Polylactide (PLA) Research. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101* (22), 8493–8501.
- (106) Lee, B. K.; Yun, Y.; Park, K. PLA Micro- and Nano-Particles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *107*, 176–191.
- (107) Bala, I.; Hariharan, S.; Kumar, M. N. V. R. PLGA Nanoparticles in Drug Delivery: The State of the Art. *Crit. Rev. Ther. Drug Car. Syst.* **2004**, *21* (5), 387–422.
- (108) Lü, J.-M.; Wang, X.; Marin-Muller, C.; Wang, H.; Lin, P. H.; Yao, Q.; Chen, C. Current Advances in Research and Clinical Applications of PLGA-Based Nanotechnology. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2009**, *9* (4), 325–341.
- (109) Anderson, J. M.; Shive, M. S. Biodegradation and Biocompatibility of PLA and PLGA Microspheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64* (SUPPL.), 72–82.
- (110) Danhier, F.; Ansorena, E.; Silva, J. M.; Coco, R.; Le Breton, A.; Préat, V. PLGA-Based Nanoparticles: An Overview of Biomedical Applications. *J. Control. Release* **2012**, *161* (2), 505–522.
- (111) Pohlmann, A. R.; Fonseca, F. N.; Paese, K.; Detoni, C. B.; Coradini, K.; Beck, R. C.; Guterres, S. S. Poly(ϵ -Caprolactone) Microcapsules and Nanocapsules in Drug Delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2013**, *10* (5), 623–638.
- (112) Vert, M.; Li, S. M.; Spenlehauer, G.; Guerin, P. Bioresorbability and Biocompatibility of Aliphatic Polyesters. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1992**, *3* (6), 432–446.

- (113) Uhrich, K. E.; Cannizzaro, S. M.; Langer, R. S.; Shakesheff, K. M. Polymeric Systems for Controlled Drug Release. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (11), 3181–3198.
- (114) Edlund, U.; Albertsson, A.-C. Degradable Polymer Microspheres for Controlled Drug Delivery. In *Degradable Aliphatic Polyesters*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2002; pp 67–112.
- (115) Höglund, A.; Odelius, K.; Hakkarainen, M.; Albertsson, A.-C. Controllable Degradation Product Migration from Cross-Linked Biomedical Polyester-Ethers through Predetermined Alterations in Copolymer Composition. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (6), 2025–2032.
- (116) Ignatius, A. A.; Claes, L. E. In Vitro Biocompatibility of Bioresorbable Polymers: Poly(L, DL-Lactide) and Poly(L-Lactide-Co-Glycolide). *Biomaterials* **1996**, *17* (8), 831–839.
- (117) Singh, R. P.; Ramarao, P. Accumulated Polymer Degradation Products as Effector Molecules in Cytotoxicity of Polymeric Nanoparticles. *Toxicol. Sci.* **2013**, *136* (1), 131–143.
- (118) Böstman, O.; Hirvensalo, E.; Mäkinen, J.; Rokkanen, P. Foreign-Body Reactions to Fracture Fixation Implants of Biodegradable Synthetic Polymers. *J. Bone Joint Surg. Br.* **1990**, *72* (4), 592–596.
- (119) Kim, M. S.; Ahn, H. H.; Shin, Y. N.; Cho, M. H.; Khang, G.; Lee, H. B. An in Vivo Study of the Host Tissue Response to Subcutaneous Implantation of PLGA- and/or Porcine Small Intestinal Submucosa-Based Scaffolds. *Biomaterials* **2007**, *28* (34), 5137–5143.
- (120) Cao, H.; Mchugh, K.; Chew, S. Y.; Anderson, J. M. The Topographical Effect of Electrospun Nanofibrous Scaffolds on the in Vivo and in Vitro Foreign Body Reaction. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2010**, *93* (3), 1151–1159.
- (121) Cordewener, F. W.; van Geffen, M. F.; Joziassse, C. A. .; Schmitz, J. P.; Bos, R. R. .; Rozema, F. R.; Pennings, A. J. Cytotoxicity of Poly(96l/4d-Lactide): The Influence of Degradation and Sterilization. *Biomaterials* **2000**, *21* (23), 2433–2442.
- (122) Brocker, C.; Thompson, D. C.; Vasiliou, V. The Role of Hyperosmotic Stress in Inflammation and Disease. *Biomol Concepts* **2012**, *3* (4), 345–364.
- (123) Lee, J. H.; Kim, M.; Im, Y. S.; Choi, W.; Byeon, S. H.; Lee, H. K. NFAT5 Induction and Its Role in Hyperosmolar Stressed AND. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2008**, *49* (5), 1827–1835.

- (124) Schwartz, L.; Guais, A.; Pooya, M. Is Inflammation a Consequence of Extracellular Hyperosmolarity? *J. Inflamm.* **2009**, *6* (21), 1–10.
- (125) Jain, A. K.; Swarnakar, N. K.; Godugu, C.; Singh, R. P.; Jain, S. Biomaterials The Effect of the Oral Administration of Polymeric Nanoparticles on the Efficiency and Toxicity of Tamoxifen. *Biomaterials* **2011**, *32* (2), 503–515.
- (126) Prencipe, G.; Tabakman, S. M.; Welsher, K.; Liu, Z.; Goodwin, A. P.; Henry, J.; Dai, H.; Building, K. S.; Way, R. NIH Public Access. **2010**, *131* (13), 4783–4787.
- (127) Lucas, N.; Bienaime, C.; Belloy, C.; Queneudec, M.; Silvestre, F.; Nava-Saucedo, J.-E. Polymer Biodegradation: Mechanisms and Estimation Techniques. **2008**.
- (128) Krzan, A.; Hemjinda, S.; Miertus, S.; Corti, A.; Chiellini, E. Standardization and Certification in the Area of Environmentally Degradable Plastics. *Polym. Degrad. Stab.* **2006**, *91* (12), 2819–2833.
- (129) Rudnik, E.; Briassoulis, D. Comparative Biodegradation in Soil Behaviour of Two Biodegradable Polymers Based on Renewable Resources. *J. Polym. Environ.* **2011**, *19* (1), 18–39.
- (130) Vert, M.; Doi, Y.; Hellwich, K.-H.; Hess, M.; Hodge, P.; Kubisa, P.; Rinaudo, M.; Schué, F. Terminology for Biorelated Polymers and Applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure Appl. Chem.* **2012**, *84* (2), 377–410.
- (131) Duval, C. *Matières Plastiques et Environnement Recyclage, Valorisation, Biodégradabilité, Écoconception*; L'Usine nouvelle, 2009.
- (132) Hamid, S. H. *Handbook of Polymer Degradation, Second Edition*.
- (133) Narayan, R. Biodegradable and Biobased Plastics: An Overview; 2017; pp 23–34.
- (134) Brandalise, R. N. Mistura Polimérica De Polietileno De Alta Densidade Com O Poli (Álcool Vinílico) Mistura Polimérica De Polietileno De Alta Densidade Com O Poli (Álcool Vinílico). **2008**, 161.
- (135) Carlsson, D. J.; Wiles, D. M. The Photodegradation of Polypropylene Films. II. Photolysis of Ketonic Oxidation Products. *Macromolecules* **1969**, *2* (6), 587–597.
- (136) Chiellini, E.; Corti, A.; Swift, G. Biodegradation of Thermally-Oxidized, Fragmented Low-Density Polyethylenes.
- (137) Thornberg, S. M.; Bernstein, R.; Irwin, A. N.; Derzon, D. K.; Klamo, S. B.; Clough, R. L. The Genesis of CO₂ and CO in the Thermooxidative Degradation

- of Polypropylene. *Polym. Degrad. Stab.* **2007**, 92 (1), 94–102.
- (138) Rabek, J. F. *Polymer Photodegradation : Mechanisms and Experimental Methods*; Springer, 1995.
- (139) Müller, R.-J.; Witt, U.; Rantze, E.; Deckwer, W.-D. Architecture of Biodegradable Copolyesters Containing Aromatic Constituents. *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, 59 (1–3), 203–208.
- (140) Tsuji, H.; Ikada, Y. Properties and Morphology of Poly(l-Lactide) 4. Effects of Structural Parameters on Long-Term Hydrolysis of Poly(l-Lactide) in Phosphate-Buffered Solution. *Polym. Degrad. Stab.* **2000**, 67 (1), 179–189.
- (141) He, Y.; Qian, Z.; Zhang, H.; Liu, X. Alkaline Degradation Behavior of Polyesteramide Fibers: Surface Erosion. *Colloid Polym Sci* **2004**, 282, 972–978.
- (142) Le Digabel, F.; Avérous, L. Effects of Lignin Content on the Properties of Lignocellulose-Based Biocomposites.
- (143) Yew, G. H.; Mohd Yusof, A. M.; Mohd Ishak, Z. A.; Ishiaku, U. S. Water Absorption and Enzymatic Degradation of Poly(Lactic Acid)/Rice Starch Composites. *Polym. Degrad. Stab.* **2005**, 90 (3), 488–500.
- (144) Wallström, S.; Strömberg, E.; Karlsson, S. Microbiological Growth Testing of Polymeric Materials: An Evaluation of New Methods. *Polym. Test.* **2005**, 24 (5), 557–563.
- (145) Gu, J. D. Microbiological Deterioration and Degradation of Synthetic Polymeric Materials: Recent Research Advances. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2003**, 52 (2), 69–91.
- (146) Lugauskas, A.; Levinskaite, L.; Pečiulyte, D. Micromycetes as Deterioration Agents of Polymeric Materials. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2003**, 52 (4), 233–242.
- (147) Pitt, G.; Gratzl, M.; Kimmel, G.; Surles, J.; Sohindler, A. Aliphatic Polyesters II. The Degradation of Poly (DL-Lactide), Poly (ϵ -Caprolactone), and Their Copolymers in Vivo. *Biomaterials* **1981**, 2 (4), 215–220.
- (148) Li, S. M.; Garreau, H.; Vert, M. Structure-Property Relationships in the Case of the Degradation of Massive Poly(α -Hydroxy Acids) in Aqueous Media. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1990**, 1 (3), 131–139.
- (149) Grizzi, I.; Garreau, H.; Li, S.; Vert, M. Hydrolytic Degradation of Devices Based on Poly(DL-Lactic Acid) Size-Dependence. *Biomaterials* **1995**, 16 (4), 305–311.
- (150) Göpferich, A. Mechanisms of Polymer Degradation and Erosion. *Biomaterials*

- 1996**, *17* (2), 103–114.
- (151) Vert, M.; Mauduit, J.; Li, S. Biodegradation of PLA/GA Polymers: Increasing Complexity. *Biomaterials* **1994**, *15* (15), 1209–1213.
- (152) Cha, Y.; Pitt, C. G. The Biodegradability of Polyester Blends. *Biomaterials* **1990**, *11* (2), 108–112.
- (153) Pitt, C. G.; Zhong-wei, G. Modification of the Rates of Chain Cleavage of Poly(ϵ -Caprolactone) and Related Polyesters in the Solid State. *J. Control. Release* **1987**, *4* (4), 283–292.
- (154) Albertsson, A.-C. *Degradable Aliphatic Polyesters*; Springer, 2002.
- (155) Jung, J. H.; Ree, M.; Kim, H. Acid- and Base-Catalyzed Hydrolyses of Aliphatic Polycarbonates and Polyesters. *Catal. Today* **2006**, *115* (1–4), 283–287.
- (156) Fischer, E. W.; Sterzel, H. J.; Wegner, G. Investigation of the Structure of Solution Grown Crystals of Lactide Copolymers by Means of Chemical Reactions. *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polym.* **1973**, *251* (11), 980–990.
- (157) Chu, C. C. Hydrolytic Degradation of Polyglycolic Acid: Tensile Strength and Crystallinity Study. *J. Appl. Polym. Sci.* **1981**, *26* (5), 1727–1734.
- (158) Pitt, C. G.; Chasalow, F. I.; Hibionada, Y. M.; Klimas, D. M.; Schindler, A. Aliphatic Polyesters. I. The Degradation of Poly(ϵ -Caprolactone) *in Vivo*. *J. Appl. Polym. Sci.* **1981**, *26* (11), 3779–3787.
- (159) Woodward, S. C.; Brewer, P. S.; Moatamed, F.; Schindler, A.; Pitt, C. G. The Intracellular Degradation of Poly(ϵ -Caprolactone). *J. Biomed. Mater. Res.* **1985**, *19* (4), 437–444.
- (160) Jeong, S. I.; Kim, B.-S.; Lee, Y. M.; Ihn, K. J.; Kim, S. H.; Kim, Y. H. Morphology of Elastic Poly(L-Lactide-Co- ϵ -Caprolactone) Copolymers and in Vitro and in Vivo Degradation Behavior of Their Scaffolds. *Biomacromolecules* **2004**, *5* (4), 1303–1309.
- (161) Sun, H.; Mei, L.; Song, C.; Cui, X.; Wang, P. The in Vivo Degradation, Absorption and Excretion of PCL-Based Implant. *Biomaterials* **2006**, *27* (9), 1735–1740.
- (162) Höglund, A. *Controllable Degradation Product Migration from Biomedical Polyester-Ethers*; Fiber- och polymerteknologi, Kungliga Tekniska högskolan, 2007.
- (163) Visscher, G. E.; Pearson, J. E.; Fong, J. W.; Argentieri, G. J.; Robison, R. L.;

- Maulding, H. V. Effect of Particle Size on Their Vitro Andin Vivo Degradation Rates of Poly(DL-Lactide-Co-Glycolide) Microcapsules. *J. Biomed. Mater. Res.* **1988**, 22 (8), 733–746.
- (164) Chu, C. C. The in-Vitro Degradation of Poly(Glycolic Acid) Sutures Effect of pH. *J. Biomed. Mater. Res.* **1981**, 15 (6), 795–804.
- (165) Day, M.; Shaw, K.; Cooney, D.; Watts, J.; Harrigan, B. Degradable Polymers: The Role of the Degradation Environment. *J. Environ. Polym. Degrad.* 5 (3), 137–151.
- (166) Hakkarainen, M.; Karlsson, S.; Albertsson, A.-C. Rapid (Bio)Degradation of Polylactide by Mixed Culture of Compost Microorganisms—low Molecular Weight Products and Matrix Changes. *Polymer (Guildf)*. **2000**, 41 (7), 2331–2338.
- (167) Bastioli, C.; Cerutti, A.; Guanella, I.; Romano, G. C.; Tosin, M. Physical State and Biodegradation Behavior of Starch-Polycaprolactone Systems. *J. Environ. Polym. Degrad.* **1995**, 3 (2), 81–95.
- (168) Doi, Y.; Kasuya, K.; Abe, H.; Koyama, N.; Shin-ichi, I.; Koichi, T.; Yoshida, Y. Evaluation of Biodegradabilities of Biosynthetic and Chemosynthetic Polyesters in River Water. *Polym. Degrad. Stab.* **1996**, 51 (3), 281–286.
- (169) Toncheva, V.; Bulcke, A.; Schacht, E.; Mergaert, J.; Swings, J. Synthesis and Environmental Degradation of Polyesters Based on Poly (ϵ -Caprolactone). *J. Environ. Polym. Degrad.* **1996**, 4 (2), 71–83.
- (170) Sun, H.; Mei, L.; Song, C.; Cui, X.; Wang, P. The in Vivo Degradation, Absorption and Excretion of PCL-Based Implant. *Biomaterials* **2006**, 27 (9), 1735–1740.
- (171) Höglund, A.; Hakkarainen, M.; Albertsson, A. Degradation Profile of Poly(ϵ -caprolactone)—the Influence of Macroscopic and Macromolecular Biomaterial Design. *J. Macromol. Sci. Part A* **2007**, 44 (9), 1041–1046.
- (172) Torres, A.; Li, S. M.; Roussos, S.; Vert, M. Screening of Microorganisms for Biodegradation of Poly(Lactic-Acid) and Lactic Acid-Containing Polymers. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62 (7), 2393–2397.
- (173) Yamaguchi, K.; Anderson, J. M. In Vivo Biocompatibility Studies of Medisorb® 65/35 D,L-Lactide/Glycolide Copolymer Microspheres. *J. Control. Release* **1993**, 24 (1–3), 81–93.
- (174) Visscher, G. E.; Robison, R. L.; Argentieri, G. J. Tissue Response to

- Biodegradable Injectable Microcapsules. *J. Biomater. Appl.* **1987**, 2 (1), 118–131.
- (175) Visscher, G. E.; Robison, R. L.; Maulding, H. V.; Fong, J. W.; Pearson, J. E.; Argentieri, G. J. Biodegradation of and Tissue Reaction to Poly(DL-Lactide) Microcapsules. *J. Biomed. Mater. Res.* **1986**, 20 (5), 667–676.
- (176) Visscher, G. E.; Robison, R. L.; Maulding, H. V.; Fong, J. W.; Pearson, J. E.; Argentieri, G. J. Biodegradation of and Tissue Reaction to 50:50 Poly(DL-Lactide-Co-Glycolide) Microcapsules. *J. Biomed. Mater. Res.* **1985**, 19 (3), 349–365.
- (177) Grizzi, I.; Garreau, H.; Li, S.; Vert, M. Hydrolytic Degradation of Devices Based on Poly(DL-Lactic Acid) Size-Dependence. *Biomaterials* **1995**, 16 (4), 305–311.
- (178) Tabata, Y.; Ikada, Y. Macrophage Activation through Phagocytosis of Muramyl Dipeptide Encapsulated in Gelatin Microspheres. *J. Pharm. Pharmacol.* **1987**, 39 (9), 698–704.
- (179) Tabata, Y.; Ikada, Y. Effect of Surface Wettability of Microspheres on Phagocytosis. *J. Colloid Interface Sci.* **1989**, 127 (1), 132–140.
- (180) Tabata, Y.; Ikada, Y. Phagocytosis of Polymer Microspheres by Macrophages. In *New Polymer Materials*; Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg, 1990; pp 107–141.
- (181) Tabata, Y.; Ikada, Y. Macrophage Phagocytosis of Biodegradable Microspheres Composed Of L-Lactic Acid/Glycolic Acid Homo- and Copolymers. *J. Biomed. Mater. Res.* **1988**, 22 (10), 837–858.
- (182) Fields, R. D.; Rodriguez, F.; Finn, R. K. Microbial Degradation of Polyesters: Polycaprolactone Degraded by *P. Pullulans*. *J. Appl. Polym. Sci.* **1974**, 18 (12), 3571–3579.
- (183) Oda, Y.; Asari, H.; Urakami, T.; Tonomura, K. Microbial Degradation of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Polycaprolactone by Filamentous Fungi. *J. Ferment. Bioeng.* **1995**, 80 (3), 265–269.
- (184) Murphy, C. A.; Cameron, J. A.; Huang, S. J.; Vinopal, R. T. *Fusarium* Polycaprolactone Depolymerase Is Cutinase. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62 (2), 456–460.
- (185) Benedict, C. V.; Cook, W. J.; Jarrett, P.; Cameron, J. A.; Huang, S. J.; Bell, J. P. Fungal Degradation of Polycaprolactones. *J. Appl. Polym. Sci.* **1983**, 28 (1), 327–334.
- (186) Benedict, C. V.; Cameron, J. A.; Huang, S. J. Polycaprolactone Degradation by

- Mixed and Pure Cultures of Bacteria and a Yeast. *J. Appl. Polym. Sci.* **1983**, 28 (1), 335–342.
- (187) Ohtaki, A.; Akakura, N.; Nakasaki, K. Effects of Temperature and Inoculum on the Degradability of Poly- ϵ -Caprolactone during Composting. *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, 62 (2), 279–284.
- (188) Nishida, H.; Tokiwa, Y. Distribution of Poly(α -Hydroxybutyrate) and Poly(ϵ -Caprolactone) Aerobic Degrading Microorganisms in Different Environments. *J. Environ. Polym. Degrad.* **1993**, 1 (3), 227–233.
- (189) Chen, D. R.; Bei, J. Z.; Wang, S. G. Polycaprolactone Microparticles and Their Biodegradation. *Polym. Degrad. Stab.* **2000**, 67 (3), 455–459.
- (190) Klaine, S. J.; Alvarez, P. J. J.; Batley, G. E.; Fernandes, T. F.; Handy, R. D.; Lyon, D. Y.; Mahendra, S.; McLaughlin, M. J.; Lead, J. R. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* **2008**, 27 (9), 1825.
- (191) Rio-Echevarria, I. M.; Rickerby, D. G. Nanomaterials as a Potential Environmental Pollutant: Overview of Existing Risk Assessment Methodologies. *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.* **2016**, 22 (2), 460–474.
- (192) Sahu, S. C.; Hayes, A. W. Toxicity of Nanomaterials Found in Human Environment. *Toxicol. Res. Appl.* **2017**, 1, 239784731772635.
- (193) NANoREG. *Accumulation Potential and Aquatic Toxicity of Relevant Groups of Nanomaterials and Product Formula*; USA, 2016.
- (194) Dekkers, S.; Oomen, A. G.; Bleeker, E. A. J.; Vandebriel, R. J.; Micheletti, C.; Cabellos, J.; Janer, G.; Fuentes, N.; Vázquez-Campos, S.; Borges, T.; et al. Towards a Nanospecific Approach for Risk Assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2016**, 80, 46–59.
- (195) Murphy, C. A.; Cameron, J. A.; Huang, S. J.; Vinopal, R. T. Fusarium Polycaprolactone Depolymerase Is Cutinase. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62 (2), 456–460.
- (196) Benedict, C. V.; Cook, W. J.; Jarrett, P.; Cameron, J. a; Huangt, S. J.; Belli, J. P. Fungal Degradation of Polycaprolactones. *J. Appl. Polym. Sci.* **1983**, 28, 327–334.
- (197) Epa, U. Inert Reassessment - Members of the Sorbitan Fatty Acid Esters and the Polysorbates, US EPA, OPP. **2005**.
- (198) Sarah B. Lovern; J. Rudi Strickler, and; Klaper*, R. Behavioral and

- Physiological Changes in *Daphnia Magna* When Exposed to Nanoparticle Suspensions (Titanium Dioxide, Nano-C60, and C60HxC70Hx). **2007**.
- (199) Lovern, S. B.; Owen, H. A.; Klaper, R. Electron Microscopy of Gold Nanoparticle Intake in the Gut of *Daphnia Magna*. *Nanotoxicology* **2008**, *2* (1), 43–48.
- (200) Asharani, P. V.; Lian Wu, Y.; Gong, Z.; Valiyaveetil, S. Toxicity of Silver Nanoparticles in Zebrafish Models. *Nanotechnology* **2008**, *19* (25), 255102.
- (201) Zhu, X.; Zhu, L.; Chen, Y.; Tian, S. Acute Toxicities of Six Manufactured Nanomaterial Suspensions to *Daphnia Magna*. *J. Nanoparticle Res.* **2009**, *11* (1), 67–75.
- (202) Felix, L. C.; Ortega, V. A.; Ede, J. D.; Goss, G. G. Physicochemical Characteristics of Polymer-Coated Metal-Oxide Nanoparticles and Their Toxicological Effects on Zebrafish (*Danio Rerio*) Development. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47* (12), 6589–6596.
- (203) Maziero, J. da S.; Rogero, S. O.; Alemany, A. Estudo Ecotoxicológico Da Nanopartícula de Prata Em *Daphnia Similis* Ecotoxicological Study of Silver Nanoparticle on *Daphnia Similis*. *J. Heal. Sci. Inst.* **2016**, *34*, 133–139.
- (204) Koelmans, A. A.; Besseling, E.; Shim, W. J.; Koelmans, A. A.; Besseling, E.; Besseling, E.; Shim, W. J. Nanoplastics in the Aquatic Environment. Critical Review. In *Marine Anthropogenic Litter*; Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; pp 325–340.
- (205) Costa, C. R.; Olivi, P.; Botta, C. M. R.; Espindola, E. L. G. A Toxicidade Em Ambientes Aquáticos: Discussão e Métodos de Avaliação. *Quim. Nova* **2008**, *31* (7), 1820–1830.
- (206) Castillo, G. C.; Vila, I. C.; Neild, E. Ecotoxicity Assessment of Metals and Wastewater Using Multitrophic Assays. *Environ. Toxicol.* **2000**, *15* (5), 370–375.
- (207) Cavalcante, A. K.; Mamede, F. C. S.; Maziero, J. S.; Rogero, S. O.; Rogero, J. R.; Lugão, A. B. A ECOTOXICOLOGIA COMO FERRAMENTA NA NANOTECNOLOGIA. 14º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos - SLABO, **2017** - Maresias - SP - Brasil
- (208) Besseling, E.; Wang, B.; Lüring, M.; Koelmans, A. A. Nanoplastic Affects Growth of *S. Obliquus* and Reproduction of *D. Magna*. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48* (20), 12336–12343.

- (209) Xin, Q.; Rotchell, J. M.; Cheng, J.; Yi, J.; Zhang, Q. Silver Nanoparticles Affect the Neural Development of Zebrafish Embryos. *J. Appl. Toxicol.* **2015**, *35* (12), 1481–1492.
- (210) Bhattacharya, P.; Lin, S.; Turner, J. P.; Ke, P. C. Physical Adsorption of Charged Plastic Nanoparticles Affects Algal Photosynthesis. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (39), 16556–16561.
- (211) Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J. P.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *Int. J. Pharm.* **1989**, *55* (1), R1–R4.
- (212) Paese, K.; Ortiz, M.; Frank, L. A.; Kulkamp-Guerreiro, I. C.; Rolim, C. M. B.; Barros, D. M.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. Production of Isotonic, Sterile, and Kinetically Stable Lipid-Core Nanocapsules for Injectable Administration. *AAPS PharmSciTech* **2017**, *18* (1), 212–223.
- (213) Cáceres, C. A.; Canevarolo, S. V. Cisão de Cadeia Na Degradação Termo-Mecânica Do Poliestireno Sob Múltiplas Extrusões. *Polímeros Ciência e Tecnol.* **2008**, *18* (4), 348–352.
- (214) Segal, L.; Creely, J. J.; Martin, A. E.; Conrad, C. M. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Text. Res. J.* **1959**, *29* (10), 786–794.
- (215) Instituto Adolfo Lutz. Óleos E Gorduras. In *Métodos físicos-químicos para análise de Alimentos*; Instituto Adolfo Lutz: São Paulo - SP, 2008; pp 589–625.
- (216) ABNT. ABNT NBR 12648 -2011- Aquatic Ecotoxicology — Chronic Toxicity — Method of Test with Green Algae (Chlorophyceae) ICS. 2011, p 28.
- (217) ABNT. ABNT NBR 12713-2016 - Aquatic Ecotoxicology - Acute Toxicity - Test with Daphnia Spp (Cladocera, Crustacea). 2016, p 27.
- (218) ABNT. ABNT NBR 15088 - 2016 - Aquatic Ecotoxicology — Acute Toxicity — Test with Fish (Cyprinidae). 2016, p 25.
- (219) Hamilton, M. A.; Russo, R. C.; Thurston, R. V. Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Environ. Sci. Technol.* **1977**, *11* (7), 714–719.
- (220) ASTM International. ASTM D5338-15, Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials Under Controlled Composting Conditions, Incorporating Thermophilic Temperatures. West Conshohocken, PA 2015.

- (221) ASTM International. ASTM D6003-96, Standard Test Method for Determining Weight Loss From Plastic Materials Exposed to Simulated Municipal Solid-Waste (MSW) Aerobic Compost Environment. West Conshohocken, PA 1996.
- (222) Ojeda, T. F.; Dalmolin, E.; Forte, M. M.; Jacques, R. J.; tima Bento, F. M.; vio Camargo, F. A. Abiotic and Biotic Degradation of Oxo-Biodegradable Polyethylenes. **2009**.
- (223) Fiel, L. A.; Contri, R. V.; Bica, J. F.; Figueiró, F.; Maria, A.; Battastini, O.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Labeling the Oily Core of Nanocapsules and Lipid-Core Nanocapsules with a Triglyceride Conjugated to a Fluorescent Dye as a Strategy to Particle Tracking in Biological Studies. **2014**, 1–11.
- (224) Rodrigues, S. F.; Fiel, L. A.; Shimada, A. L.; Pereira, N. R.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R.; Farsky, S. H. Lipid-Core Nanocapsules Act as a Drug Shuttle through the Blood Brain Barrier and Reduce Glioblastoma after Intravenous or Oral Administration. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2016**, 12 (5), 986–1000.
- (225) Antonow, M. B.; Asbahr, A. C. C.; Raddatz, P.; Beckenkamp, A.; Buffon, A.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Liquid Formulation Containing Doxorubicin-Loaded Lipid-Core Nanocapsules: Cytotoxicity in Human Breast Cancer Cell Line and in Vitro Uptake Mechanism. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, 76, 374–382.
- (226) Bianchin, M. D.; Kulkamp-Guerreiro, I. C.; de Oliveira, C. P.; Contri, R. V.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Radar Charts Based on Particle Sizing as an Approach to Establish the Fingerprints of Polymeric Nanoparticles in Aqueous Formulations. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2015**, 30 (30), 180–189.
- (227) Keck, C. M.; Müller, R. H. Size Analysis of Submicron Particles by Laser Diffraction—90% of the Published Measurements Are False. *Int. J. Pharm.* **2008**, 355 (1–2), 150–163.
- (228) Gaumet, M.; Vargas, A.; Gurny, R.; Delie, F. Nanoparticles for Drug Delivery: The Need for Precision in Reporting Particle Size Parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, 69 (1), 1–9.
- (229) Gram, C. The Differential Staining of Schizomycetes in Tissue Sections and in Dried Preparations. *Fortschritte der Med.* **1884**, 2, 185–189.
- (230) Pelczar, M. J.; Chan, E. C. S.; Krieg, N. R. *Microbiology: Concepts and Applications*; McGraw-Hill, 1993.
- (231) ANVISA, A. N. de V. S.-. *Detecção e Identificação Dos Fungos de Importância Médica - Módulo VII*; 2004; p 24.

- (232) Patel, N., T. IN VITRO CYTOTOXICITY ASSESSMENT OF IMIQUIMOD LOADED SOLID LIPID NANOPARTICLES BASED GEL FORMULATION USING BASAL CELL CARCINOMA CELL LINE: PART-II. *J. Biomed. Pharm. Res.* **2013**, 2 (3).
- (233) Tortora, G. J.; Case, C. L.; Funke, B. R. *Microbiologia*, 12 ed.; Artmed, Ed.; Porto Alegre, 2017.
- (234) Arcuri, E. F.; Aparecida, M.; Paiva, V.; Lange, C. C. Contagem , Isolamento e Caracterização de Bactérias Psicotróficas Contaminantes de Leite Cru Refrigerado. **2008**, 2250–2255.
- (235) International Dairy Federation. Bulletin of the International Dairy Federation 68 / 1976. *Bull. Int. Dairy Fed.* **1976**, 68.
- (236) Cousin, M. A. Presence and Activity of Psychrotrophic Microorganisms in Milk and Dairy Products: A Review. *J. Food Prot.* **1982**, 45 (2), 172–207.
- (237) Cromie, S. Psychrotrophs and Their Enzyme Residues in Cheese Milk. *Aust. J. Dairy Technol.* **1992**, 47 (2), 96–100.
- (238) Banwart, G. J. *Basic Food Microbiology*, Second Edi.; Springer Science & Business Media, 2012.
- (239) Pohlmann, A. R.; Soares, L. U.; Cruz, L.; da Silveira, N. P.; Guterres, S. S. Alkaline Hydrolysis as a Tool to Determine the Association Form of Indomethacin in Nanocapsules Prepared with Poly(ϵ -Caprolactone). *Curr. Drug Deliv.* **2004**, 1, 103–110.
- (240) FOOD INGREDIENTS BRASIL. Dossiê Emulsificantes. *Dossiê Emulsificantes*. 2013, p 51–68.
- (241) Hong, P.; Koza, S.; Bouvier, E. S. P. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and Their Aggregates. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2012**, 35 (20), 2923–2950.
- (242) Baiardo, M.; Frisoni, G.; Scandola, M.; Rimelen, M.; Lips, D.; Ruffieux, K.; Wintermantel, E. Thermal and Mechanical Properties of Plasticized Poly(L-Lactic Acid). *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, 90 (7), 1731–1738.
- (243) Chieng, B. W.; Ibrahim, N. A.; Wan Yunus, W. M. Z.; Zobir Hussein, M. Plasticized Poly(Lactic Acid) with Low Molecular Weight Poly(Ethylene Glycol): Mechanical, Thermal, and Morphology Properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, 130 (6), n/a-n/a.
- (244) Olsson, U. *Generalized Linear Models: An Applied Approach*; Studentlitteratur,

- Ed.; Lund, 2002.
- (245) Santos, L.; Guimarães, P.; Hirakata, V. N. Use of the Generalized Estimating Equation Model in Longitudinal Data Analysis. *Rev HCPA* **2012**, *32* (4), 503–511.
- (246) Torres, A.; Li, S. M.; Roussos, S.; Vert, M. Degradation of L- and DL-Lactic Acid Oligomers in the Presence of *Fusarium Moniliforme* and *Pseudomonas Putida*. *J. Environ. Polym. Degrad.* **1996**, *4* (4), 213–223.
- (247) Torres, A.; Li, S. M.; Roussos, S.; Vert, M. Poly(Lactic Acid) Degradation in Soil or under Controlled Conditions. *J. Appl. Polym. Sci.* **1996**, *62* (13), 2295–2302.
- (248) Hakkarainen, M. Aliphatic Polyesters: Abiotic and Biotic Degradation and Degradation Products. In *Degradable Aliphatic Polyesters*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2002; pp 113–138.
- (249) Arena, M.; Abbate, C.; Fukushima, K.; Gennari, M. Degradation of Poly (Lactic Acid) and Nanocomposites by *Bacillus Licheniformis*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2011**, *18* (6), 865–870.
- (250) Fukushima, K.; Feijoo, J. L.; Yang, M.-C. Comparison of Abiotic and Biotic Degradation of PDLLA , PCL and Partially Miscible PDLLA / PCL Blend. *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 706–717.
- (251) Tilstra, L.; Johnsonbaugh, D. A Test Method to Determine Rapidly If Polymers Are Biodegradable. *J. Environ. Polym. Degrad.* **1993**, *1* (4), 247–255.
- (252) Tilstra, L.; Johnsonbaugh, D. The Biodegradation of Blends of Polycaprolactone and Polyethylene Exposed to a Defined Consortium of Fungi. *J. Environ. Polym. Degrad.* **1993**, *1* (4), 257–267.
- (253) Pettigrew, C. A.; Rece, G. A.; Smith, M. C.; King, L. W. Aerobic Biodegradation of Synthetic and Natural Polymeric Materials: A Component of Integrated Solid-Waste Management. *J. Macromol. Sci. Part A* **1995**, *32* (4), 811–821.
- (254) Albertsson, A.-C.; Renstad, R.; Erlandsson, B.; Eldsäter, C.; Karlsson, S. Effect of Processing Additives on (Bio)Degradability of Film-Blown Poly(?-Caprolactone). *J. Appl. Polym. Sci.* **1998**, *70* (1), 61–74.
- (255) Jenkins, M. J.; Harrison, K. L. The Effect of Molecular Weight on the Crystallization Kinetics of Polycaprolactone. **2006**, No. July, 474–478.
- (256) Jenkins, M. J.; Harrison, K. L. The Effect of Crystalline Morphology on the Degradation of Polycaprolactone in a Solution of Phosphate Buffer and Lipase.

- Polym. Adv. Technol.* **2008**, *19* (12), 1901–1906.
- (257) Baiardo, M.; Frisoni, G.; Scandola, M.; Rimelen, M.; Lips, D.; Ruffieux, K.; Wintermantel, E. Thermal and Mechanical Properties of Plasticized Poly(L-Lactic Acid). *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, *90* (7), 1731–1738.
- (258) Bodmeier, R.; Chen, H. Evaluation of Biodegradable Poly(Lactide) Pellets Prepared by Direct Compression. *J. Pharm. Sci.* **1989**, *78* (10), 819–822.
- (259) Cai, Q.; Bei, J.; Wang, S. In Vitro Study on the Drug Release Behavior from Polylactide-Based Blend Matrices. *Polym. Adv. Technol.* **2002**, *13* (7), 534–540.
- (260) Pitt, C. G.; Hendren, R. W.; Schindler, A.; Woodward, S. C. The Enzymatic Surface Erosion of Aliphatic Polyesters. *J. Control. Release* **1984**, *1* (1), 3–14.
- (261) Lam, C. X. F.; Savalani, M. M.; Teoh, S.-H.; Hutmacher, D. W. Dynamics of *in Vitro* Polymer Degradation of Polycaprolactone-Based Scaffolds: Accelerated versus Simulated Physiological Conditions. *Biomed. Mater.* **2008**, *3* (3), 034108.
- (262) Bodmeier, R.; Chen, H. Evaluation of Biodegradable Poly(Lactide) Pellets Prepared by Direct Compression. *J. Pharm. Sci.* **1989**, *78* (10), 819–822.
- (263) Vezin, W. R.; Florence, A. T. In Vitro Heterogeneous Degradation of Poly(n-Alkyl-Cyanoacrylates). *J. Biomed. Mater. Res.* **1980**, *14* (2), 93–106.
- (264) Müller, R. H.; Lherm, C.; Herbert, J.; Couvreur, P. In Vitro Model for the Degradation of Alkylcyanoacrylate Nanoparticles. *Biomaterials* **1990**, *11* (8), 590–595.
- (265) Sullivan, C. O.; Birkinshaw, C. In Vitro Degradation of Insulin-Loaded Poly (n-Butylcyanoacrylate) Nanoparticles. *Biomaterials* **2004**, *25* (18), 4375–4382.
- (266) Müller, R. H.; Lherm, C.; Herbort, J.; Blunk, T.; Couvreur, P. Alkylcyanoacrylate Drug Carriers: I. Physicochemical Characterization of Nanoparticles with Different Alkyl Chain Length. *Int. J. Pharm.* **1992**, *84*, 1–11.
- (267) Lao, L. L.; Peppas, N. A.; Boey, F. Y. C.; Venkatraman, S. S. Modeling of Drug Release from Bulk-Degrading Polymers. *Int. J. Pharm.* **2011**, *418* (1), 28–41.
- (268) Jain, G. K.; Pathan, S. A.; Akhter, S.; Ahmad, N.; Jain, N.; Talegaonkar, S.; Khar, R. K.; Ahmad, F. J. Mechanistic Study of Hydrolytic Erosion and Drug Release Behaviour of PLGA Nanoparticles: Influence of Chitosan. *Polym. Degrad. Stab.* **2010**, *95* (12), 2360–2366.
- (269) Wu, L.; Zhang, J.; Watanabe, W. Physical and Chemical Stability of Drug Nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63* (6), 456–469.
- (270) Cam, D.; Hyon, S.; Ikada, Y. Degradation of High Molecular Weight Poly(l-

- Lactide) in Alkaline Medium. *Biomaterials* **1995**, *16* (11), 833–843.
- (271) Welch, P.; Muthukumar, M. Molecular Mechanisms of Polymer Crystallization from Solution. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *87* (21), 218302.
- (272) Fong, J. W.; Nazareno, J. P.; Pearson, J. E.; Maulding, H. V. EVALUATION OF BIODEGRADABLE MICROSPHERES PREPARED BY A SOLVENT EVAPORATION PROCESS USING SODIUM OLEATE AS EMULSIFIER Jones W. Fang”, Josephine P. Nazareno, Jane E. Pearson and Hawkins V. Maulding. *J. Control. Release* **1986**, *3*, 119–130.
- (273) Gamba, D. Síntese e Caracterização de Poliésteres Biodegradáveis e Biorreabsorvíveis Para a Utilização Como Matrizes Tridimensionais Em Engenharia de Tecidos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 2013.
- (274) Fukushima, K.; Feijoo, J. L.; Yang, M.-C. Comparison of Abiotic and Biotic Degradation of PDLLA, PCL and Partially Miscible PDLLA/PCL Blend. *Eur. Polym. J.* **2013**, *49* (3), 706–717.
- (275) Haug, R. T. *The Practical Handbook of Compost Engineering*; Lewis Publishers, 1993.
- (276) Baun, A.; Hartmann, N. B.; Grieger, K.; Kusk, K. O. Ecotoxicity of Engineered Nanoparticles to Aquatic Invertebrates: A Brief Review and Recommendations for Future Toxicity Testing. *Ecotoxicology* **2008**, *17* (5), 387–395.
- (277) Schindler, D. W. Detecting Ecosystem Responses to Anthropogenic Stress. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1987**, *44* (S1), s6–s25.
- (278) Piveli, R. P.; Kato, M. . *Qualidade Das Águas e Poluição: Aspectos Físico-Químicos*, 1st ed.; ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, Ed.; São Paulo - SP, 2006.
- (279) CONAMA. Resolução N° 357, de 17 de Março de 2005. 2005, pp 58–63.
- (280) Charão, M. F.; Baierle, M.; Gauer, B.; Goethel, G.; Fracasso, R.; Paese, K.; Brucker, N.; Moro, A. M.; Bubols, G. B.; Dias, B. B.; et al. Protective Effects of Melatonin-Loaded Lipid-Core Nanocapsules on Paraquat-Induced Cytotoxicity and Genotoxicity in a Pulmonary Cell Line. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2015**, *784–785*, 1–9.
- (281) Casado, M. P.; Macken, A.; Byrne, H. J. Ecotoxicological Assessment of Silica and Polystyrene Nanoparticles Assessed by a Multitrophic Test Battery. *Environ. Int.* **2013**, *51*, 97–105.

- (282) Montagna, L. S.; Forte, M. M. de C.; Santana, R. M. C. Study on the Accelerated Biodegradation of PP Modified with an Organic Pro-Degradant Additive. *J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, *131* (22), n/a-n/a.
- (283) Catto, A. L.; Montagna, L. S.; Almeida, S. H.; Silveira, R. M. B.; Santana, R. M. C. Wood Plastic Composites Weathering: Effects of Compatibilization on Biodegradation in Soil and Fungal Decay. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2016**, *109* (October 2017), 11–22.
- (284) Montagna, L. S. Desenvolvimento de Polipropileno Ambientalmente Degradável, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.
- (285) Epa, U. Inert Reassessment - Members of the Sorbitan Fatty Acid Esters and the Polysorbates, US EPA, OPP. **2005**.

Anexos

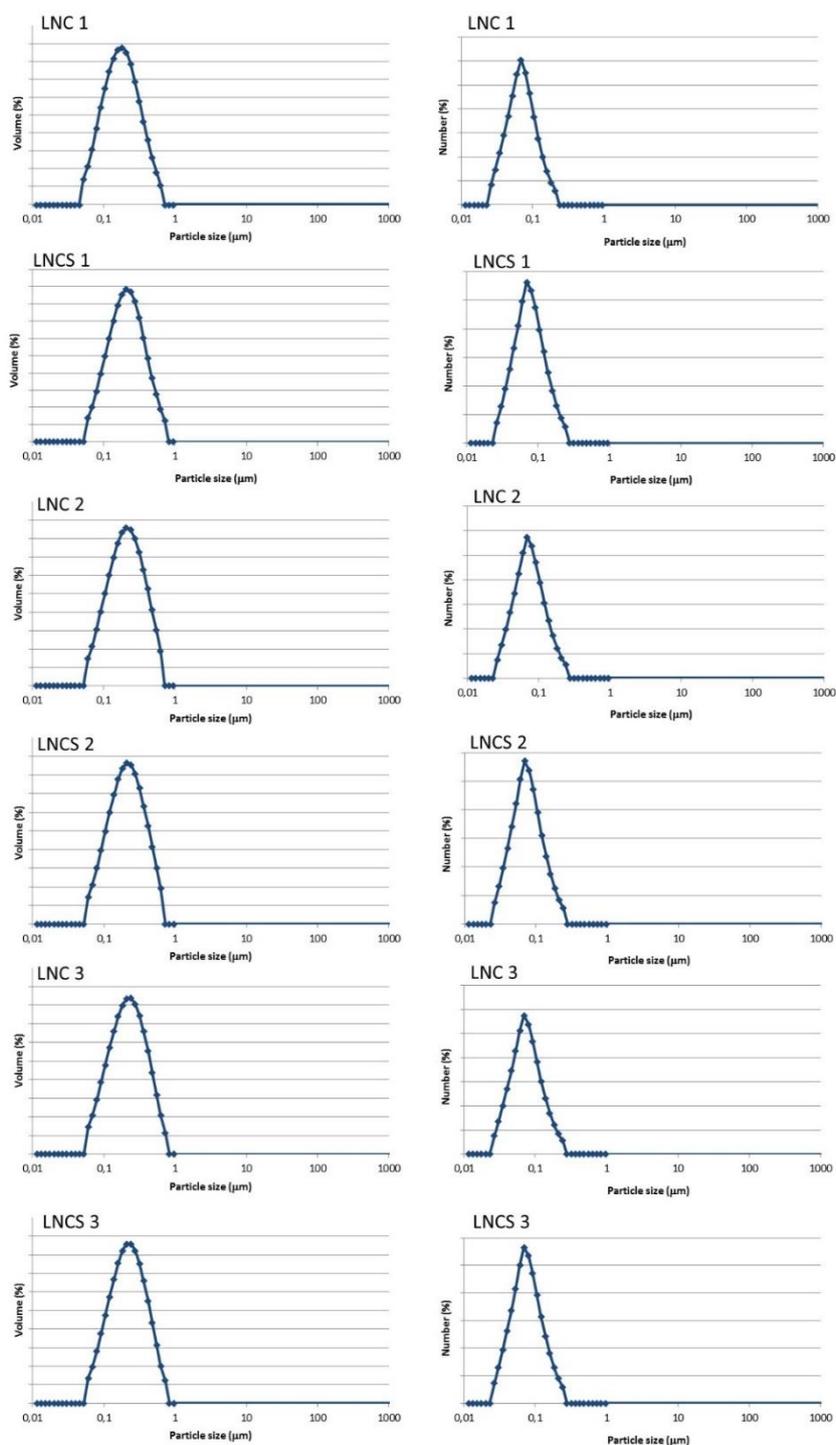


Figura 1A. Distribuição de tamanho de partícula, por volume (%) e número (%), das formulações preparadas com diferentes proporções de parede polimérica, antes (LNC) e após esterilização (LNCS). Técnica: difração de laser (meio dispersante: água). Cada distribuição corresponde à média de três lotes.

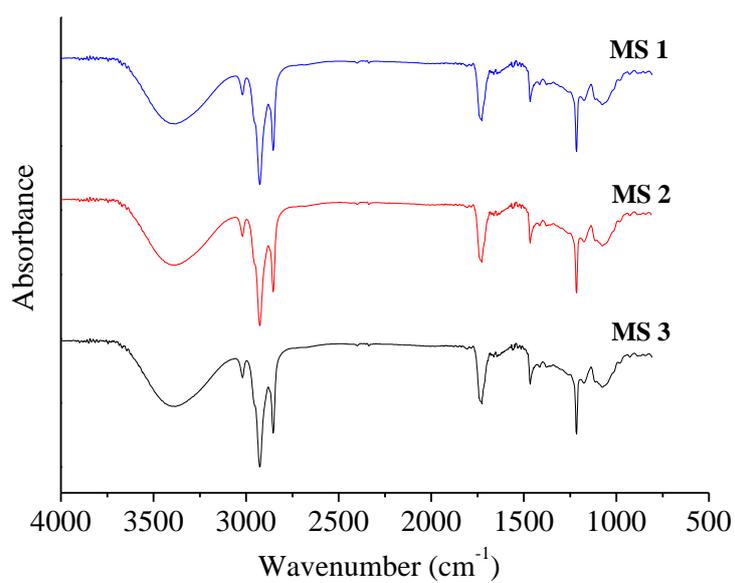
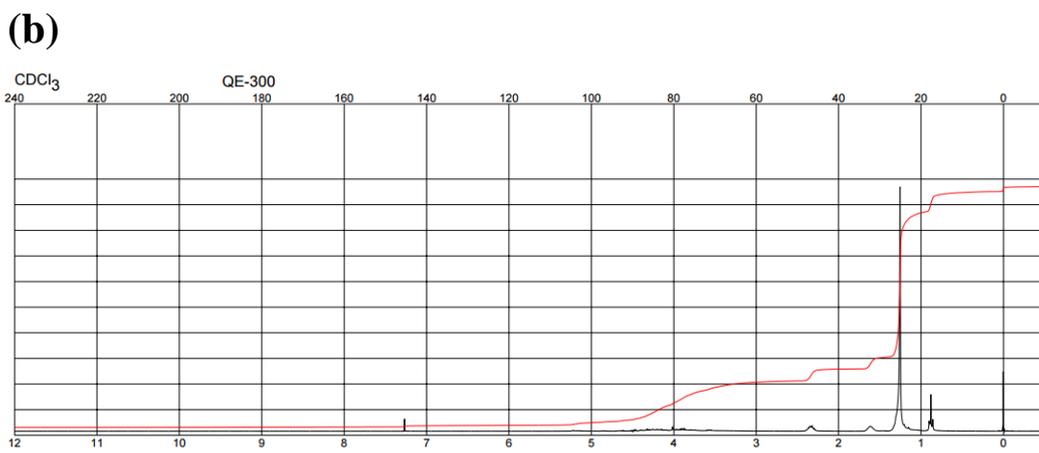
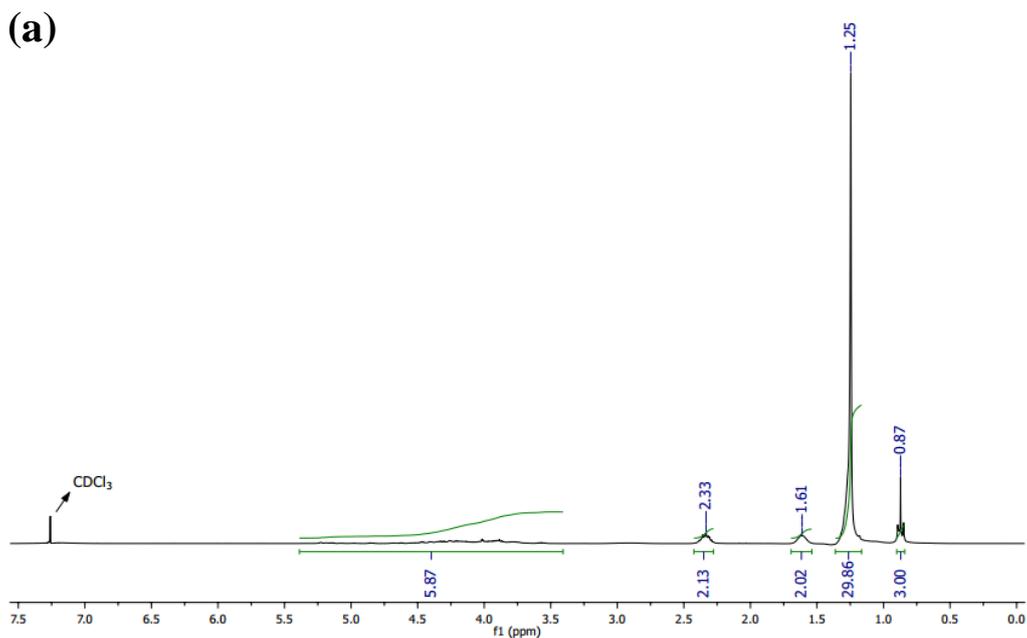


Figura 2A. Espectros na região do infravermelho para o monoestearato de sorbitano obtidos a partir de três lotes diferentes (MS 1, MS 2 and MS 3).



Espectro de ressonância magnética nuclear de ¹H para o monoestearato de sorbitano - reproduzido de www.sigmaaldrich.com

Figura 3A. Espectro de RMN de ¹H de (a) de monoestearato de sorbitano (MS 1) e (b) reproduzido das especificações do fabricante. Solvente: clorofórmio deuterado (CDCl₃). O hidrogênio residual do solvente foi empregado como referência. (400 MHz, 25 °C).

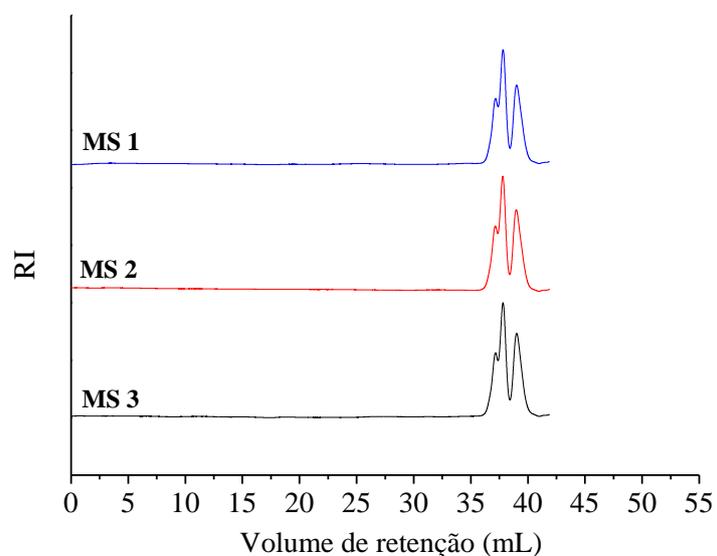


Figura 4A. Distribuição de massa molar obtidas por SEC para os três lotes de monoestearato de sorbitano (MS 1, MS 2 e MS 3).

Tabela 1A. Concentração dos constituintes presentes na formulação LNC utilizada nos ensaios de ecotoxicidade para algas *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Constituinte da LNC	Volume de formulação (μL)	Meio LC Oligo (mL)	Concentração (mg L^{-1})
PCL	2,5	50	0,5
	5	50	1
	10	50	2
	25	50	5
	50	50	10
MS	2,5	50	0,19
	5	50	0,38
	10	50	0,76
TCC	25	50	1,9
	50	50	3,8
	2,5	50	0,8

Constituinte da LNC	Volume de formulação (µL)	Meio LC Oligo (mL)	Concentração (mg L⁻¹)
	5	50	1,6
	10	50	3,2
	25	50	8
	50	50	16
	2,5	50	0,35
	5	50	0,7
P80	10	50	1,4
	25	50	3,5
	50	50	7

Tabela 2A. Concentração dos constituintes presentes na formulação LNC utilizada nos ensaios de ecotoxicidade para microcrustáceos *Daphnia similis*.

Constituinte da LNC	Volume de formulação (µL)	Água de diluição (mL)	Concentração (mg L⁻¹)
	100	200	5
PCL	200	200	10
	200	200	20
	400	200	40
	100	200	2
Span 60	200	200	4
	200	200	8
	400	200	15
	100	200	8
TCM	200	200	16
	200	200	32

Constituinte da LNC	Volume de formulação (µL)	Água de diluição (mL)	Concentração (mg L⁻¹)
	400	200	64
	100	200	4
P80	200	200	7
	200	200	14
	400	200	28

Tabela 3A. Concentração dos constituintes presentes na formulação LNC utilizada nos ensaios de ecotoxicidade para peixes *Pimephales promelas*.

Constituinte da LNC	Volume de formulação (µL)	Água de diluição (mL)	Concentração (mg L⁻¹)
	1.250	200	62,5
	2.500	200	125
PCL	5.000	200	250
	10.000	200	500
	20.000	200	1,000
	40.000	200	2,000
	1.250	200	23,75
	2.500	200	47,5
Span 60	5.000	200	95
	10.000	200	190
	20.000	200	380
	40.000	200	760
	1.250	200	100
TCM	2.500	200	200
	5.000	200	400

Constituinte da LNC	Volume de formulação (µL)	Água de diluição (mL)	Concentração (mg L ⁻¹)
P80	10.000	200	800
	20.000	200	1,600
	40.000	200	3,200
	1.250	200	43,75
	2.500	200	87,5
	5.000	200	175
	10.000	200	350
	20.000	200	700
	40.000	200	1,400

Tabela 4A. Volume de retenção (mL), massa molar numérica média (M_n), massa molar ponderal média (M_w) e dispersidade ($\mathcal{D} = M_w/M_n$), de cada um dos três lotes diferentes de monoestearato de sorbitano, obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).

Amostra/Lote	Volume de retenção (ml)	M_n	M_w	Dispersidade ($\mathcal{D} = M_w/M_n$)
MS 1	~ 37,14 - 38,70	775	971	1,25
MS 2	~ 37,14 - 38,70	777	985	1,26
MS 3	~ 37,14 - 38,70	790	984	1,24

Tabela 5A. Análise estatística dos dados de perda de massa e de dispersidade, para as formulações (precipitado) não estéreis (LNC) e estéreis (LNCS), avaliadas durante o armazenamento (60 dias) à 5 °C, por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). (n=3). Os picos (1), (2) e (3) são equivalentes ao TCC, à mistura MS + P80 e à PCL, respectivamente.

Tempo (dias)	Pico (SEC)	Perda de massa (ΔM_w %)						Dispersidade ($D = M_w/M_n$)					
		LNC 1	LNCS 1	LNC 2	LNCS 2	LNC 3	LNCS 3	LNC 1	LNCS 1	LNC 2	LNCS 2	LNC 3	LNCS 3
0	(1)	A0 ^a	A0 ^a	A0 ^a	A0 ^a	A0 ^a	A0 ^a	A1,20 ^a	A1,17 ^a	A1,18 ^a	A1,27 ^a	A1,08 ^a	A1,08 ^a
	(2)	A0 ^a	A0 ^a	A0 ^a	A0 ^a	A0 ^a	A0 ^a	A1,17 ^a	A1,17 ^a	A1,23 ^a	A1,26 ^a	A1,22 ^a	A1,22 ^a
	(3)	A0 ^a	A0 ^a	A0 ^a	A0 ^a	A0 ^a	A0 ^a	A1,47 ^a	A1,47 ^a	A2,29 ^b	A2,28 ^a	A2,25 ^a	A2,27 ^a
10	(1)	A0 ^a	A0 ^a	A1,2 ^a	A1,5 ^a	A1,4 ^a	A2,5 ^a	A1,17 ^a	A1,18 ^a	A1,19 ^a	A1,21 ^a	A1,07 ^a	A1,22 ^b
	(2)	A0 ^a	A0 ^a	A0,8 ^a	A0,9 ^a	A7,6 ^a	A8,5 ^a	A1,16 ^a	A1,20 ^a	A1,20 ^a	A1,20 ^a	A1,15 ^a	A1,18 ^a
	(3)	A0 ^a	A0 ^a	A13,6 ^b	B3,5 ^a	A16,0 ^b	B5,0 ^a	A1,54 ^a	A1,52 ^a	A2,21 ^b	A2,29 ^a	A2,18 ^a	A2,27 ^a
15	(1)	A7,4 ^a	A0,2 ^a	A3,9 ^a	A4,4 ^a	A14,1 ^b	B2,4 ^a	A1,27 ^a	B1,16 ^a	A1,20 ^a	A1,20 ^a	A1,12 ^a	A1,10 ^a
	(2)	A0 ^a	A0 ^a	A6,5 ^a	A8,1 ^a	A6,5 ^a	A7,1 ^a	A1,17 ^a	A1,23 ^a	A1,21 ^a	A1,15 ^a	A1,16 ^a	A1,16 ^a
	(3)	A3,8 ^a	A3,2 ^a	A13,8 ^b	B2,8 ^a	A17,2 ^b	B8,2 ^a	A1,58 ^a	A1,51 ^a	A2,37 ^b	A2,31 ^a	A2,15 ^a	A2,25 ^a
30	(1)	A40,7 ^b	B18,4 ^b	A46,7 ^b	B18,2 ^b	A18,6 ^b	B5,1 ^a	A1,13 ^a	A1,10 ^a	A1,41 ^b	B1,15 ^a	A1,23 ^b	A1,15 ^a
	(2)	A41,4 ^b	B1,3 ^a	A35,1 ^b	B14,9 ^b	A4,1 ^a	A5,2 ^a	A1,12 ^a	A1,15 ^a	A1,29 ^a	B1,40 ^b	A1,16 ^a	A1,11 ^b
	(3)	A29,3 ^b	B18,3 ^b	A28,5 ^c	B15,0 ^b	A24,3 ^b	B12,5 ^b	A1,78 ^b	B1,50 ^a	A2,46 ^b	B2,29 ^a	A2,07 ^b	B2,23 ^a
60	(1)	A54,2 ^c	B21,3 ^c	A50,0 ^b	B33,8 ^c	A20,4 ^b	B1,0 ^a	A1,33 ^b	A1,35 ^b	A1,61 ^b	B1,35 ^b	A1,23 ^b	A1,27 ^b
	(2)	A46,1 ^b	B13,7 ^b	A35,7 ^b	B25,5 ^c	A6,9 ^a	A7,9 ^a	A1,05 ^a	B1,20 ^a	A1,32 ^b	A1,35 ^b	A1,13 ^b	A1,13 ^b
	(3)	A43,0 ^c	B28,9 ^c	A31,7 ^c	B19,8 ^b	A28,4 ^b	B18,2 ^b	A1,55 ^a	A1,52 ^a	A2,47 ^b	A2,41 ^b	A2,01 ^b	B2,14 ^b

^{a,b,c,d} letras minúsculas correspondem à análise realizada por coluna (entre os diferentes tempos para cada formulação);

A,B letras maiúsculas correspondem à análise realizada por linhas (comparando a condição – estéril e não estéril nos diferentes tempos);

*letras iguais significa equivalência estatística para os dados (ANOVA via dois fatores, com pós-teste de Bonferroni e p<0,05).

Tabela 6A. Análise estatística dos dados de massa molar numérica média (M_n) e ponderal média (M_w) para as formulações (precipitado) não estéreis (LNC) e estéreis (LNCS), avaliadas durante o armazenamento (60 dias) à 5 °C, por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). (n=3). Os picos (1), (2) e (3) são equivalentes ao TCC, à mistura MS + P80 e à PCL, respectivamente.

Tempo (dias)	Pico (SEC)	M_n						M_w					
		LNC 1	LNCS1	LNC 2	LNCS 2	LNC 3	LNCS 3	LNC 1	LNCS 1	LNC 2	LNCS 2	LNC 3	LNCS 3
0	(1)	^A 1.024 ^a	^A 1.031 ^a	^A 1.047 ^a	^A 1.045 ^a	^A 652 ^a	^A 655 ^a	^A 1.228 ^a	^A 1.203 ^a	^A 1.231 ^a	^A 1.320 ^a	^A 706 ^a	^A 710 ^a
	(2)	^A 2.777 ^a	^A 2.799 ^a	^A 3.010 ^a	^A 3.065 ^a	^A 1.799 ^a	^A 1.798 ^a	^A 3.240 ^a	^A 3.280 ^a	^A 3.703 ^a	^A 3.870 ^a	^A 2.187 ^a	^A 2.193 ^a
	(3)	^A 32.987 ^a	^A 32.478 ^a	^A 75.300 ^a	^A 75.658 ^a	^A 71.000 ^a	^A 70.200 ^a	^A 48.475 ^a	^A 47.778 ^a	^A 173.681 ^a	^A 185.076 ^a	^A 159.790 ^a	^A 159.300 ^a
10	(1)	^A 1.019 ^a	^A 1.014 ^a	^A 1.024 ^a	^A 1.045 ^a	^A 649 ^a	^A 579 ^a	^A 1.195 ^a	^A 1.200 ^a	^A 1.216 ^a	^A 1.265 ^a	^A 695 ^a	^A 680 ^a
	(2)	^A 2.769 ^a	^A 2.798 ^a	^A 3.015 ^a	^A 3.042 ^a	^A 1.757 ^a	^A 1.750 ^a	^A 3.220 ^a	^A 3.300 ^a	^A 3.646 ^a	^A 3.670 ^a	^A 2.020 ^a	^A 2.075 ^a
	(3)	^A 31.377 ^a	^A 31.338 ^a	^A 69.600 ^a	^A 75.505 ^a	^A 60.900 ^b	^A 67.000 ^b	^A 48.400 ^a	^A 47.545 ^a	^A 161.379 ^b	^B 178.330 ^a	^A 132.875 ^b	^B 152.280 ^a
15	(1)	^A 896 ^b	^B 1.026 ^a	^A 990 ^b	^A 1.044 ^a	^A 542 ^b	^A 624 ^a	^A 1.138 ^a	^A 1.200 ^a	^A 1.185 ^a	^A 1.257 ^a	^A 605 ^b	^A 689 ^a
	(2)	^A 2.760 ^a	^A 2.795 ^a	^A 2.887 ^a	^A 3.033 ^a	^A 1.764 ^a	^A 1.748 ^a	^A 3.238 ^a	^A 3.500 ^a	^A 3.489 ^a	^A 3.411 ^a	^A 2.044 ^a	^A 2.031 ^a
	(3)	^A 29.453 ^a	^A 30.590 ^a	^A 67.030 ^b	^B 75.515 ^a	^A 60.213 ^b	^A 65.000 ^b	^A 46.615 ^a	^A 46.550 ^a	^A 161.000 ^b	^B 180.280 ^a	^A 129.600 ^b	^B 146.178 ^a
30	(1)	^A 647 ^{b.c}	^B 907 ^b	^A 463 ^c	^B 955 ^a	^A 467 ^b	^A 585 ^a	^A 729 ^b	^B 983 ^b	^A 655 ^b	^B 1.080 ^a	^A 575 ^b	^A 672 ^a
	(2)	^A 1.687 ^b	^B 2.082 ^b	^A 1.860 ^b	^B 2.400 ^b	^A 1.820 ^a	^A 1.940 ^a	^A 1.898 ^b	^B 3.240 ^a	^A 2.405 ^b	^B 3.290 ^a	^A 2.105 ^a	^A 2.145 ^a
	(3)	^A 19.278 ^b	^B 25.935 ^b	^A 54.300 ^c	^B 68.550 ^b	^A 57.952 ^b	^A 62.490 ^b	^A 34.068 ^b	^B 38.995 ^b	^A 133.608 ^c	^B 157.300 ^b	^A 119.870 ^c	^B 139.350 ^a
60	(1)	^A 427 ^c	^B 573 ^b	^A 386 ^c	^B 617 ^b	^A 467 ^b	^A 553 ^a	^A 562 ^c	^B 946 ^b	^A 615 ^b	^B 835 ^b	^A 573 ^b	^B 700 ^a
	(2)	^A 1.659 ^b	^B 2.010 ^b	^A 1.838 ^b	^A 2.020 ^b	^A 1.765 ^a	^A 1.839 ^a	^A 1.748 ^b	^B 2.830 ^b	^A 2.380 ^b	^A 2.729 ^b	^A 2.000 ^a	^A 2.085 ^a
	(3)	^A 18.140 ^b	^B 22.450 ^b	^A 52.415 ^c	^B 59.350 ^b	^A 56.850 ^b	^A 61.000 ^b	^A 27.615 ^c	^B 33.975 ^b	^A 127.500 ^c	^B 143.000 ^b	^A 114.500 ^c	^B 130.500 ^b

^{a,b,c,d} letras minúsculas correspondem à análise realizada por coluna (entre os diferentes tempos para cada formulação independente);

A,B letras maiúsculas correspondem à análise realizada por linhas (comparando a condição – estéril e não estéril nos diferentes tempos);

*letras iguais significa equivalência estatística para os dados (ANOVA via dois fatores, com pós-teste de Bonferroni e p<0,05).

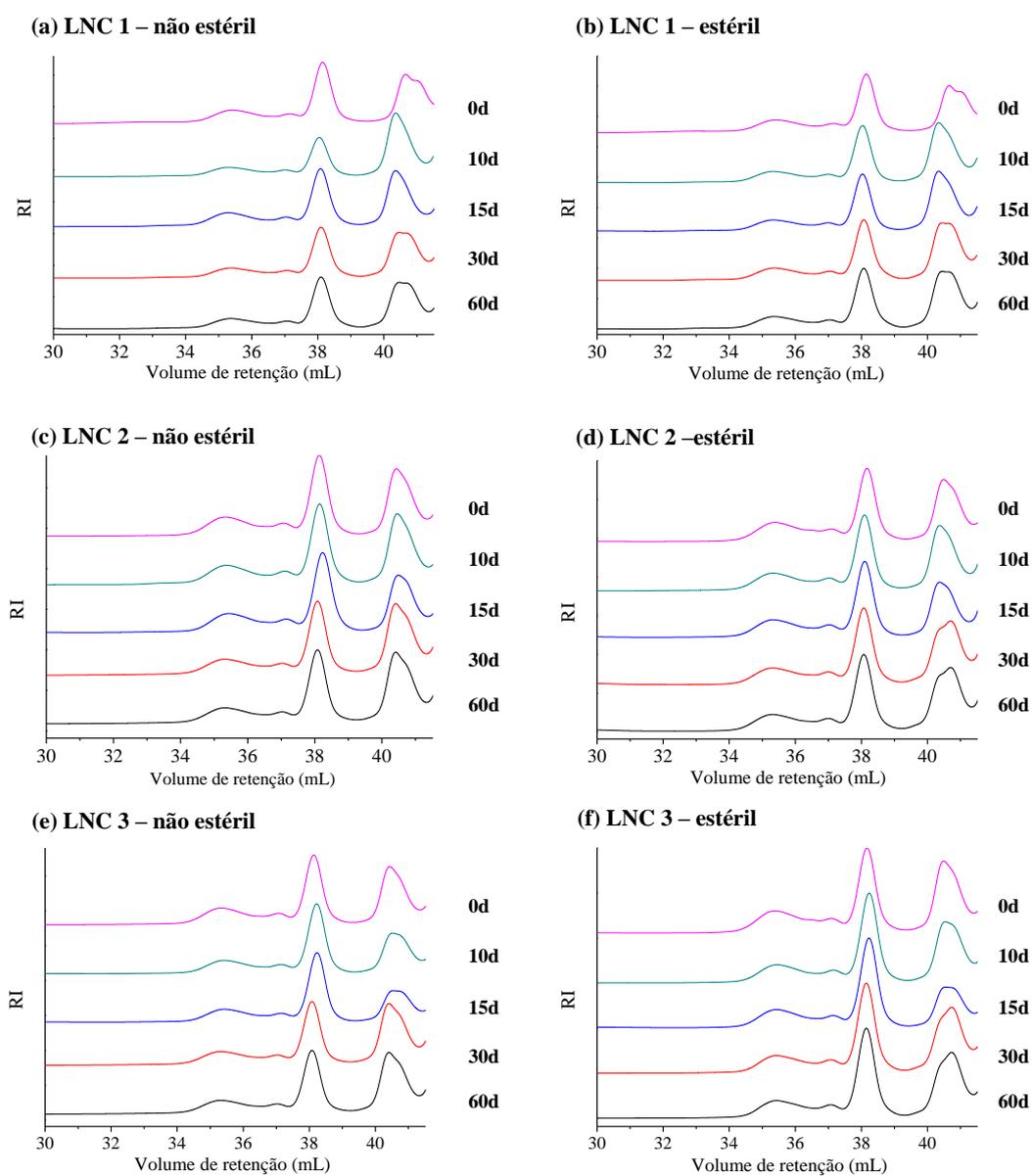


Figura 5A. Perfis de distribuição de massa molar para as formulações LNC 1 – não estéril (a) e estéril (b), LNC 2 – não estéril (c) e estéril (d) e LNC 3 – não estéril (e) e estéril (f), armazenadas sob 5 °C durante 60 dias. Resultados obtidos por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) para o sobrenadante coletado. Os picos foram integrados como sendo um único pico. $n=3$.

Tabela 7A. Análise estatística dos dados de perda de massa para o sobrenadante das formulações, LNC 1 e LNC 2, estéreis e não estéreis, avaliadas durante o armazenamento por 60 dias à 5 °C, a partir de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). (n=3). Análise de variância (ANOVA) via dois fatores, seguida pelo pós-teste de Bonferroni (p<0,05).

Tempo (dias)	Perda de massa (%)					
	LNC 1 não estéril	LNC 1 estéril	LNC 2 não estéril	LNC 2 estéril	LNC 3 não estéril	LNC 3 estéril
0	A0 ^a					
10	A3,0 ^a	B2,3 ^a	A7,0 ^b	A6,1 ^b	A9,6 ^b	A8,3 ^b
15	A0,2 ^a	A0,4 ^a	A5,9 ^b	B5,9 ^b	A10,2 ^b	A7,9 ^b
30	A12,7 ^b	B8,9 ^b	A3,5 ^a	A5,4 ^b	A15,1 ^c	A14,4 ^c
60	A58,1 ^c	A58,8 ^c	A60,0 ^c	A59,0 ^c	A37,1 ^d	B24,9 ^d

^{a,b,c,d} letras minúsculas correspondem à análise realizada por coluna (entre os diferentes tempos para cada formulação independente);

A,B letras maiúsculas correspondem à análise realizada por linhas (comparando a condição – estéril e não estéril nos diferentes tempos);

*letras iguais significa equivalência estatística para os dados (ANOVA via dois fatores, com pós-teste de Bonferroni e p<0,05).

Tabela 8A. Análise estatística dos dados de massa molar numérica média (M_n) e ponderal média (M_w), para o sobrenadante das formulações, LNC 1 e LNC 2, estéreis e não estéreis, avaliadas durante o armazenamento por 60 dias à 5 °C, a partir de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). (n=3). Análise de variância (ANOVA) via dois fatores, seguida pelo pós-teste de Bonferroni (p<0,05).

Tempo (dias)	M_n						M_w					
	LNC 1 não estéril	LNC 1 estéril	LNC 2 não estéril	LNC 2 estéril	LNC 3 não estéril	LNC 3 estéril	LNC 1 não estéril	LNC 1 estéril	LNC 2 não estéril	LNC 2 estéril	LNC 3 não estéril	LNC 3 estéril
0	^A 236 ^a	^A 244 ^a	^A 320 ^a	^A 320 ^a	^A 325 ^a	^A 295 ^a	^A 1027 ^a	^A 1020 ^a	^A 1126 ^a	^A 1199 ^a	^A 1087 ^a	^A 1030 ^a
10	^A 268 ^a	^A 235 ^a	^A 269 ^a	^A 287 ^a	^A 264 ^a	^A 283 ^a	^A 996 ^a	^A 997 ^a	^A 1047 ^a	^A 1,126 ^a	^A 983 ^a	^A 944 ^a
15	^A 310 ^a	^A 270 ^a	^A 370 ^a	^A 290 ^a	^A 262 ^a	^A 255 ^a	^A 1025 ^a	^A 1016 ^a	^A 1059 ^a	^A 1128 ^a	^A 976 ^a	^A 949 ^a
30	^A 264 ^a	^A 277 ^a	^A 270 ^a	^A 266 ^a	^A 252 ^a	^A 264 ^a	^A 897 ^b	^A 929 ^a	^A 1087 ^a	^A 1135 ^a	^A 923 ^a	^A 882 ^b
60	^A 126 ^b	^A 125 ^b	^A 135 ^b	^A 146 ^b	^A 173 ^b	^A 175 ^b	^A 430 ^c	^A 420 ^b	^A 450 ^b	^A 491 ^b	^A 684 ^b	^B 773 ^b

^{a,b,c,d} letras minúsculas correspondem à análise realizada por coluna (entre os diferentes tempos para cada formulação independente);

^{A,B} letras maiúsculas correspondem à análise realizada por linhas (comparando a condição – estéril e não estéril nos diferentes tempos);

*letras iguais significa equivalência estatística para os dados (ANOVA via dois fatores, com pós-teste de Bonferroni e p<0,05).

Tabela 9A. Distribuição de tamanho das nanocápsulas com diferentes proporções de parede polimérica, estéreis e não estéreis, antes e após 60 dias de armazenamento, determinada por difração de laser (n = 3). Diferenças significativas foram avaliadas entre os dias 0 e 60 para cada grupo de amostra independente (por coluna), pela análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey (p<0,05).

Formulação	Tempo (dias)	$d_{4.3}$ (μm)	$d_{0.9}$ (μm)	$d_{0.5}$ (μm)	$d_{0.1}$ (μm)	Span (adim.)
LNC 1 – não estéril	0	0,200 ± 0,02	0,363 ± 0,01	0,172 ± 0,01	0,08 ± 0,01	1,6 ± 0,1
	60	0,225 ± 0,05	0,413 ± 0,09	0,193 ± 0,03	0,09 ± 0,08	1,7 ± 0,2
LNC 1 - estéril	0	0,192 ± 0,03	0,350 ± 0,02	0,159 ± 0,01	0,07 ± 0,06	1,6 ± 0,1
	60	0,231 ± 0,01	0,420 ± 0,02	0,224 ± 0,08	0,10 ± 0,01	1,6 ± 0,1
LNC 2 – não estéril	0	0,185 ± 0,03	0,415 ± 0,03	0,181 ± 0,02	0,08 ± 0,05	1,6 ± 0,1
	60	0,193 ± 0,03	0,420 ± 0,02	0,192 ± 0,01	0,10 ± 0,06	1,7 ± 0,1
LNC 2- estéril	0	0,183 ± 0,02	0,415 ± 0,02	0,194 ± 0,09	0,08 ± 0,01	1,5 ± 0,1
	60	0,210 ± 0,04	0,420 ± 0,03	0,200 ± 0,01	0,10 ± 0,01	1,6 ± 0,1
LNC 3 – não estéril	0	0,180 ± 0,03	0,345 ± 0,03	0,153 ± 0,04	0,08 ± 0,05	1,6 ± 0,1
	60	0,199 ± 0,03	0,410 ± 0,02	0,210 ± 0,01	0,10 ± 0,06	1,7 ± 0,1
LNC 3- estéril	0	0,183 ± 0,02	0,415 ± 0,02	0,184 ± 0,09	0,08 ± 0,01	1,5 ± 0,1
	60	0,210 ± 0,04	0,420 ± 0,03	0,190 ± 0,01	0,19 ± 0,01	1,6 ± 0,1