



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

**ELABORAÇÃO DE MODELOS PREDITIVOS DE NANOPARTÍCULAS  
POLIMÉRICAS.**

**BRASÍLIA**

**2022**

**ALESSANDRA DE SOUZA RODRIGUES**

**ELABORAÇÃO DE MODELOS PREDITIVOS DE NANOPARTÍCULAS  
POLIMÉRICAS.**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Farmácia, da Universidade de Brasília  
como requisito parcial à obtenção do título de  
Farmacêutica.**

**Orientador: Marcílio Cunha Filho**

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi montar um modelo preditivo, Rede Neural, de nanopartículas poliméricas (NP) capaz de avaliar e decidir quais variáveis, tanto de formulação quanto de produção, interferem nas características físico-químicas finais da NP. Foi preparado trinta formulações diferentes, variando os componentes de produção e formulação da NP, com a concentração do fármaco escolhido permanecendo a mesma, pelo método de nanoprecipitação para compor os dados para o modelo e caracterizadas pela determinação de distribuição do diâmetro hidrodinâmico, potencial Zeta e eficiência de encapsulação. Com a Rede Neural foi possível de avaliar que a variável mais importante para o tamanho e o potencial Zeta da NP é o tensoativo líquido, Tween-80. Para o Índice de Polidispersão (IPd), a variável mais importante é o volume da fase orgânica. O tamanho mínimo observado das 30 formulações foi de 59,23 nm e máximo 1040,83 nm, para o IPd o mínimo foi 0,020 e máximo 0,730 e para o potencial Zeta a mínima foi -25,8 mV e máxima 32,530 mV. Foi obtido um valor aceitável para a eficiência de encapsulação para a maioria das formulações de mais de 90%, sendo que apenas a Met 2, 6, 7, 15, 16, 22 e 27 apresentaram um valor abaixo de 90%. Dessa forma, com a obtenção dos resultados destas 30 formulações e de mais variáveis possíveis para se compor uma nanopartícula, a partir do modelo preditivo será capaz de agrupar e decidir qual a melhor forma e componente para decidir o tamanho, potencial zeta ou IPd da NP.

Palavras-chave: Nanopartícula Polimérica, Nanoprecipitação, Modelo preditivo, Rede Neural, Características físico-químicas.

## **ABSTRACT**

The objective of the presented paper was to assemble a prediction model, Neural Network, of polymeric nanoparticles (PN) capable of assessing and deciding which variables, both of formulation and production, interfere in the final NP physico-chemical characteristics. Thirty different formulations were prepared, varying the production and formulation components of the NP, with the concentration of the chosen drug remaining the same, by the nano-precipitation method to compose the data for the model and characterized by the determination of distribution of the hydro-dynamic diameter, Zeta potential and encapsulation efficiency. With the neural network it was possible to observe that the most important variable for the size and the NP zeta potential is the liquid surfactant, Tween-80. For the polydispersion index (IPd), the most important variable is organic phase volume. The minimum size observed from the 30 formulations was of 59.23 nm and the maximum was 1040.83 nm. For the IPd the minimum was of 0.020 and the maximum was of 0.730 and for the zeta potential the minimum was of -25.8 mV and the maximum was of 32.530 mV. An acceptable value for the encapsulation efficiency was obtained for most of the formulations of over 90%, being that just Met 2, 6, 7, 15, 16, 22 and 27 presented values under 90%. Thus, with the results of these 30 formulations and more possible variables to compose a nanoparticle, the predictive model will be able to group and decide which is the best shape and component to decide the size, zeta potential or IPd of the NP.

**Keywords:** Polymeric Nanoparticle, Nanoprecipitation, Predictive Model, Neural Network, Physicochemical Characteristics.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2.1 OBJETIVO GERAL.....	7
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	8
3.1 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	8
3.2 NANOPRECIPITAÇÃO.....	9
3.3 MODELO DE DADOS PARA NANOPARTÍCULAS.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1 - MATERIAL.....	12
4.2 OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POR EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE.....	12
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA.....	13
4.3.1 Espectro de absorbância do fármaco.....	13
4.3.2 Tamanho e carga da nanopartícula.....	14
4.3.3 Eficiência de encapsulação do metoprolol.....	14
4.4 ESTABILIDADE DA NANOPARTÍCULA.....	15
4.5 ANÁLISE DOS DADOS.....	15
5. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	18
5.1 OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULA POR NANOPRECIPITAÇÃO.....	18
5.2 ANÁLISES DE TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS.....	19
5.3 ANÁLISE DO ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	21
5.4 ANÁLISE DO POTENCIAL ZETA DAS NANOPARTÍCULAS.....	23
5.5 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	25
5.6 ESTABILIDADE DA NANOPARTÍCULAS.....	26
6. CONCLUSÃO.....	29
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

## 1. INTRODUÇÃO

As indústrias farmacêuticas e de biotecnologia, com o passar dos anos, estão cada vez mais interessados em nanomateriais, especialmente em nanopartículas poliméricas (NP) por auxiliar o desenvolvimento de medicamentos mais seguros e eficazes. As NP são sistemas carregadoras de fármacos que auxiliam na melhora de suas propriedades farmacêuticas e farmacológicas e ainda direciona a entrega de maneira específica. A nanopartícula apresenta dois tipos de estruturas diferentes, as nanoesferas e nanocápsulas. Para se obter uma nanoesfera o princípio ativo se encontra dissolvido ou disperso na solução orgânica polimérica; no caso das nanocápsulas, o princípio ativo é previamente dissolvido num óleo e em seguida emulsificado na solução orgânica polimérica antes da dispersão da fase orgânica na aquosa (Martins, Dorival et al., 2010).

Um dos processos de formação de uma nanopartícula é a nanoprecipitação que necessita de duas fases miscíveis (solvente orgânico polar e água). A fase orgânica consiste na presença do fármaco, no caso para esse trabalho foi utilizado o Metoprolol Tartárico, e o polímero dissolvidos, em seguida, é dispersa na fase aquosa, contendo o tensoativo. Assim que ocorre a difusão, o polímero é precipitado e forma-se a NP (MORA-HUETAS et al., 2010). As características físico-químicas finais da NP dependem dos componentes da formulação, como a solubilidade do fármaco, polímero, tensoativo, taxa de volume da fase orgânica com aquosa, tipo de mistura e agitação entre as fases e temperatura da fase aquosa. Esses componentes foram avaliados como variáveis de formulação e de produção neste trabalho para avaliar o tamanho resultante, índice de distribuição, carga e taxa de eficiência de encapsulação da NP.

Para agrupar as variáveis presente foi necessário gerar um modelo preditivo capaz de definir e decidir qual é a melhor forma e componente para compor uma NP, prevendo o seu tamanho, índice de distribuição e carga superficial. Atualmente não há muitos estudos que avaliam as variáveis propostas neste trabalho a fim de categorizar e avaliar as características finais da NP e dessa forma, com o modelo preditivo elaborado e com os dados obtidos, as Indústrias poderão selecionar qual melhor nanopartícula para determinada finalidade de acordo com suas propriedades físico-química.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Este estudo tem como objetivo elaborar modelos preditivos das nanopartículas poliméricas produzidas e avaliar suas características.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Elaborar, através da técnica de nanoprecipitação, nanopartículas poliméricas encapsuladas com metoprolol tartarato, fármaco modelo;
- Caracterizar os parâmetros químicos e físico-químicos das formulações quanto ao diâmetro hidrodinâmico, potencial Zeta e eficiência de encapsulação;
- Analisar estabilidade das nanopartículas após 45 dias de fabricação;
- Analisar estatisticamente os dados obtidos.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

As nanopartículas poliméricas (NP) possuem um alto potencial terapêutico vantajoso para o desenvolvimento de medicamentos mais seguros e eficazes no cenário das indústrias farmacêuticas e de biotecnologia. Algumas das vantagens terapêuticas incluem: capacidade de melhorar as propriedades farmacêuticas e farmacológicas dos medicamentos sem alterar as suas moléculas; aumento da eficácia terapêutica pela entrega direcionada de medicamentos em um tecido ou célula de maneira específica; entrega do medicamento através de barreiras biológicas como epitelial e endotelial; entrega do fármaco a locais de ação intracelular (KAMALY, Nazila et al, 2012).

As NPs são sistemas carreadoras de fármacos que apresentam diâmetro entre 10 e 1000 nm compostas por diferentes materiais, tanto orgânicos quanto inorgânicos (Jeevanandam et. al., 2018). A “nanopartícula” é um termo amplo utilizado e engloba, entre vários outros, dois tipos de estruturas diferentes: nanocápsulas e nanoesferas. Enquanto as nanoesferas são caracterizadas por apresentarem uma matriz de estrutura sólida e homogênea onde um ou mais fármacos se encontram uniformemente disperso ou solubilizado no seu interior, as nanocápsulas apresentam um invólucro polimérico ao redor de um núcleo oleoso, sendo oco ou preenchido, onde o fármaco está dissolvido ou adsorvido à parede polimérica. (SUN, Haotian et al., 2020).

Para ter uma entrega da NP ao local desejado é importante observar a composição da sua camada externa na qual permite a ligação covalente, ou de outra forma, de uma ampla variedade de propriedades químicas, moleculares e biológicas (MCNEIL, Scott E, 2005). Alguns grupos moleculares presentes na composição das nanopartículas são capazes de modificar a sua carga, sendo catiônica ou aniônica, influenciando a biocompatibilidade e a capacidade de atravessar barreiras biológicas (MCNEIL, Scott E, 2005). A absorção celular das NPs tem relação com as suas propriedades físico-químicas e parâmetros, como composição, tamanho, forma, carga superficial, funcionalização, hidrofobicidade/hidrofilicidade da superfície (SANITÀ et. al., 2020). O tamanho de partícula e a distribuição de tamanho (IPd) das NPs determinam a viscosidade, área de superfície e a eficiência de encapsulação da partícula. (RAO, J. Prasad, 2011). Essas propriedades relatadas podem ser ajustadas de acordo com o método de preparo e da composição da fase orgânica ou

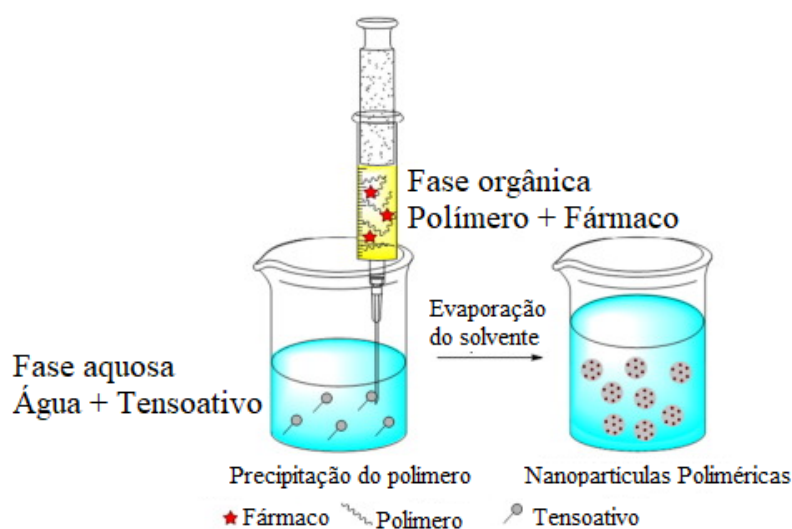


fase aquosa das NPs, como por exemplo o tipo de polímero utilizado e as características físico-químicas do fármaco desejado (CRUCHO, Carina IC, 2015).

Para obter uma nanopartícula polimérica alguns métodos são utilizados e podem ser divididos em duas categorias: procedimentos de duas etapas envolvendo a formação de uma emulsão seguido pela formação de NP e procedimento de uma etapa onde a emulsificação não é necessária para se formar a NP (CRUCHO, Carina IC, 2017). A emulsão-difusão, emulsão-coacervação, dupla emulsificação e nanoprecipitação fazem parte do procedimento de obtenção de NP por uma etapa. A nanoprecipitação é o foco deste trabalho.

### 3.2 NANOPRECIPITAÇÃO

A nanoprecipitação foi descrita pela primeira vez em meados 1989, por Fessi et al., e ficou conhecida como precipitação de antissolvente, dessolvatação, deslocamento de solvente (FESSI, H. P. F. D. et al., 1989). Nessa técnica, observada por Fessi et al., é preparada fase aquosa e fase orgânica acompanhada na adição de uma fase na outra, ou pelo método de gotejamento ou vertendo diretamente, sob agitação mecânica para no fim retirar o solvente orgânico por evaporação, por exemplo, formando a NP (**Fig. 1**).



**Figura 1:** Esquematização ilustrativa sobre o método de nanoprecipitação para preparação de nanoesferas. Para formar nanocápsulas o óleo deve ser introduzido na fase orgânica.

A fase orgânica é formada por óleo, para as nanocápsulas, polímero hidrofóbico e o fármaco, todos dissolvidos em um meio orgânico, já a fase aquosa é formada por água e o tensoativo selecionado (LIMA, Ana Luiza et al., 2021). Ao adicionar a fase orgânica na fase aquosa, o polímero da fase orgânica é precipitado, durante a difusão das fases, como resultado da sua baixa solubilidade na solução aquosa e, ao remover o solvente orgânico do processo, as partículas de moléculas hidrofóbicas são formadas, geralmente compostas pelo fármaco e pelo polímero (LIU, Yun et al., 2019).

O processo de formação de partícula no método de nanoprecipitação compreende em três estágios com relação entre si: nucleação, crescimento molecular e agregação, todas ocorrendo em um certo tempo (LINCE, Federica et. al., 2008). A taxa de cada etapa determina o tamanho da partícula e a sua distribuição, devido à supersaturação definida pela razão entre a concentração do polímero sobre a sua solubilidade na solução orgânica (J.P. Rao, K.E. Geckeler, 2011). A supersaturação é importante para definir a taxa de nucleação e é influenciada pela dinâmica de fluido das partículas e pelo processo de mistura das fases (Lince, Federica et. al., 2008). Para obter uma distribuição estreita de tamanho de partículas, o tempo de mistura deve ser menor que o tempo composto pelos três estágios relatados. Lince, Federica et. al. observou que, para ter uma taxa alta de nucleação produzindo população de partículas pequenas, a mistura de fases tem que ser realizada em boas condições. A nucleação acontece com o aumento do primeiro *nuclei* devido à associação das moléculas do soluto da supersaturação e só estabiliza quando alcança um tamanho ideal para a dissolução (RIVAS, Claudia Janeth Martínez et al., 2017). A finalização dessa etapa acontece quando a concentração do soluto é reduzida abaixo da taxa de concentração crítica da supersaturação e o *nuclei* cresce somente pela coagulação, crescimento molecular. O último estágio para definir as propriedades da partícula é a agregação que depende da frequência de colisões entre elas determinadas pelas interações de forças elétricas, força de atração ou repulsão. As forças de repulsão ou atração entre as partículas podem ser mensuradas pelo potencial Zeta, que é um potencial elétrico composto na superfície da partícula e contém informações sobre a estabilidade do sistema. Geralmente, um valor limite para determinar a estabilidade é de +- 30 mV e, caso o valor for maior, a partícula é estável (Lince, Federica et. al., 2008).

Alguns parâmetros são observados para controlar o processo de produção da NP tais como a escolha dos solventes, o volume considerado entre a fase orgânica e a fase aquosa, condições de agitação, concentração do polímero e, por fim, as características físico-químicas dos componentes (LIU, Yun et al., 2019). As vantagens do método de nanoprecipitação

compreendem na facilidade de reprodução, simplicidade, segurança (solventes tóxicos são evitados), formulações com boa estabilidade, rentabilidade e baixa energia de produção (Miladi et. al., 2016). No caso das desvantagens, são somente duas: não é reprodutivo para moléculas solúveis em água e dificuldade de controlar o crescimento das partículas.

### **3.3 MODELO DE DADOS PARA NANOPARTÍCULAS**

Os modelos de dados são importantes para agrupar resultados e permitir a geração de decisões a partir deles, exemplo clássico é o modelo preditivo (SEYMOUR, Geisser, 2016). Segundo Seymour, o modelo preditivo é definido como uma função matemática que permite identificar padrões ocultos quando aplicada a um conjunto de dados.

Atualmente, há poucos estudos estatísticos envolvendo a produção de nanopartículas poliméricas que relaciona a variação de tamanho, distribuição e carga superficial com as variáveis da formulação e as variáveis de produção da NP. Com isso, a fim de gerar uma previsão futura do tamanho, IPd e carga superficial da nanopartícula, foi criado um modelo preditivo para este trabalho que envolveu variáveis importantes para sua composição. A importância desse modelo é prever quais fatores são adequados e preferíveis para se compor uma nanopartícula desejada para um determinado fim.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 - MATERIAL

O fármaco utilizado, Metoprolol Tartarato com lote de FN0081700006, concedido para esse trabalho foi pela Gemini Indústria de Insumos Farmacêuticos LTDA (Anápolis, Goiás, Brasil). Os tensoativos, Polissorbato (tween80; lote: 58767) e o Álcool Polivinílico 40-88 (PVA 40-88; lote: K51426053) são, respectivamente, da Dinâmica Química Contemporânea LTDA (Indaiatuba, São Paulo, Brasil) e Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). Os polímeros, Eudragit L100 (lote: B160703010) e Eudragit E100 (lote: B130401503), são da empresa Evonik Operations GmbH (Darmstadt, Alemanha). O Álcool Metílico (lote: 117894) é da Dinâmica Química Contemporânea LTDA (Indaiatuba, São Paulo, Brasil). A Água utilizada nas formulações e análises foi água Milli-Q (Millipore, Illkirch-Graffenstaden, França).

### 4.2 OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POR EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE

A técnica utilizada para obtenção de nanopartículas foi a nanoprecipitação. Foi realizado trinta modos distintos de preparo das nanopartículas, variando tanto a formulação quanto o método de produção. O fármaco foi uma variável constante e foi pesado 20 mg dele para compor a fase orgânica da NP. A fase orgânica era composta, também, pelos polímeros, Eudragit L100 e Eudragit E100, que não estavam presentes de forma simultânea na formulação e variavam dentro do peso mínimo e máximo (25% a 100%). O volume para compor a quantidade suficiente para fase orgânica variou dentro do mínimo e máximo (25% a 75%) de metanol assim como o volume de água utilizado para suprir a fase aquosa.

A fase aquosa era composta pelos tensoativos Tween-80 e PVA 40-88, que poderiam estar presentes de forma simultânea ou isolada com variação nos valores mínimo e máximo (10% a 100%). A fase orgânica foi adicionada na fase aquosa ou gotejando com a bureta ou vertendo livremente um no outro, deixando dissolver por cinco minutos até completa homogeneização. A agitação da fase aquosa no método de produção da NP também obteve variáveis, agitação ultrassônica ou agitação magnética e, quanto a temperatura foi deixada a temperatura ambiente, 25°C, ou aquecida a 50°C. Após finalização, a dispersão foi colocada no rotaevaporador (R-100, Buchi, Suíça) para que o volume do solvente orgânico presente na formulação evaporasse. Ao final do processo, as NPs foram armazenadas em geladeira 4°C até serem utilizadas. As **figuras 2 e 3** representam o esquema das variáveis e a lista de formulações, respectivamente.

Variação dos componentes das formulações											
Variáveis de Formulação											
Volume fase aquosa (mL)	Volume fase orgânica (mL)		Tween-80 (mL)		PVA 40-88 (mg)		Eudragit L100 (mg)		Eudragit E100 (mg)		
Mínimo	5	Mínimo	5	Mínimo	0	Mínimo	0	Mínimo	0	Mínimo	0
Mediana	10	Mediana	8	Mediana	25	Mediana	25	Mediana	10	Mediana	10
Média	10	Média	10	Média	24,5	Média	25,5	Média	24,67	Média	24,67
Máximo	15	Máximo	15	Máximo	50	Máximo	50	Máximo	80	Máximo	80
Variáveis de Produção											
Gotejamento da fase orgânica na fase aquosa				Agitação da fase aquosa				Temperatura da fase aquosa			
Bureta				Ultrassônica				25°C			
Verter				Magnética				50°C			

**Figura 2:** Esquema das variáveis de formulação e de produção para as trinta formulações, com quantidades mínimas e máximas, mediana e média

Formulações	Variáveis de Formulação						Variáveis de Produção		
	Vol. fase aquosa	Vol. fase orgânica	Tween-80	PVA 40-88	Eudragit L100	Eudragit E100	Gotejamento da fase orgânica na fase aquosa	Agitação fase aquosa	Temperatura fase aquosa
MET 1	75%	25%	100%	-	100%	-	Bureta	Ultrassônica	25°C
MET 2	75%	25%	70%	30%	25%	-	Verter	Ultrassônica	50°C
MET 3	75%	25%	50%	50%	50%	-	Bureta	Magnética	25°C
MET 4	75%	25%	30%	70%	-	100%	Verter	Magnética	50°C
MET 5	75%	25%	-	100%	-	50%	Bureta	Ultrassônica	50°C
MET 6	25%	75%	100%	-	100%	-	Verter	Ultrassônica	50°C
MET 7	25%	75%	70%	30%	50%	-	Bureta	Magnética	25°C
MET 8	25%	75%	50%	50%	-	100%	Verter	Magnética	50°C
MET 9	25%	75%	30%	70%	-	50%	Bureta	Ultrassônica	50°C
MET 10	25%	75%	-	100%	-	25%	Verter	Ultrassônica	25°C
MET 11	60%	40%	100%	-	43,75%	-	Bureta	Magnética	25°C
MET 12	60%	40%	70%	30%	25%	-	Verter	Magnética	25°C
MET 13	60%	40%	50%	50%	93,75%	-	Bureta	Ultrassônica	50°C
MET 14	60%	40%	30%	70%	-	93,75%	Verter	Ultrassônica	25°C
MET 15	60%	40%	-	100%	-	25%	Bureta	Magnética	25°C
MET 16	40%	60%	100%	-	43,75%	-	Verter	Magnética	50°C
MET 17	40%	60%	70%	30%	25%	-	Bureta	Ultrassônica	25°C
MET 18	40%	60%	50%	50%	-	43,75%	Verter	Ultrassônica	50°C
MET 19	40%	60%	30%	70%	-	25%	Bureta	Magnética	50°C
MET 20	40%	60%	-	100%	-	93,75%	Verter	Ultrassônica	50°C
MET 21	50%	50%	100%	-	25%	-	Bureta	Ultrassônica	25°C
MET 22	50%	50%	70%	30%	93,75%	-	Verter	Magnética	25°C
MET 23	50%	50%	50%	50%	100%	-	Bureta	Magnética	25°C
MET 24	50%	50%	30%	70%	-	100%	Verter	Ultrassônica	50°C
MET 25	50%	50%	-	100%	-	50%	Bureta	Ultrassônica	50°C
MET 26	50%	50%	60%	40%	100%	-	Verter	Magnética	25°C
MET 27	50%	50%	10%	90%	50%	-	Bureta	Magnética	50°C
MET 28	50%	50%	40%	60%	-	93,75%	Bureta	Ultrassônica	25°C
MET 29	50%	50%	90%	10%	-	50%	Verter	Ultrassônica	50°C
MET 30	50%	50%	20%	80%	-	25%	Bureta	Ultrassônica	25°C

**Figura 3:** Representação das formulações quanto a quantidade dos componentes, em porcentagem, e as variações de produção.

## 4.3 CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA

### 4.3.1 Espectro de absorvância do fármaco

Para caracterizar a absorvância do Metoprolol foi utilizado o espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 UV com o comprimento de onda de 224 nm. Foi preparada uma solução mãe com 12,50 mg do fármaco em um balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com metanol. Em seguida, foi realizada três séries, com identificação de A, B e C, de diluições com as seguintes concentrações: 1M; 2,5M; 5M; 7,5M; 10,0M; 12,5M; 15,0M; 20,0M para

serem lidas no espectrofotômetro. As análises do espectrofotômetro foram realizadas em uma cubeta de quartzo de 10 mm de comprimento e a partir dos resultados obtidos foi capaz de elaborar a linearidade do Metoprolol, representada a seguir:

$$Y = 0,0309x - 0,0597$$

onde Y é a absorvância obtida e o X é a concentração em  $\mu\text{g/mL}$  do fármaco. Com a linearidade é possível calcular a eficiência de encapsulação.

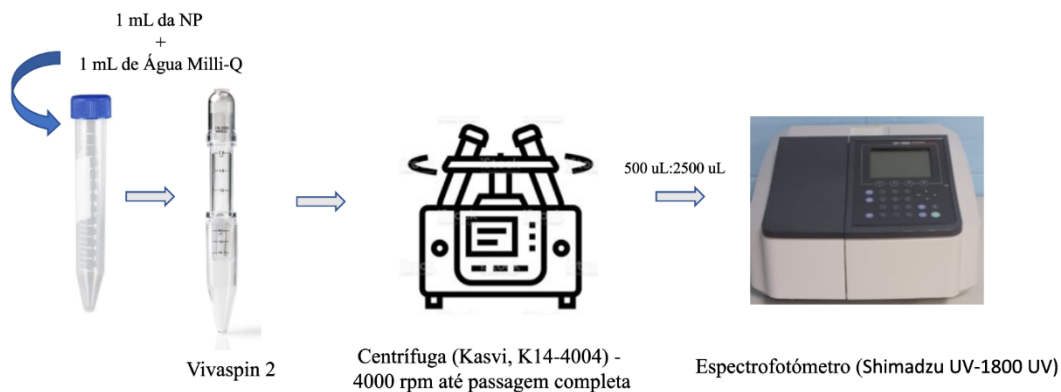
#### **4.3.2 Tamanho e carga da nanopartícula**

O diâmetro médio dado por Z-avarage, a distribuição de tamanho dado pelo Índice de Polidispersibilidade (IPd) e a mobilidade eletroforética (potencial Zeta) das NP foi medida por um aparelho de determinação de tamanho hidrodinâmico por espalhamento dinâmico de luz, Zetasizer Nano Series - Nano ZS90 (Malvern, EUA). Para isso, 10  $\mu\text{L}$  da solução de nanopartícula foram diluídos em 990  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q (para análise do tamanho) ou 990 $\mu\text{L}$  de NaOH 1M (para o potencial zeta) e analisadas a uma temperatura de 25°C pelo software fornecido pela Malvern.

#### **4.3.3 Eficiência de encapsulação do metoprolol**

Para realizar a eficiência de encapsulação (EE) do Metoprolol associada a NP foi necessário utilizar a centrifuga (Kasvi, K14-4004) e o espectrofotômetro ultravioleta no comprimento de onda de 224 nm. Inicialmente, transferiu 1 mL da NP analisada e 1 mL de água Milli-Q para um dispositivo com tamanho de poro definido em 10kDa (Vivaspin 2, 100000, MWCO HY, Sartorio, Goettingen, Alemanha) e colocou na centrífuga em 4000 rpm até completa passagem pelo poro e foi lida no espectrofotômetro. Para as formulações que não tiveram passagem completa no dispositivo, pegou 500  $\mu\text{L}$  do filtrado e diluiu com 2500  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q para realizar a leitura no equipamento UV. As correções das diluições foram realizadas e inseridas na fórmula da equação 1.

**Figura 4:** esquema para realizar a eficiência de encapsulação.



A concentração do metoprolol encapsulado foi determinada pela diferença entre a concentração inicial de fármaco adicionado (FT) e a concentração de fármaco não encapsulada obtida, o filtrado (FL). A eficiência de encapsulação foi calculada de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{Equação 1: } EE\% = \frac{FT - FL}{FT} \times 100$$

onde: EE% é a eficiência de encapsulação do Metoprolol nas nanopartículas; FL é a concentração do metoprolol que não foi encapsulado nas nanopartículas; e FT é a concentração do Metoprolol que foi inicialmente colocada para o preparo das nanopartículas. Importante ressaltar que para formulações diluídas, o fator de diluição, sendo 5, foi inserido no numerador da fórmula.

#### 4.4 ESTABILIDADE DA NANOPARTÍCULA

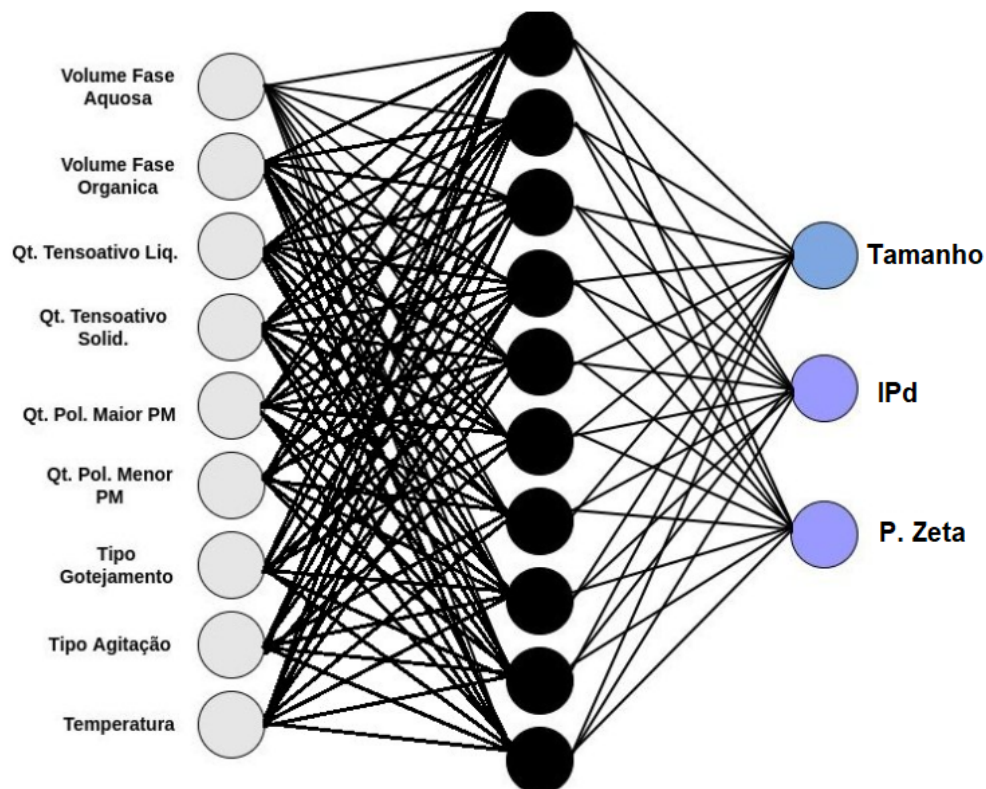
Algumas formulações de nanopartículas foram escolhidas para realizar novamente a leitura no equipamento Zetasizer Nano Series - Nano ZS90 após quarenta e cinco dias da produção inicial, avaliando tamanho, IPd e potencial Zeta.

#### 4.5 ANÁLISE DOS DADOS

Para uma análise de dados com as variáveis utilizadas neste trabalho, foi desenvolvido um modelo simples de Rede Neural do tipo “Feedforward” com algoritmo de “Backpropagation”. Esse modelo é do tipo supervisionado que utiliza um conjunto de dados de treinamentos, variáveis de entrada, relacionando com as variáveis de saída de maneira simultânea. Todos os parâmetros da Rede foram mantidos com os valores padrões para esse

tipo de rede. Para camada oculta que calcula as relações das correlações entre as variáveis de entrada e saída foram utilizados 10 neurônios como padrão.

As variáveis de entrada foram: volume da fase aquosa, volume da fase orgânica, quantidade do tensoativo líquido (Tween 80), quantidade do tensoativo sólido (PVA 40-88), quantidades de polímero de maior e menor peso molar (Eudragit L100 e Eudragit E100 respectivamente), tipo de gotejamento da fase orgânica na aquosa, tipo de agitação e a temperatura da fase aquosa. As variáveis de saída foram: o tamanho da NP, índice de polidispersão (IPd) e o valor do potencial Zeta. O esquema da Rede Neural gerada encontra-se abaixo:



**Figura 5:** Esquema da Rede Neural desenvolvida para as variáveis de entrada relacionando com as de saída.

As medições para o tamanho, IPd e potencial Zeta foram feitas em triplicata, sendo consideradas as médias desses valores para o modelo simples de Rede Neural gerado.

Com a Rede Neural foi capaz de gerar uma escala de importância para as variáveis de cada análise (tamanho, IPd e Potencial Zeta), sendo coeficientes ajustados da equação de



ativação dos neurônios da Rede após análises da função do erro utilizado para melhorar a previsão dos valores. Não apresenta unidade de medida.

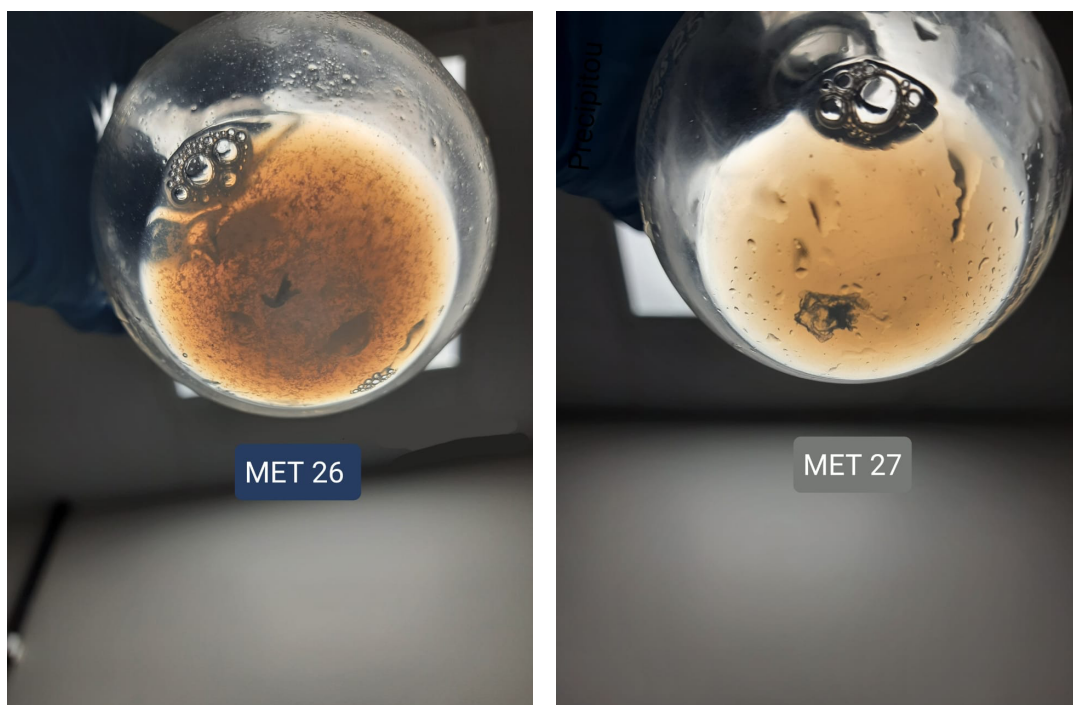
## 5. RESULTADO E DISCUSSÃO

O objetivo do trabalho foi avaliar as variáveis importantes para se determinar o tamanho, condutividade elétrica e o índice de polidispersibilidade da nanopartícula produzida, nanoesfera. Para isso, foram realizadas trinta formulações distintas de nanopartículas pelo método de nanoprecipitação.

### 5.1 OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULA POR NANOPRECIPITAÇÃO

A técnica por nanoprecipitação consiste em evaporar o solvente orgânico do sistema coloidal final da nanopartícula para que o fármaco e o polímero interajam com a fase aquosa. Dessa forma, este processo ocorre a precipitação molecular relacionado com três fatores: nucleação, crescimento molecular e agregação da NP, importantes para definir o tamanho médio da partícula. De acordo com Saad, S.W et. al., 2016 quando ocorre uma supersaturação do sistema, há precipitação da NP, formando os primeiros núcleos e, conseqüentemente, diminuindo a concentração do soluto no sistema. Com essa queda da concentração, não há formação de núcleos adicionais e sim uma agregação e associação das partículas já existentes até ocorrer uma concentração de saturação de equilíbrio.

Em algumas formulações realizadas foi possível observar a formação de precipitados assim que a fase orgânica foi retirada sob alta pressão, podendo ser explicado a presença de agregação das nanopartículas no meio (SCHAFFAZICK, Scheila Rezende et al., 2003):

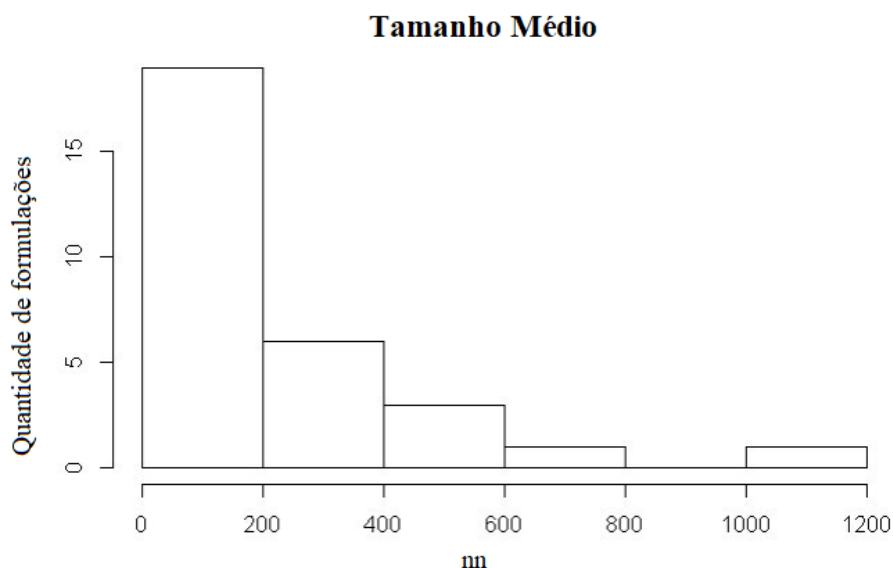


**Figuras 6 e 7:** presença de precipitados no sistema coloidal nas formulações 26 e 27.

## 5.2 ANÁLISES DE TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS

A partir dos dados coletados da Rede Neural utilizada, pôde observar o tamanho médio das NP de 238 nanômetros, sendo o menor tamanho medindo 59,23 nanômetros e, o maior, 1040,83 nanômetros, apresentando uma ampla amplitude de 981,6 nanômetros entre esses valores o que explica uma quantidade variada de tamanhos das nanopartículas formuladas. A mediana encontra-se por volta de 160 nanômetros, ou seja, bem abaixo da média das NP coletadas, indicando presença abundante de tamanhos abaixo de 200 nanômetros, conforme histograma abaixo:

**Figura 8:** histograma do tamanho médio das nanopartículas coletadas.



Tamanho médio (nanômetros)	
Mínimo	59,23
1º Quartil	149,46
Mediana	160,88
Média	238,86
3º Quartil	243,59
Máximo	1040,83

**Tabela 1:** Resultados dos valores mínimos, 1º quartil, mediana, média, 3º quartil e máximo do tamanho médio das nanopartículas

Algumas explicações podem ser feitas a partir desse histograma, Souto et. al., 2012, observou que a concentração e a massa molar do polímero utilizados para compor a fase orgânica tem forte influência no tamanho da nanoesfera, já que com a massa molar elevada ocorre, rapidamente, a precipitação durante a inversão das fases e a concentração do polímero aumenta, conseqüentemente elevando a viscosidade da fase orgânica que atrapalha sua difusão. Com isso, uma concentração polimérica baixa causa um aumento da velocidade de difusão do solvente que induz uma redução do tamanho médio das gotículas de dispersão resultante e, em consequência, à obtenção de nanoesferas de menores dimensões.

Outro fator que influencia o tamanho da NP é o tensoativo utilizado e, neste trabalho, foram usados o Tween-80 e o PVA 40-88. De acordo com Giannavola, Claudia et al., 2003, o tensoativo não-iônico (Tween-80) reduz a tensão superficial e a taxa de difusão da fase orgânica, além de fornecer estabilidade para NP. Já para o uso do PVA, estudos demonstraram que o tensoativo tem alta afinidade com a água, adsorvendo a solução polimérica da fase aquosa, o que favorece o aumento do tamanho da partícula ao invés da formação de um novo núcleo de partícula.

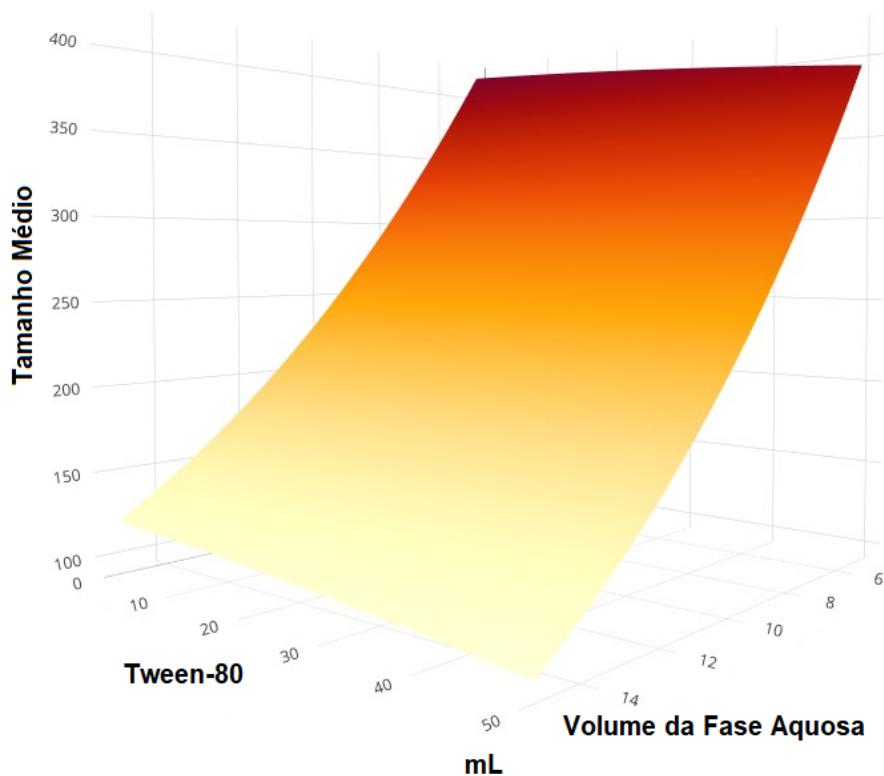
O tamanho da NP é definido por variáveis, a tabela 2 mostra quais foram as mais importantes para esse caso:

Variáveis importantes para o tamanho da nanopartícula	
Variáveis	Escala de Importância
Tween-80 (mL)	1,0
Volume da fase aquosa (mL)	0,7355
PVA 40-88 (mg)	0,7282
Volume da fase orgânica (mL)	0,7112
Eudragit L100	0,4940
Temperatura da fase aquosa	0,3459
Eudragit E100	0,2604
Tipo de agitação da fase aquosa	0,2470
Tipo de gotejamento da fase orgânica na aquosa	0,2034

**Tabela 2:** Variáveis importantes para o tamanho da nanopartícula a partir da análise da Rede Neural.

A partir das duas primeiras variáveis importantes foi possível realizar um gráfico de superfície para verificar a quantidade necessária que se utilizou dos componentes para determinar o menor e o maior tamanho da NP (**Fig. 9**). O tamanho mínimo da nanopartícula

ocorreu com a quantidade máxima de Tween-80 juntamente com o maior volume de fase aquosa, já o maior tamanho aconteceu na presença do volume mínimo de fase aquosa com o valor mínimo de Tween-80.

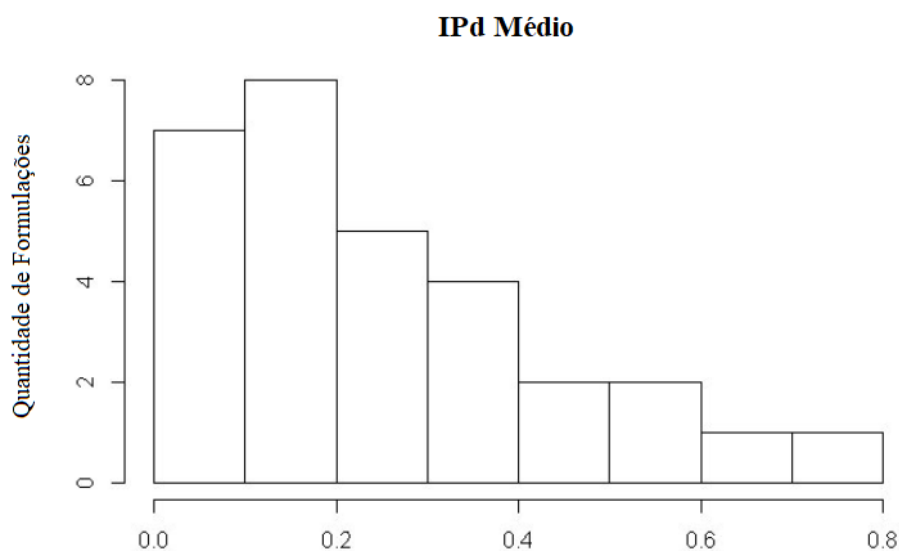


**Figura 9:** Gráfico de superfície relacionado as duas principais variáveis para determinação de tamanho da NP.

### 5.3 ANÁLISE DO ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO DAS NANOPARTÍCULAS

O valor médio para o IPd encontrado foi de 0,2563 e a mediana de 0,2050, indicando uma proximidade entre os valores e demonstrando uma distribuição mais próxima de uma “Normal”. A semelhança de uma “Normal” significa uma distribuição mais uniforme entre os valores mínimo e máximo encontrados, 0,020 e 0,73, respectivamente, com maior quantidade para valores abaixo da mediana. Essa característica pode ser observada pelo menor valor entre o primeiro quartil, 0,11, e a mediana, obtendo uma diferença de 0,09, comparando com o valor da mediana com o terceiro quartil, 0,3550, com uma diferença de 0,15.

A figura abaixo demonstra o histograma da variação dos valores de IPd, com quantidades mais próximas ao valor mínimo do que do valor máximo:



**Figura 10:** histograma dos valores médios encontrados para o índice de polidispersão das nanopartículas.

Índice de Polidispersão Médio	
Mínimo	0,020
1º Quartil	0,110
Mediana	0,205
Média	0,256
3º Quartil	0,355
Máximo	0,730

**Tabela 3:** Resultados dos valores mínimos, 1º quartil, mediana, média, 3º quartil e máximo do índice de polidispersão médio das nanopartículas

Foi possível observar as variáveis importantes que define o IPd, no caso das trinta formulações foram, em ordem: volume da fase orgânica, quantidade do polímero de maior peso molecular (Eudragit L100), quantidade do tensoativo sólido (PVA 40-88), seguida pela quantidade do tensoativo líquido (Tween-80), volume da fase aquosa, tipo de gotejamento, quantidade do polímero de menor peso molecular (Eudragit E100) e, por fim, a temperatura da fase aquosa.

Variáveis importantes para Índice de Polidispersão	
Variáveis	Escala de Importância
Volume da fase orgânica (mL)	1,0

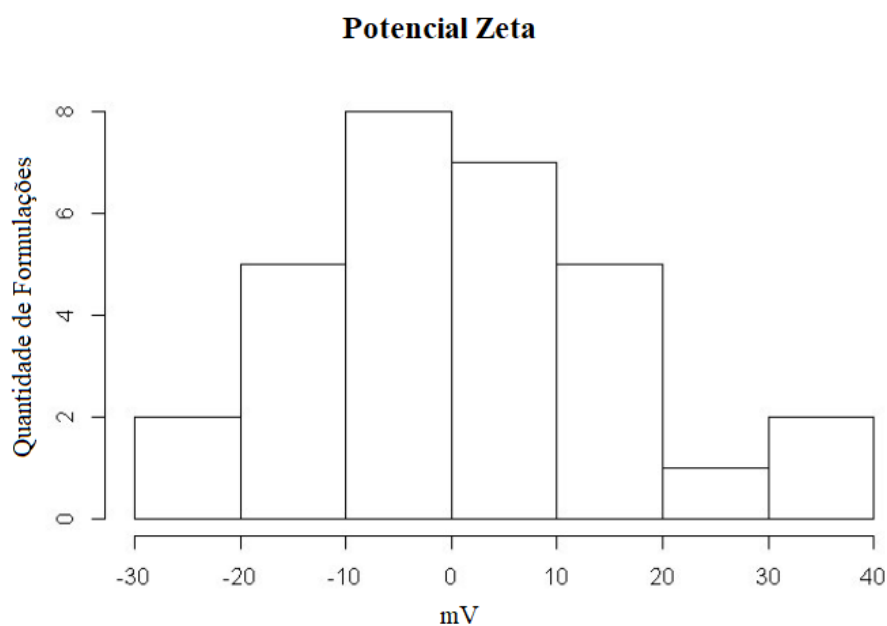
Eudragit L100 (mg)	0,9891
PVA 40-88 (mg)	0,9728
Tween-80 (mL)	0,9530
Volume da fase aquosa (mL)	0,8995
Tipo de agitação da fase aquosa	0,5605
Tipo de gotejamento da fase orgânica na aquosa	0,4113
Eudragit E100 (mg)	0,3775
Temperatura da fase aquosa	0,2505

**Tabela 4:** variáveis importantes para o índice de polidispersão (IPd) a partir da análise da Rede Neural.

Um valor ideal para o IPd é quando está próximo de 0,1, indicando alta homogeneidade na população de nanopartículas, enquanto valores de IPd elevados sugerem ampla distribuição de tamanho ou de várias populações particuladas. Na tabela, o volume da fase orgânica está em primeiro lugar como uma variável importante para definir o IPd, seguidamente o Eudragit L100. Essas duas variáveis se interligam pois o polímero utilizado deve possuir certa afinidade com a fase orgânica para não acontecer a agregação entre as partículas assim que verter a fase orgânica na aquosa. A agregação nesta fase é explicada por Quintanar Guerrero et al., devido as gotas de solvente contendo polímeros que tendem agregação e formação de nanopartículas por causa da difusão contínua de solvente e a presença de um meio não solvente.

#### 5.4 ANÁLISE DO POTENCIAL ZETA DAS NANOPARTÍCULAS

Quanto aos valores do potencial Zeta das nanoesferas, o valor mínimo foi de  $-25.8$  mV, máximo de  $32,53$  mV e a amplitude de  $58,33$  mV. A análise entre a mediana de  $-1.180$  mV e o primeiro quartil,  $-8,562$  mV, apresenta uma distância interquartil de  $7,382$  mV, em módulo. Esse valor está próximo da mediana se comparado na diferença entre mediana e o terceiro quartil,  $9,945$  mV, resultando em uma distância interquartil de  $11,125$  mV. A partir dessa análise é possível perceber uma característica semelhante a distribuição “Normal”, ou seja, os valores obtidos estão distribuídos ao redor da média, conforme pode ser observado no histograma abaixo:



**Figura 11:** histograma dos valores médios para o potencial Zeta das nanopartículas.

Potencial Zeta Médio (mV)	
Mínimo	-25,800
1° Quartil	-8,562
Mediana	-1,180
Média	1,434
3° Quartil	9,945
Máximo	32,530

**Tabela 5:** Resultados dos valores mínimos, 1° quartil, mediana, média, 3 quartil e máximo do potencial Zeta médio das nanopartículas

A variável que apresenta mais influência para o potencial Zeta, segundo o modelo gerado é a quantidade do tensoativo líquido (tween-80) assim como para o tamanho da nanopartícula. As seguintes variáveis como quantidade de PVA, quantidade do Eudragit L100, volume da fase aquosa, quantidade do Eudragit E100, volume da fase orgânica, temperatura da fase aquosa, tipo de agitação e, por fim, tipo de gotejamento foram importantes para o valor do Zeta. A tabela a seguir apresenta os percentuais de cada variáveis:

Variáveis importantes para o Potencial Zeta	
Variável	Escala de importância
Tween-80 (mL)	1,0
PVA (mg)	0,7811
Eudragit L100 (mg)	0,5863
Volume fase aquosa (mL)	0,5512



Eudragit E100	0,5445
Volume fase orgânica (mL)	0,4578
Temperatura da fase orgânica	0,3744
Tipo de agitação da fase aquosa	0,1779
Tipo de gotejamento da fase orgânica na aquosa	0,1668

**Tabela 6:** variáveis importantes para o potencial Zeta a partir da análise da Rede Neural.

O Tween-80, um tensoativo não-iônico, é importante para uma estabilidade longa da NP pois ele é responsável por adsorver macromoléculas hidrofílicas na superfície da nanoesfera, aumentando a repulsão estérica entre elas. Portanto, quando a NP está com valores de Zeta elevados ou nos extremos há dificuldade na agregação entre as partículas devido à sua alta taxa de repulsão. Porém, quando há alta quantidade de íons presente na solução, devido à adição do NaOH, ocorre uma compressão da dupla camada elétrica e uma diminuição do valor absoluto do potencial, levando à aglomeração e sedimentação de nanopartículas. Isso é explicado por ZHU, Dongsheng et al., 2009.

De acordo com as formulações realizadas nesse projeto, o PVA também tem influência na carga da nanoesfera, sendo carregada positivamente, então o tensoativo é catiônico e apresenta o mesmo efeito que o aniônico, há repulsão quando ocorre altas taxas do potencial Zeta. Portanto, a presença dos tensoativos e a sua concentração determina a força de atração ou repulsão entre as nanopartículas, prevendo a estabilidade final.

## 5.5 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

A eficiência de encapsulação (EE) é um fator determinante para avaliar quanto o fármaco foi incorporado no interior da nanopartícula, uma alta taxa de EE é desejável para o fármaco atingir um local de ação desejável. Para o presente trabalho, o fármaco não apresenta um local de ação determinado, porém, foi capaz de avaliar os resultados das eficiências de encapsulação das trinta formulações (**Tabela 7**).

Formulações	Eficiência de encapsulação (%)	Formulações	Eficiência de encapsulação (%)
Met 1	97,64	Met 16	84,35
Met 2	84,91	Met 17	98,16

Met 3	97,4	Met 18	92,67
Met 4	94,52	Met 19	96,47
Met 5	92,47	Met 20	95,77
Met 6	41,37	Met 21	98,71
Met 7	41,17	Met 22	87,87
Met 8	95,91	Met 23	97,71
Met 9	97,26	Met 24	95,32
Met 10	96,31	Met 25	94,00
Met 11	91,28	Met 26	90,09
Met 12	97,23	Met 27	84,05
Met 13	97,54	Met 28	90,00
Met 14	92,00	Met 29	96,21
Met 15	88,85	Met 30	94,56

**Tabela 7:** resultados da eficiência de encapsulação do Metoprolol Tartárico na nanoesfera.

Como observado, a maior parte das formulações obtiveram EE maior que 90%, somente a Met 2, 6, 7, 15, 16, 22 e 27 possuíram EE abaixo que 90%. Uma correlação com o potencial Zeta pode ser feita para explicar a estabilidade da nanopartícula e o valor médio da Met 27 foi de  $-2,96$  mV, representando uma baixa taxa de repulsão entre as partículas e favorecendo a aglomeração entre elas. A **figura 6 e 7** mostra um aglomerado de precipitados o que pode ter facilitado o resultado de EE mais baixo, resultando em uma afinidade reduzida do polímero com o ativo (SOUTO et al., 2012).

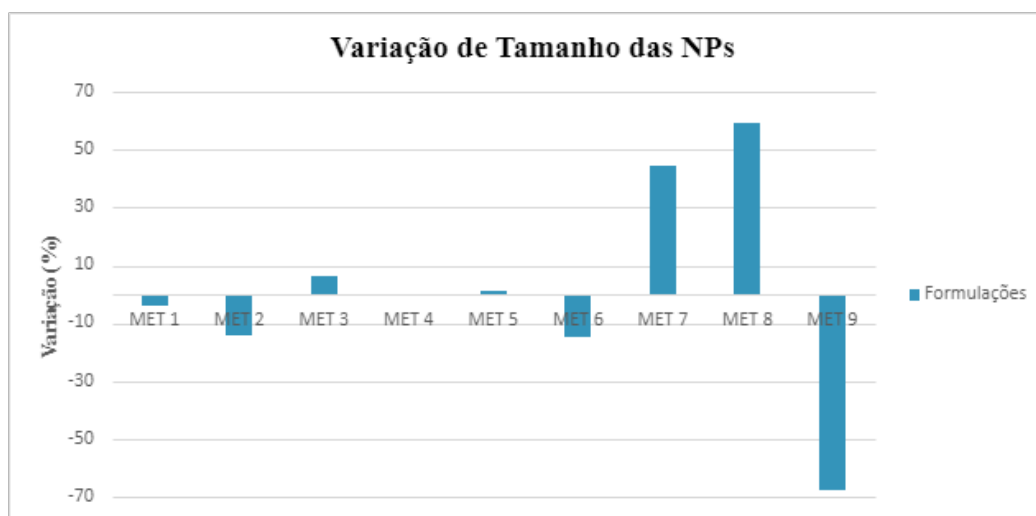
## 5.6 ESTABILIDADE DA NANOPARTÍCULAS

Para analisar a estabilidade das nanopartículas, avaliando a integridade de suas propriedades estruturais, algumas formulações foram selecionadas aleatoriamente para realizar novamente a análise do IPd, tamanho e potencial Zeta após 45 dias da produção, armazenados em geladeira a  $4^{\circ}\text{C}$  e protegidos da luz (**Figuras: 12, 13 e 14**).

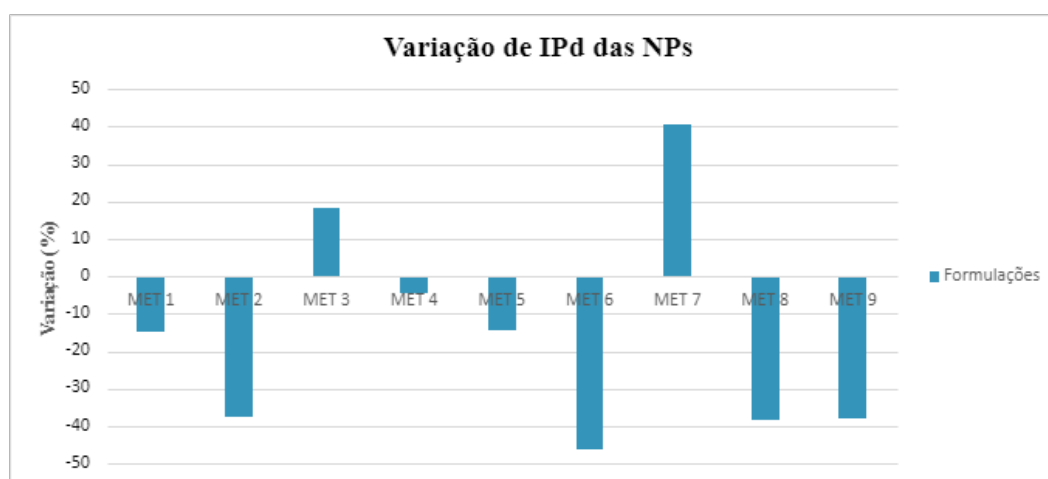
Normalmente, as suspensões coloidais não possuem tendencia à separação de fases, até alguns meses após a preparação, pois o processo de sedimentação é lento para as nanopartículas, sendo minimizado pelo movimento browniano. Entretanto, alguns fatores influenciam a estabilidade das suspensões como a adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas e a presença de tensoativos adsorvidos (SCHAFFAZICK et. al., 2003).

Todos os gráficos das figuras 12, 13 e 14 foram baseados na diferença entre o valor médio obtido no dia 45 com o médio do  $1^{\circ}$  dia de manipulação da NP, e dividido pelo valor médio do  $1^{\circ}$  dia, referência, o resultado multiplicado por 100 (para porcentagem).

$$\text{Equação 2} = \frac{PM \text{ valor } 45^\circ \text{ dia} - PM \text{ valor } 1^\circ \text{ dia}}{PM \text{ valor } 1^\circ \text{ dia}} \times 100$$



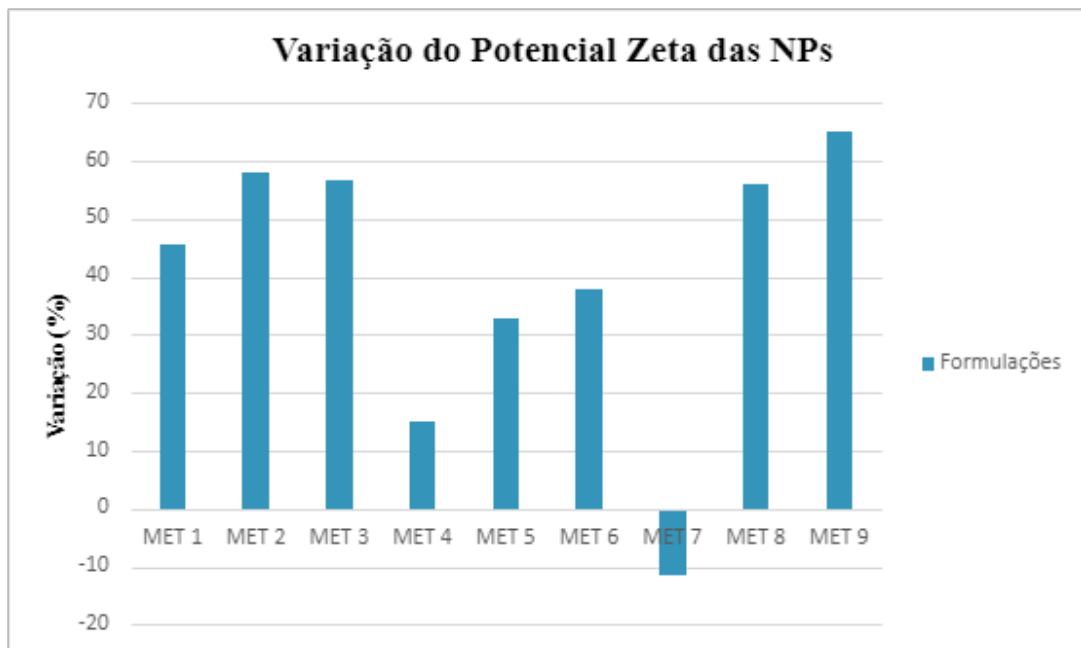
**Figura 12:** Variação em porcentagem do tamanho das NPs.



**Figura 13:** Variação em porcentagem de IPd das NPs.

Como observado na **figura 12**, somente as formulações MET 7 e 8 obtiveram uma alteração maior que 30%, em relação ao tamanho inicial, representando uma possível formação de aglomerados com a superfície da nanoesfera. A MET 9 reduziu de tamanho quase 70%. A **figura 13** representada pela variação de IPd somente a MET 4 apresentou uma variação inferior a 10%, reproduzindo uma possível falta de tendência de agregação e sedimentação das nanopartículas dispersas, já que com a variação elevada da distribuição de tamanho de partículas é possível observar a agregação. Todas as formulações analisadas apresentaram uma

variação de mais de 10% para o potencial Zeta, representando uma falta de estabilidade para elas (**Fig. 14**) (SCHAFFAZICK et. al., 2003).



**Figura 14:** Variação em porcentagem do potencial Zeta das NPs.

## 6. CONCLUSÃO

As formulações realizadas e analisadas pelo modelo preditivo, Rede Neural, apresentaram variáveis importantes distintas quanto ao tamanho, IPd e potencial Zeta. O tamanho mínimo da NP produzida foi de 59,23 nm e o máximo 1040,83 nm e as variáveis mais importantes foram Tween-80, volume da fase aquosa e o PVA 40-88. O tamanho mínimo da nanopartícula ocorreu com a quantidade máxima de Tween-80 juntamente com o maior volume de fase aquosa, já o maior tamanho aconteceu na presença do volume mínimo de fase aquosa com o valor mínimo de Tween-80. Quanto ao índice de polidispersibilidade o valor mínimo encontrado foi 0,020 e o máximo 0,730 e as variáveis importantes foram o volume da fase orgânica, Eudragit L100 e PVA 40-88. Já para o potencial Zeta as variáveis importantes foram o Tween-80, PVA e o Eudragit L100 e o valor mínimo obtido foi -25,800 mV e o máximo 32,530 mV. O resultado da eficiência de encapsulação foi aceitável para quase todas formulações, apresentando um valor maior de 90%, somente a Met 2, 6, 7, 15, 16, 22 e 27 apresentaram um valor abaixo de 90%. Quanto a estabilidade, as formulações analisadas não apresentaram resultados satisfatórios no quesito de variação de IPd e potencial zeta, todas obtiveram alterações maiores que 10%. Somente as formulações 7, 8 e 9 sofreram variação maior que 30%.

Dessa forma, com o agrupamento de dados adequados e realização de novas formulações com variáveis distintas é possível determinar e prever quais as características físico-químicas das nanopartículas e utilizá-la para determinado fim terapêutico.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CRUCHO, Carina IC; BARROS, Maria Teresa. **Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods.** *Materials Science and Engineering: C*, v. 80, p. 771-784, 2017.

CRUCHO, Carina IC. **Stimuli-responsive polymeric nanoparticles for nanomedicine.** *ChemMedChem*, v. 10, n. 1, p. 24-38, 2015.

FESSI, H. P. F. D. et al. **Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement.** *International journal of pharmaceutics*, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

GIANNAVOLA, Claudia et al. **Influence of preparation conditions on acyclovir-loaded poly-D, L-lactic acid nanospheres and effect of PEG coating on ocular drug bioavailability.** *Pharmaceutical research*, v. 20, n. 4, p. 584-590, 2003.

JARA, Miguel O. et al. **Finding key nanoprecipitation variables for achieving uniform polymeric nanoparticles using neurofuzzy logic technology.** *Drug delivery and translational research*, v. 8, n. 6, p. 1797-1806, 2018.

Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., and Danquah, M. K. (2018). **Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations.** *Beilstein J. Nanotechnol.* 9, 1050–1074.

KAMALY, Nazila et al. **Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation.** *Chemical Society Reviews*, v. 41, n. 7, p. 2971-3010, 2012.

LIMA, Ana Luiza et al. **Polymeric nanocapsules: A review on design and production methods for pharmaceutical purpose.** *Methods*, 2021.

LINCE, Federica; MARCHISIO, Daniele L.; BARRESI, Antonello A. **Strategies to control the particle size distribution of poly-ε-caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications.** *Journal of colloid and interface science*, v. 322, n. 2, p. 505-515, 2008.

LIU, Yun et al. **Formulation of nanoparticles using mixing-induced nanoprecipitation for drug delivery.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 59, n. 9, p. 4134-4149, 2019.

MARTINS, Dorival et al. **Antitumoral activity of L-ascorbic acid-poly-D, L-(lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein.** *International journal of nanomedicine*, v. 5, p. 77, 2010.

MCNEIL, Scott E. **Nanotechnology for the biologist.** *Journal of leukocyte biology*, v. 78, n. 3, p. 585-594, 2005.

MILADI, Karim et al. **Nanoprecipitation process: from particle preparation to in vivo applications.** In: *Polymer nanoparticles for nanomedicines*. Springer, Cham, 2016. p. 17-53.

MORA-HUERTAS, Claudia E.; FESSI, Hatem; ELAISSARI, Abdelhamid. **Polymer-based nanocapsules for drug delivery.** *International journal of pharmaceutics*, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010.

PIACENTINI, Emma et al. **Continuous production of PVA-based hydrogel nanoparticles by membrane nanoprecipitation.** Journal of Membrane Science, v. 637, p. 119649, 2021.

QUINTANAR-GUERRERO, David et al. **Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers.** Drug development and industrial pharmacy, v. 24, n. 12, p. 1113-1128, 1998.

RAO, J. Prasad; GECKELER, Kurt E. **Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters.** Progress in polymer science, v. 36, n. 7, p. 887-913, 2011.

RIVAS, Claudia Janeth Martínez et al. **Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery.** International journal of pharmaceutics, v. 532, n. 1, p. 66-81, 2017.

SAAD, Walid S.; PRUD'HOMME, Robert K. **Principles of nanoparticle formation by flash nanoprecipitation.** Nano Today, v. 11, n. 2, p. 212-227, 2016.

SANITÀ, Gennaro; CARRESE, Barbara; LAMBERTI, Annalisa. **Nanoparticle surface functionalization: How to improve biocompatibility and cellular internalization.** Frontiers in Molecular Biosciences, p. 381, 2020.

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende et al. **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos.** Química nova, v. 26, p. 726-737, 2003.

SEYMOUR, Geisser. **Predictive Inference: An Introduction.** New York: Chapman & Hall, 2016.

SOUTO, Eliana B.; SEVERINO, Patrícia; SANTANA, Maria Helena A. **Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II.** Polímeros, v. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.

SUN, Haotian et al. **Crosslinked polymer nanocapsules for therapeutic, diagnostic, and theranostic applications.** Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, v. 12, n. 6, p. e1653, 2020.

ZHU, Dongsheng et al. **Dispersion behavior and thermal conductivity characteristics of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O nanofluids.** Current Applied Physics, v. 9, n. 1, p. 131-139, 2009.