COPPE UFRJ
Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia

EFEITO DAS CONDIÇÕES DE SÍNTESE SOBRE A MORFOLOGIA DE NANOPARTÍCULAS DE AMIDO E SUA APLICAÇÃO COMO CARREADOR DE FÁRMACO

Isabelle Cornelsen Sampaio Lima

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia da Nanotecnologia, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia da Nanotecnologia.

Orientador: Renata Antoun Simão

Bráulio Soares Archanjo

Rio de Janeiro
Abril de 2018

EFEITO DAS CONDIÇÕES DE SÍNTESE SOBRE A MORFOLOGIA DE NANOPARTÍCULAS DE AMIDO E SUA APLICAÇÃO COMO CARREADOR DE FÁRMACO

Isabelle Cornelsen Sampaio Lima

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA DA NANOTECNOLOGIA.

Examinada por:

_____

Prof[a]. Renata Antoun Simão, D. Sc.

_____

Dr. Bráulio Soares Archanjo, D. Sc.

_____

Prof[a]. Luciana Spinelli Ferreira, D. Sc.

_____

Dr. Joyce Rodrigues de Araújo, D. Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

ABRIL DE 2018

Lima, Isabelle Cornelsen Sampaio

Efeito das condições de síntese sobre a morfologia de nanopartículas de amido e sua aplicação como carreador de fármaco / Isabelle Cornelsen Sampaio Lima. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2018.

XV. 73: il.; 29,7cm

Orientadores: Renata Antoun Simão

Bráulio Soares Archanjo

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia da Nanotecnologia, 2018.

Referências Bibliográficas: p. 68-73.

1. Nanopartícula. 2. Nanoprecipitação. 3. Amido. I. Simão, Renata Antoun, *et al*. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia da Nanotecnologia. III. Título.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

EFEITO DAS CONDIÇÕES DE SÍNTESE SOBRE A MORFOLOGIA DE NANOPARTÍCULAS DE AMIDO E SUA APLICAÇÃO COMO CARREADOR DE FÁRMACO

Isabelle Cornelsen Sampaio Lima

Abril/2018

Orientadores: Renata Antoun Simão

Bráulio Soares Arcanjo

Programa: Engenharia da Nanotecnologia

Este projeto teve como objetivo desenvolver e caracterizar nanopartículas biopoliméricas e biodegradáveis compostas por amido de milho, sintetizadas por nanoprecipitação, visando sua empregabilidade tanto como partículas isoladas, quanto em filmes de biopolímeros. Os parâmetros do processo de nanoprecipitação que influenciam as características físico-químicas, estruturais e morfológicas das nanopartículas foram estudados. A fim de avaliar a influência dos parâmetros da nanoprecipitação, as nanopartículas e os filmes foram caracterizados por MEV, MET, AFM, FTIR e DRX. Observou-se que as nanopartículas apresentaram tamanhos e diferentes formatos e os filmes apresentaram mudanças na rugosidade e no tamanho das partículas.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

EFFECT OF THE SYNTHESIS CONDITIONS ON THE MORPHOLOGY OF STARCH NANOPARTICLES AND THEIR APPLICATION AS A DRUG CARRIER

Isabelle Cornelsen Sampaio Lima

April/2018

Advisors: Renata Antoun Simão

Bráulio Soares Arcanjo

Department: Nanotechnology Engineering

This project aimed to develop and characterize biopolymeric and biodegradable nanoparticles synthesized by nanoprecipitation. Nanoparticles, both isolated and used in biopolymer films, were composed of corn starch. The parameters of the nanoprecipitation process that influence the physico-chemical, structural and morphological characteristics of the nanoparticles were studied. In order to evaluate the influence of nanoprecipitation parameters, nanoparticles and films were characterized by MEV, MET, AFM, FTIR and DRX. It was observed that the nanoparticles had different sizes and shapes and the films presented changes in the roughness and particle size.

Dedicatória

Aos meus pais e meu amado noivo,

por tornarem mais essa etapa possível

Agradecimentos

Ao meu amado, Lucas Kling, que sempre esteve presente compartilhando os momentos bons e ruins, por me ajudar nos momentos de desespero, por acreditar em mim, pelo incentivo, pelas risadas, pelo seu grande amor e motivação.

Aos meus pais e meus irmãos. Que sempre me apoiaram, que incentivaram os meus sonhos e contribuíram para que eu chegasse aqui.

À professora Renata Simão e ao Bráulio Archanjo, meus orientadores, pela orientação, pelos ensinamentos, pela ajuda, pelo suporte nos momentos difíceis, pela confiança durante este trabalho.

Aos membros da banca examinadora.

Á Márcia Sader pelo incentivo, pela ajuda, pelas conversas animadas e pelo carinho.

Ao Heleno, Jackson e Ana Paula, técnicos e funcionários do Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais pela ajuda.

A todos do Laboratório de Engenharia de Superfícies, em especial a Íris, Vanessa e Antônio, pelas longas conversas e ajuda no trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia da Nanotecnologia e a todos os professores pela ajuda e pelos ensinamentos.

A todos os meus amigos e colegas de turma do PENt, que participaram dessa jornada.

À professora Luciana Spinelli e ao professor Werneck pelos grandes conselhos nos seminários.

A todos do Núcleo de Microscopia do INMETRO que sempre ajudaram, apoiaram e por ensinarem muito desde a graduação.

As pessoas que sempre acreditaram no meu potencial e sempre me incentivaram.

A CAPES pelo apoio financeiro sem o qual não teria desenvolvido este projeto.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVO 3

2.1 Objetivo Geral 3

2.2 Objetivo específico 3

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4

3.1 Amido 4

3.2 Estrutura 4

3.2.1 Amilose 5

3.2.2 Amilopectina 6

3.2.3 Cristalinidade 7

3.2.4 Propriedades físico-químicas 8

3.2.4.1 Gelatinização 8

3.2.4.2 Retrogradação 9

3.3 Nanopartícula de amido 9

3.4 Filme com nanopartículas de amido 11

3.5 Nanoprecipitação 12

3.6 Ácido Ascórbico 14

4. MATERIAIS E MÉTODOS 16

4.1 Material 16

4.2 Síntese das nanopartículas 16

4.2.1 Metodologia I 16

4.2.2 Metodologia II 17

4.3 Síntese das nanopartículas com fármaco 19

4.3.1 Metodologia I 19

4.3.2 Metodologia II 20

4.4 Síntese dos filmes com nanopartículas de amido 21

4.5 Caracterização das nanopartículas de amido e dos filmes 22

4.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura 22

4.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão 23

4.5.3 Microscopia de Força Atômica 23

4.5.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier 23

4.5.5 Difração de Raio-X 24

5. RESULTADOS 25

5.1 Nanopartículas de amido 25

5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura 25

5.1.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão 33

5.1.3 Microscopia de Força Atômica 35

5.2 Nanopartículas de amido com o fármaco 41

5.2.1 Microscopia Eletrônicade Varredura 41

5.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão 43

5.2.3 Microscopia de Força Atômica 45

5.3 Filmes de amido com nanopartículas 45

5.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura 46

5.3.2 Microscopia de Força Atômica 49

5.3.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier 51

5.3.4 Difração de Raio-X 54

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS 56

6.1 Nanopartículas de amido 56

6.2 Nanopartículas de amido com o fármaco 61

6.3 Filmes de amido com nanopartículas 62

7. CONCLUSÃO 65

8. SUGESTÃO PARA FUTUROS TRABALHOS 67

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68

Lista de Figuras

FIGURA 1. 1: NÚMERO DE PUBLICAÇÕES DOS ÚLTIMOS 18 ANOS CONTENDO O TERMO "NANOPARTÍCULA DE AMIDO". FONTE DOS DADOS: WEB OF SCIENCE. 1

FIGURA 3. 1: ESTRUTURA DO AMIDO EM MULTIESCALA. ADAPTADO DE (DUFRESNE, 2010). 5
FIGURA 3. 2: ESTRUTURA DA AMILOSE E AS LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS A-1,4 REPRESENTADAS EM VERMELHO. ADAPTADO DE (DENARDIN, 2009). 6
FIGURA 3. 3: MODELO DA ESTRUTURA INTERNA DO GRÂNULO DE AMIDO. ADAPTADO DE (DENARDIN, 2009). 6
FIGURA 3. 4: ESTRUTURA DA AMILOPECTINA E AS LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS A-1,4 E A-1,6 REPRESENTADAS EM VERMELHO E AZUL, RESPECTIVAMENTE. ADAPTADO DE (DENARDIN, 2009). . 7
FIGURA 3. 5: CLASSIFICAÇÃO DAS CADEIAS DE AMILOPECTINA. ADAPTADO DE (DENARDIN, 2009). 7
FIGURA 3. 6: DIFRATOGRAMA DE RAIOS-X DE DIFERENTES TIPOS DE CRISTALINIDADE DO AMIDO. ADAPTADO DE (RAMÍREZ, 2011) 8
FIGURA 3. 7: ESQUEMA DO PROCESSO DA NANOPRECIPITAÇÃO. ADAPTADO DE (ELAISSARI, 2017). 13

FIGURA 4. 1: ILUSTRAÇÃO DO REATOR USADO NESSE TRABALHO. 17
FIGURA 4. 2: IMAGEM DA SOLUÇÃO DA SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS. 17
FIGURA 4. 3: IMAGEM DAS AMOSTRAS DAS NANOPARTÍCULAS DE AMIDO COM ÁCIDO ASCÓRBICO, APÓS OITO MESES, SINTETIZADA PELA METODOLOGIA I (ESQUERDA) E PELA METODOLOGIA II (DIREITA). 42
FIGURA 4. 4: IMAGENS DOS FILMES DE AMIDO SINTETIZADOS COM (A) 10.7G DE AMIDO, (B) 5G DE AMIDO, (C) 1G DE AMIDO E (D) 10.7G DE AMIDO E ÁCIDO ASCÓRBICO. 46

FIGURA 5. 1: IMAGENS POR MEV DAS NANOPARTÍCULAS DE AMIDO SINTETIZADAS PELA (A) METODOLOGIA I (AGAAR_310_I) E PELA (B) METODOLOGIA II (AGAAR_310_II). 26
FIGURA 5. 2: MICROGRAFIAS POR MEV DAS SÍNTESES DAS NANOPARTÍCULAS DE AMIDO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMIDO. SÍNTESE COM (A) 10,7G DE AMIDO - AGAAR_310; (B) 5G DE AMIDO - AGAAR_35; E (C) 1G DE AMIDO - AGAAR_31. NAS MICROGRAFIAS UMA PARTÍCULA FOI IDENTIFICADA COM UMA SETA PARA MELHOR VISUALIZAÇÃO. 28
FIGURA 5. 3: MICROGRAFIA POR MEV DAS NANOPARTÍCULAS DE AMIDO OBTIDAS NA SÍNTESE COM 10,7G DE AMIDO 3001 PELA METODOLOGIA II. (A) AGQAR_310, (B) AGQAL_310, (C) AGAAR_310 E (D) AGAAL_310. 29
FIGURA 5. 4: MICROGRAFIA POR MEV DAS NANOPARTÍCULAS DE AMIDO OBTIDAS NA SÍNTESE COM 5G DE AMIDO 3001 PELA METODOLOGIA II. (A) AGQAR_35, (B) AGQAL_35, (C) AGAAR_35 E (D) AGAAL_35. 30

FIGURA 5. 5: MICROGRAFIA POR MEV DAS NANOPARTÍCULAS DE AMIDO OBTIDAS NA SÍNTESE COM 1G DE AMIDO 3001 PELA METODOLOGIA II. (A) AGQAR_31, (B) AGQAL_31, (C) AGAAR_31 E (D) AGAAL_31. 31
FIGURA 5. 6: IMAGENS POR MEV DAS NANOPARTÍCULAS OBTIDAS NAS SÍNTESES EM DIFERENTES CONDIÇÕES COM 1G DE AMIDO 4001. (A) AGQAR_41, (B) AGQAL_41, (C) AGAAR_41 E (D) AGAAL_41. 32
FIGURA 5. 7: MICROGRAFIA POR MET DA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE AMIDO COM 10,7G DE AMIDO 3001 (A) E UM AUMENTO DE UMAS DAS PARTÍCULAS (B) (AGAAR_310). 33
FIGURA 5. 8: MICROGRAFIA POR MET DA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE AMIDO COM 5G DE AMIDO 3001. OBSERVARAM-SE PARTÍCULAS COM FORMATOS HEXAGONAIS (A), AGLOMERADOS (B) E UM DESTAQUE DA PARTÍCULA HEXAGONAL (C) (AGAAR_35). 34
FIGURA 5. 9: MICROGRAFIA POR MET DA SÍNTESE DE PARTÍCULAS DE AMIDO COM 1G DE AMIDO 3001 (AGAAR_31). 34
FIGURA 5. 10: MICROGRAFIA POR MET DA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE AMIDO COM 1G DE AMIDO 4001 (AGAAR_41). OBSERVARAM-SE PARTÍCULAS COM FORMATOS HEXAGONAIS (A), RETANGULARES (B) E AGLOMERADOS DE PARTÍCULAS COM FORMATOS ARREDONDADOS. 35
FIGURA 5. 11: IMAGENS POR AFM DAS PARTÍCULAS DAS SÍNTESES EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMIDO 3001 (A) 10.7G DE AMIDO – AGAAR_310, (B) 5G DE AMIDO – AGARR_35, (C) 1G DE AMIDO – AGAAR_31 E (D) 1G DE AMIDO – AGAAR_41. 36
FIGURA 5. 12: IMAGENS POR AFM DAS NANOPARTÍCULAS DAS SÍNTESES EM DIFERENTES CONDIÇÕES E COM CONCENTRAÇÃO DE 10.7G DE AMIDO 3001. AS CONDIÇÕES SÃO (A) AGQAR, (B) AGQAL, (C) AGAAR, (D) AAQAL E O (E) HISTOGRAMA COM A ALTURA DA NANOPARTÍCULA DA AMOSTRA AGAAR_310. 37
FIGURA 5. 13: IMAGENS POR AFM DAS NANOPARTÍCULAS DAS SÍNTESES EM DIFERENTES CONDIÇÕES E COM CONCENTRAÇÃO DE 5G DE AMIDO 3001. AS CONDIÇÕES SÃO (A) AGQAR, (B) AGQAL, (C) AGAAR E (D) AGAAL. 38
FIGURA 5. 14: IMAGENS POR AFM DAS NANOPARTÍCULAS DAS SÍNTESES EM DIFERENTES CONDIÇÕES E COM CONCENTRAÇÃO DE 1G DE AMIDO 3001. AS CONDIÇÕES SÃO (A) AGQAR, (B) AGQAL, (C) AGAAR E (D) AGAAL. 39
FIGURA 5. 15: IMAGENS POR AFM DAS NANOPARTÍCULAS DA SÍNTESE COM CONCENTRAÇÃO DE 1G DE AMIDO 4001. AS CONDIÇÕES SÃO (A) AGAAR, (B) AGAAL, (C) AGQAR E (D) AGQAL. 40
FIGURA 5. 16: MICROGRAFIA POR MEV DAS NANOPARTÍCULAS COM ÁCIDO ASCÓRBICO PELA M ETODOLOGIA II (AGAAL_AA_310). 41
FIGURA 5. 17: MICROGRAFIA POR MEV DAS NANOPARTÍCULAS DE AMIDO COM ÁCIDO ASCÓRBICO SINTETIZADAS APÓS 8 MESES PELA METODOLOGIA II – AGAAL_AA_310 (A) E UM AUMENTO (B). 43
FIGURA 5. 18: MICROGRAFIA DAS NANOPARTÍCULAS DE AMIDO COM ÁCIDO ASCÓRBICO SINTETIZADAS PELA METODOLOGIA II E COM 10,7G DE AMIDO (AGAAL_AA_310). 44

FIGURA 5. 19: MICROGRAFIA POR MET DAS NANOPARTÍCULAS DE AMIDO COM ÁCIDO ASCÓRBICO SINTETIZADAS PELA (A) METODOLOGIA I (AGAAL_AA_310_I) E PELA (B) METODOLOGIA II (AGAAL_AA_310_II). 44
FIGURA 5. 20: IMAGENS POR AFM DAS NANOPARTÍCULAS DE AMIDO COM ÁCIDO ASCÓRBICO SINTETIZADAS PELA METODOLOGIA II. 45
FIGURA 5. 21: IMAGENS POR MEV DOS FILMES COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMIDO, FILME DE AMIDO SINTETIZADO COM (A) 10.7G DE AMIDO, (B) 5G DE AMIDO E (C) 1G DE AMIDO. 47
FIGURA 5. 22: IMAGENS POR MEV DO FILME DE AMIDO (A) E DO FILME DE AMIDO COM ÁCIDO ASCÓRBICO (B). 48
FIGURA 5. 23: IMAGENS DE AFM DO FILME DE AMIDO COM 10,7G DE AMIDO. IMAGEM DE ALTURA (A) E DE CONTRASTE DE FASE (B). 49
FIGURA 5. 24: IMAGENS DE AFM DO FILME DE AMIDO COM 5G DE AMIDO. IMAGEM DE ALTURA (A) E DE CONTRASTE DE FASE (B). 49
FIGURA 5. 25: IMAGENS DE AFM DO FILME DE AMIDO COM 1G DE AMIDO. IMAGEM DE ALTURA (A) E DE CONTRASTE DE FASE (B). 50
FIGURA 5. 26: IMAGENS DE AFM DE FILME COM ÁCIDO ASCÓRBICO COM 10.7G DE AMIDO. 50
FIGURA 5. 27: ESPECTROGRAMA DO PÓ DO AMIDO DE MILHO 3001, EM PRETO, DO FILME DE AMIDO COM 10,7G DE AMIDO, EM VERDE, FILME DE AMIDO COM 5G DE AMIDO, EM AZUL, E O FILME DE AMIDO COM 1G DE AMIDO, EM VERMELHO. 51
FIGURA 5. 28: ESPECTROGRAMA DO PÓ DO ÁCIDO ASCÓRBICO. 52
FIGURA 5. 29: ESPECTROGRAMA DO (A) PÓ DO ÁCIDO ASCÓRBICO, PÓ DO AMIDO DE MILHO 3001, FILME COM ÁCIDO ASCÓRBICO (FAA_310) E DO FILME PURO COM 10,7G DE AMIDO (FP_310). EM (B) OBSERVA-SE UM AUMENTO DA REGIÃO 2000-1500 CM^{-1}. 53
FIGURA 5. 30: DIFRATOGRAMA DO PÓ DO AMIDO DE MILHO 3001, DO FILME COM 10,7G DE AMIDO (F_310), FILME COM 5G DE AMIDO (F_35) E DO FILME COM 1G DE AMIDO (F_31). 54
FIGURA 5. 31: IMAGEM DO AUMENTO DO DIFRATOGRAMA DO PÓ DO ÁCIDO ASCÓRBICO. 55
FIGURA 5. 32: DIFRATOGRAMA DO PÓ DO AMIDO DE MILHO 3001, DO FILME DE AMIDO COM 10,7G DE AMIDO (F_310) E DO FILME DE AMIDO COM O ÁCIDO ASCÓRBICO COM 10,7G DE AMIDO (FAA_310) 55

FIGURA 6. 1: MICROGRAFIAS DE MEV DAS NANOPARTÍCULAS DE AMIDO SINTETIZADAS COM DIFERENTES VALORES DE AMIDO E DIFERENTES VALORES DE AGITAÇÃO. 57
FIGURA 6. 2: NANOPARTÍCULAS DE AMIDO DA SÍNTESE DE 10,7G DE AMIDO, (A) MICROGRAFIA DE MEV E UM AUMENTO DE UMA DAS PARTÍCULAS, (B) MICROGRAFIA POR MET E UM AUMENTO DE UMA DAS PARTÍCULAS E (C) IMAGEM DE ALTURA POR AFM DAS PARTÍCULAS. 58
FIGURA 6. 3: NANOPARTÍCULAS DE AMIDO DA SÍNTESE DE 5G DE AMIDO, (A) MICROGRAFIA DE MEV E UM AUMENTO DE UMA DAS PARTÍCULAS, MICROGRAFIA POR MET DA (B) PARTÍCULA

HEXAGONAL E (C) DA PARTÍCULA CIRCULAR AGLOMERADA E (D) IMAGEM DE ALTURA POR AFM DAS PARTÍCULAS. 59
FIGURA 6. 4: NANOPARTÍCULAS DE AMIDO DA SÍNTESE DE 1G DE AMIDO, (A) MICROGRAFIA DE MEV E UM AUMENTO DE UMA DAS PARTÍCULAS, (B) MICROGRAFIA POR MET E (C) IMAGEM DE ALTURA POR AFM DAS PARTÍCULAS. 59
FIGURA 6. 5: NANOPARTÍCULAS DE AMIDO DA SÍNTESE DE 10,7G DE AMIDO 4001, (A) MICROGRAFIA DE MEV E UM AUMENTO DE DAS PARTÍCULAS, (B) E (C) MICROGRAFIA POR MET DAS PARTÍCULAS E (D) IMAGEM DE ALTURA POR AFM DAS PARTÍCULAS. 60
FIGURA 6. 6: NANOPARTÍCULAS DE AMIDO DA SÍNTESE DE 10,7G DE AMIDO COM ÁCIDO ASCÓRBICO, (A) MICROGRAFIA DE MEV E UM AUMENTO DE UMA DAS PARTÍCULAS, (B) MICROGRAFIA POR MET E (C) IMAGEM DE ALTURA POR AFM DAS PARTÍCULAS. 61
FIGURA 6. 7: FILME DE AMIDO COM NANOPARTÍCULAS DE AMIDO DA SÍNTESE DE 10,7G DE AMIDO, (A) MICROGRAFIA DE MEV, (B) IMAGEM DE ALTURA E (C) DE CONTRASTE DE FASE POR AFM. 62
FIGURA 6. 8: FILME DE AMIDO COM NANOPARTÍCULAS DE AMIDO DA SÍNTESE DE 5G DE AMIDO, (A) MICROGRAFIA DE MEV, (B) IMAGEM DE ALTURA E (C) DE CONTRASTE DE FASE POR AFM. 63
FIGURA 6. 9: FILME DE AMIDO COM NANOPARTÍCULAS DE AMIDO DA SÍNTESE DE 1G DE AMIDO, (A) MICROGRAFIA DE MEV, (B) IMAGEM DE ALTURA E (C) DE CONTRASTE DE FASE POR AFM. 63
FIGURA 6. 10: FILME DE AMIDO COM NANOPARTÍCULAS DE AMIDO E ÁCIDO ASCÓRBICO DA SÍNTESE DE 10,7G DE AMIDO, (A) MICROGRAFIA DE MEV, (B) IMAGEM DE ALTURA E (C) DE CONTRASTE DE FASE POR AFM. 64

Lista de Tabelas

TABELA 3. 1: QUANTIDADE MÉDIA DE AMILOSE E ALGUMAS FONTES VEGETAIS. ADAPTADO DE (MALI, 2010). 4

TABELA 4. 1: PARÂMETROS UTILIZADOS NAS SÍNTESES DE NANOPARTÍCULAS DE AMIDO DE MILHO, PELA METODOLOGIA I. 16
TABELA 4. 2: PARÂMETROS UTILIZADOS NAS SÍNTESES DE NANOPARTÍCULAS DE AMIDO DE MILHO, PELA METODOLOGIA II. 19
TABELA 4. 3: PARÂMETRO UTILIZADO NA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS COM ÁCIDO ASCÓRBICO PELA METODOLOGIA I. 20
TABELA 4. 4: PARÂMETROS UTILIZADOS NAS SÍNTESES DE NANOPARTÍCULAS COM ÁCIDO ASCÓRBICO PELA METODOLOGIA II. 21
TABELA 4. 5: PARÂMETROS UTILIZADOS PARA AS SÍNTESES DOS FILMES. 22

TABELA 5. 1: TAMANHO MÉDIO DAS PARTÍCULAS FORMADAS PELA SÍNTESE COM 10,7G DE AMIDO 3001. 41
TABELA 5. 2: TAMANHO MÉDIO DAS PARTÍCULAS FORMADAS PELA SÍNTESE COM 5G DE AMIDO 3001. 42
TABELA 5. 3: TAMANHO MÉDIO DAS PARTÍCULAS FORMADAS PELA SÍNTESE COM 1G DE AMIDO 3001. 43
TABELA 5. 4: TAMANHO MÉDIO DAS PARTÍCULAS FORMADAS PELA SÍNTESE COM 1G DE AMIDO 4001. 45
TABELA 5. 5: ALTURA MÉDIA DAS PARTÍCULAS FORMADAS NAS SÍNTESES OBTIDAS COM O AMIDO 3001 51
TABELA 5. 6: ALTURA MÉDIA DAS PARTÍCULAS FORMADAS NAS SÍNTESES OBTIDAS COM O AMIDO 4001. 53

1. INTRODUÇÃO

O amido é um biopolímero natural, renovável, biodegradável que apresenta boa propriedade de bio-adesão. É produzido por muitas plantas e é fonte para o armazenamento de energia. É o segundo material de biomassa mais abundante na natureza e encontra-se em raízes, talos, sementes de plantas e culturas básicas como o arroz, o milho, o trigo, a tapioca e a batata (BULÉON, 1998).

As nanopartículas preparadas a partir de polissacarídeos naturais, como o amido, apresentam propriedades interessantes como a biocompatíbilidade, a não toxicidade e a biodegradabilidade (SUN, 2016). As nanopartículas de amido, em especial, possuem propriedades únicas que diferem significativamente de seus materiais a granel e podem ser sintetizadas por diferentes metodologias, como a hidrólise ácida, extrusão, homogeneização e emulsificação de alta pressão e nanoprecipitação (SUN, 2016).

A síntese por nanoprecipitação é simples, rápida, reprodutível, de baixo custo e não necessita de reagentes tóxicos. O procedimento consiste na adição de uma solução polimérica em um não-solvente levando a precipitação de partículas na escala nanométrica. As condições da síntese, como a concentração e a velocidade de agitação, são importantes parâmetros para as propriedades e características das partículas obtidas (ZHOU, 2017).

Devido às propriedades das nanopartículas de amido, elas têm sido amplamente utilizadas em diversas aplicações, como em bolsas hidrossolúveis para inseticidas (FREDERIKSEN, 2002), transportadores de medicamentos (MAHKAM, 2010), em pneu (DUFRESNE, 2010) e em cápsula dura para fármacos (PARK, 2008). Devido às diversas aplicações, tem sido observado um crescente interesse em pesquisas sobre nanopartículas de amido nos últimos anos, como pode ser visto na Figura 1.1, onde é mostrado o número de pesquisas publicadas no assunto.

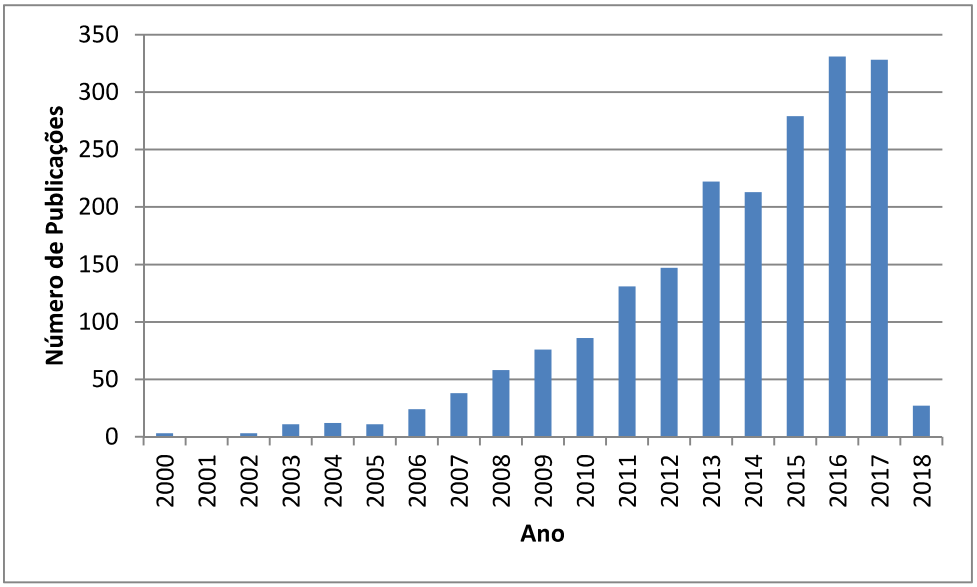


Figura 1. 1: Número de publicações dos últimos 18 anos contendo o termo "nanopartícula de amido". Fonte dos dados: Web of Science.

Nesta dissertação foi desenvolvida uma metodologia, por nanoprecipitação, orientada à síntese de nanopartículas em suspensão e em filmes, totalmente a base de amido de milho. Os parâmetros fundamentais para realização da síntese e formação das nanopartículas foram estudados e definidos. Além disto, foi também proposto o estudo da eficiência de encapsulamento do fármaco pelas nanopartículas. Diferentes metodologias foram aplicadas para sua caracterização e para o bom entendimento dos processos de formação das nanopartículas.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é verificar como os parâmetros de síntese por nanoprecipitação afetam a forma e o tamanho das nanopartículas de amido e explorar a viabilidade desta rota para o encapsulamento de ácido ascórbico.

2.2 Objetivo específico

- ✓ Investigar os efeitos dos parâmetros da nanoprecipitação variando: a proporção de amilose/amilopectina do amido, a ordem de adição do não-solvente e da solução polimérica, a concentração e a temperatura da solução polimérica utilizada na síntese e a velocidade de agitação.

- ✓ Caracterizar a morfologia e a estrutura das partículas em solução com e sem o fármaco.

- ✓ Caracterizar a morfologia e a estrutura cristalina dos filmes de amido contendo nanopartículas, produzidos em uma única etapa.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Amido

O amido é um carboidrato constituído principalmente de glicose com ligações glicosídicas e é um dos principais componentes da maioria dos vegetais. Os tubérculos, cereais, raízes e as leguminosas são fontes de amido e a batata, milho e o arroz são alguns exemplos das principais fontes de amido comerciais. A origem do amido influencia nas propriedades como a forma, o tamanho, a composição, a distribuição e a cristalinidade dos grânulos (BULÉON, 1998).

É constituído pela amilose e amilopectina, dois polímeros de glicose presentes no amido natural, que possuem estruturas e funções diferentes. Na maioria dos amidos as porcentagens do peso relativo de amilopectina variam entre 67 e 84% e a porcentagem de amilose varia entre 16 e 33% (Tabela 1) (BULÉON, 1998 e SOUZA, 2000). A proporção e o arranjo dessas moléculas determinam as propriedades físico-químicas e funcionais do grânulo do amido (BLANSHARD, 1987).

Tabela 3. 1: Quantidade média de amilose e algumas fontes vegetais. Adaptado de (MALI, 2010).

Fonte vegetal	Amilose (%)
Milho	25
Batata	23
Arroz	15 – 25
Trigo	20
Mandioca	16 – 20
Inhame	30
Aveia	16 – 33

Fonte: Adaptado de (MALI, 2010).

3.2 Estrutura

Por muitos anos a estrutura do amido vem sendo pesquisada e devido a sua complexidade um modelo universal foi desenvolvido, como pode ser vista na Figura 3.1. É constituído por um grânulo com tamanho de 2-100 µm, Figura 3.1 (a), que apresenta anéis de crescimento de 120 a 500 nm, Figura 3.1 (b). O grânulo é composto

por "*blocklets*" de 20 a 50 nm, Figura 3.1 (c), feito por lamelas cristalinas e amorfas de 9 nm de espessura, Figura 3.1 (d). A lamela cristalina é composta pelas cadeias paralelas da amilopectina e a lamela amorfa é formada pelos pontos de ramificação da amilopectina e pelas cadeias de amilose, Figura 3.1 (e) (DUFRESNE, 2010).

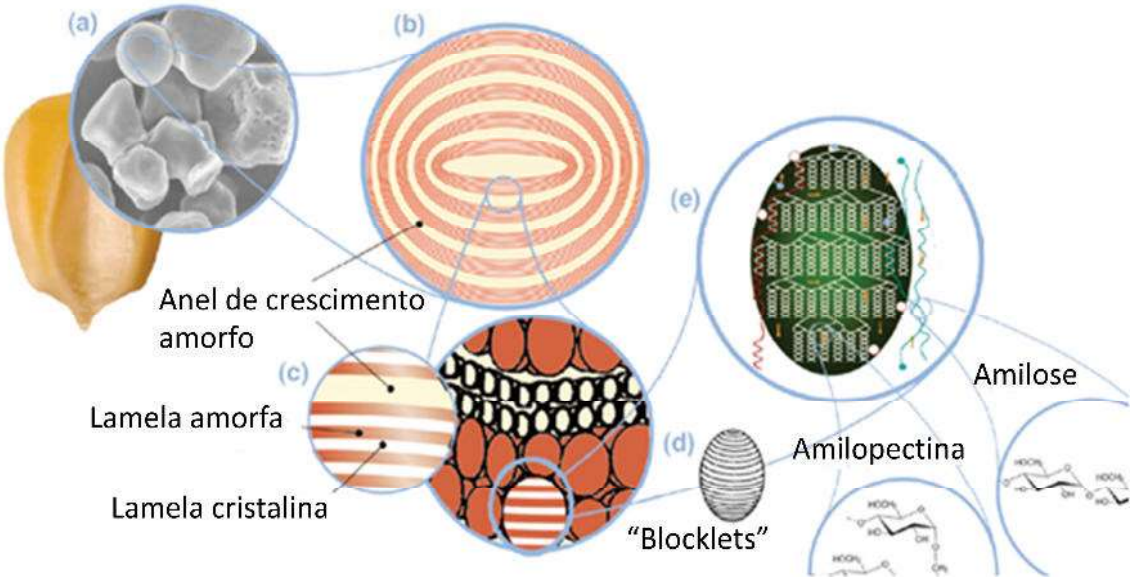


Figura 3. 1: Estrutura do amido em multiescala. Adaptado de (DUFRESNE, 2010).

A presença de anéis concêntricos, chamados de anéis de crescimento, dentro dos grânulos sugerem que o amido tenha deposição em um ritmo diário que aumenta o seu tamanho, tendo o material recém sintetizado na superfície. Dessa forma, sugere-se que a primeira camada seja chamada de centro ou "*hilum*", apresentando muitos terminais redutores e menos organizados que o resto do grânulo. Os terminais redutores estão voltados para a superfície permitindo novas ligações com unidades de glicose, levando ao crescimento das cadeias de amilopectina (BAKER, 2001).

3.2.1 Amilose

Amilose é um polímero linear, composto por unidades de α-glicopiranose unidas por ligações glicosídicas α-1,4, como pode ser visto na Figura 3.2, e o seu peso molecular é da ordem de 250.000 Daltons (1.500 unidades de glicose), variando de acordo com a fonte (BULÉON, 1998). Alguns cereais são denominados de cerosos, ou waxy, por apresentarem cerca de 1% ou menos de amilose. Alguns exemplos de amido

waxy são o milho e o arroz. Também existem os amidos com altas taxas de amilose, podendo variar de 35% a 85% dependendo da fonte (DENARDIN, 2009).

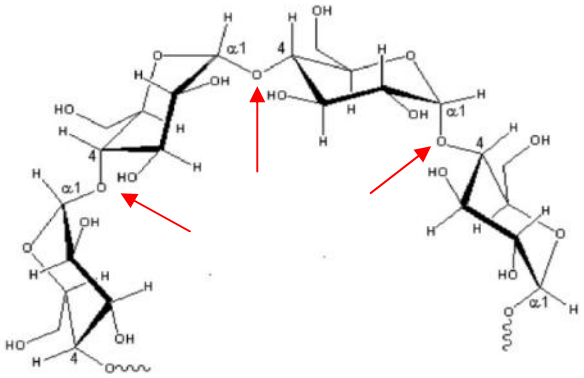


Figura 3. 2: Estrutura da amilose e as ligações glicosídicas α-1,4 representadas em vermelho. Adaptado de (DENARDIN, 2009).

A amilose localiza-se principalmente nos anéis amorfos, entre as cadeias de amilopectina e no centro do grão, Figura 3.3. (DENARDIN, 2009).

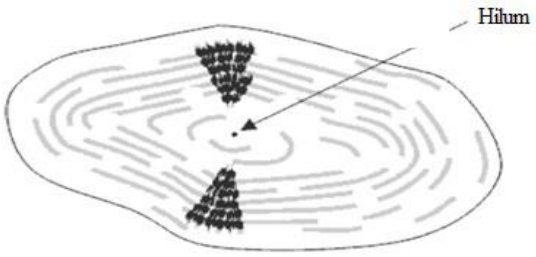


Figura 3. 3: Modelo da estrutura interna do grânulo de amido. Adaptado de (DENARDIN, 2009).

3.2.2 Amilopectina

Amilopectina é composta por unidades de α-D-glicopiranose unidas por ligações glicosídicas α-1,4 e α-1,6 formando uma estrutura ramificada, Figura 3.4. O peso molecular varia de 50 a $500x10^6$ Daltons. No grânulo do amido é estruturalmente e funcionalmente a mais importante por ser capaz de formar o grão de amido sem a presença de amilose (DENARDIN, 2009).

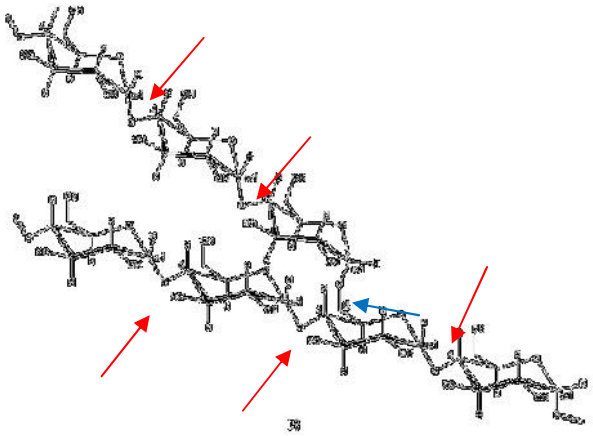


Figura 3. 4: Estrutura da amilopectina e as ligações glicosídicas α-1,4 e α-1,6 representadas em vermelho e azul, respectivamente. Adaptado de (DENARDIN, 2009).

A estrutura da amilopectina pode ser classificada como A, B e C, Figura 3.5. A cadeia tipo A é composta por uma cadeia não-redutora de glicoses unidas por ligações glicosídicas α-1,4 sem ter ramificações. Essas cadeias são unidas na cadeia tipo B através das ligações glicosídicas α-1,6. A cadeia tipo C é uma molécula de amilopectina com terminal redutor, sendo composta pelas as duas ligações glicosídicas, α-1,4 e α-1,6 (DENARDIN, 2009).

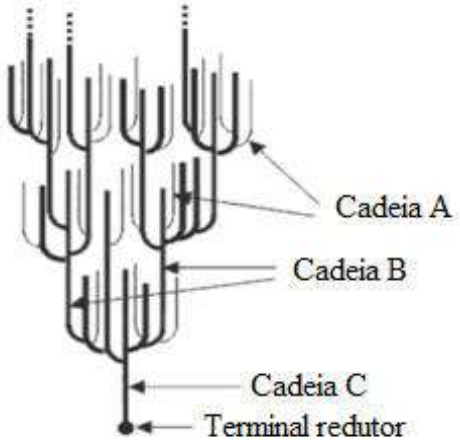


Figura 3. 5: Classificação das cadeias de amilopectina. Adaptado de (DENARDIN, 2009).

3.2.3 Cristalinidade

O amido é semicristalino e sua cristalinidade está presente nos anéis de crescimento. A região cristalina é formada por cadeias paralelas do tipo A e B da

amilopectina. A região amorfa apresenta os pontos de ramificações da amilopectina e a amilose, tornando essa região menos ordenada. A cristalinidade do amido nativo varia de 15% a 45% e apresentam padrões de difração de raios-x que correspondem a duas formas (A e B), tendo sua classificação baseada na variação do conteúdo da água na estrutura e na configuração do empacotamento da dupla hélice. A presença de água é importante para a manutenção da cristalinidade e pode ser destruída pela alta temperatura levando a perda de características de birrefringência e dos padrões de raios-x (OLIVEIRA, 2007)

A cristalinidade do tipo A, presente na maioria dos cereais, é uma unidade celular monocíclica altamente condensada e cristalina, onde 12 moléculas de glicose de duas cadeias no sentido anti-horário abrigam quatro moléculas de água entre as hélices. Já a cristalinidade do tipo B, presente em amido com alto teor de amilose e em amido retrogradado, é uma unidade básica de cadeias hexagonal onde a unidade celular tem duas hélices no sentido anti-horário, alinhadas e arranjadas em paralelo, contendo 32 moléculas de água. Além das duas classificações, existe uma terceira, a cristalinidade do tipo C que possui uma estrutura intermediária aos tipos A e B (HIZUKURI, 1983).

A difração de raios-x é usada para determinar a estrutura cristalina dos amidos e os três tipos de cristalinidade apresentam ângulos de difração específicos, Figura 3.6 (RAMÍREZ, 2011).

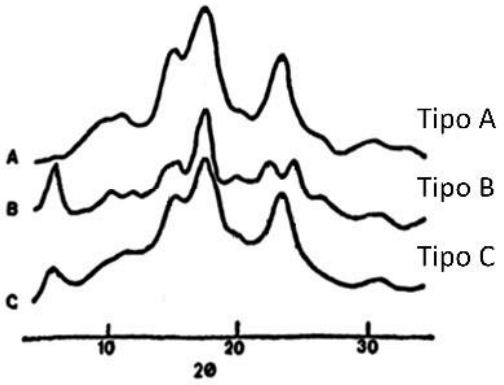


Figura 3. 6: Difratograma de raios-X de diferentes tipos de cristalinidade do amido. Adaptado de (RAMÍREZ, 2011)

3.2.4 Propriedades físico-químicas

3.2.4.1 Gelatinização

A gelatinização pode ser definida como a perda da birrefringência do amido começando no centro e expandindo rapidamente para a periferia do grânulo. Devido às fortes ligações de hidrogênio que mantêm unidas as cadeias, o amido é considerado insolúvel em água e tem um grau de inchamento de 10 a 20%. Ao aquecer o amido em água, o grau de inchamento aumenta até que as ligações de hidrogênio entre as cadeias se rompem. Esse processo se inicia nas regiões amorfas dos grânulos, devido à fragilidade das ligações de hidrogênio da amilose, inchando, levando a desestabilidade da cristalinidade do amido, e resultando em um aumento do movimento molecular que leva a uma completa separação da amilose e amilopectina. Nessa etapa a água forma ligações de hidrogênio com a amilose e amilopectina expondo seus grupos hidroxilas. O processo de gelatinização termina quando a ruptura da estrutura do grânulo, o inchamento, a hidratação e a solubilização das moléculas de amido ocorrem.A temperatura para a gelatinização depende da fonte botânica do amido (PARKER, 2001 e KEETALS, 1996).

3.2.4.2 Retrogradação

O processo de retrogradação ocorre quando o amido gelatinizado é resfriado, onde a energia cinética diminui e as ligações de hidrogênio se tornam mais fortes e as cadeias começam a reassociar em um estado mais ordenado, voltando a ter regiões cristalinas e a ser insolúvel em água. A formação das ligações entre as cadeias leva a saída da água, processo chamado de sinérese. Ao resfriar, o gel se torna turvo devido a formação das regiões cristalinas mudando o índice de refração do meio e o gel se torna mais viscoso podendo levar a precipitação de cristais insolúveis de amido. A retrogradação da amilose e amilopectina é cineticamente diferente. A amilose retrograda mais rápido, reassociando com outras moléculas de amilose com uma estrutura de dupla hélice e cristalina quando a solução resfria. Já a amilopectina apresenta uma retrogradação mais lenta (DENARDIN, 2009).

3.3 Nanopartícula de amido

As nanopartículas preparadas a partir de polissacarídeos naturais, como o amido, atraíram ampla atenção no âmbito da pesquisa por possuírem vantagens como a não toxicidade, a biocompatibilidade e a biodegradabilidade (SUM, 2016). Diferentes

sínteses são usadas para obter nanopartículas de amido e como os processos são diferentes, cada síntese formam nanopartículas com propriedades, formatos e tamanhos diferentes. Podem ser sintetizadas por hidrolise ácida, por nanoprecipitação e por microfluídica, por exemplo. Devido às propriedades das nanopartículas de amido, são usadas em diferentes áreas como em cosméticos e em embalagens de alimentos (LIM, 2014).

Atualmente, poucos produtos comerciais apresentam nanopartículas de amido. Os produtos mais populares são: Eco-Sphere da EcoSynthetix que utiliza nanopartículas de amido em tecidos, em papel e até mesmo como substituto do acetato polivinílico; e a BioTREND, um pneu com nanopartículas de amido desenvolvido pela Novamont em parceria com a Goodyear (LIM, 2014).

As nanopartículas são capazes de absorver e/ou de encapsular um fármaco, protegendo contra degradação química e enzimática. Nanopartículas de polímero biodegradável possui um alto potencial como carreador de fármacos devido as suas aplicações como liberação controlada em uma determinada região do corpo. Devido às suas propriedades, das nanopartículas de amido vem sendo bastante usada como fonte não poluente e rentável para o fornecimento sustentável de produtos farmacêuticos (OCHUBIOJO, 2012).

A caracterização das nanopartículas de amido sintetizadas por nanoprecipitação foi realizada por (SUN, 2016 a) onde estudou a influência da quantidade de amilose presente no amido na formação da partícula. Foi reportado por (WANG, 2009) o estudo do controle do tamanho das nanopartículas sintetizadas por nanoprecipitação usando o amido disperso em acetona e a água como o não-solvente. Outro trabalho sobre o controle do tamanho de nanopartícula de amido por nanoprecipitação, foi reportado por (CHIN, 2011) que usou NaOH/uréia como o solvente do amido e o etanol como o não-solvente. Um estudo do uso da nanopartícula de amido como carreador de fármaco, a cúrcuma, foi reportado por (CHIN, 2014). Os autores usaram a nanoprecipitação como a única etapa para a formação das partículas e o encapsulamento do fármaco mudando o não-solvente. O estudo da influência dos parâmetros da técnica de nanoprecipitação na formação das partículas de amido usando a água como solvente e o etanol como o não-solvente ainda não foi reportado na literatura até agora.

3.4 Filme com nanopartículas de amido

A preocupação com o meio ambiente nos últimos anos levou ao desenvolvimento de filmes biodegradáveis de polímeros naturais para a substituição dos plásticos a base de petróleo. Muitos estudos sobre filme de amido foram e ainda são realizados de modo a estudar suas propriedades. Esses filmes podem vir a substituir as atuais embalagens de alimentos, contribuindo para o desenvolvimento da sustentabilidade e também no controle da emissão de CO_2 (PARRA, 2004).

Os filmes a base de amido podem ser aplicados nas mais diferentes áreas como na farmacêutica, na agricultura, em sacolas plásticas e embalagem de alimentos. Esses filmes podem ser produzidos pela adição de plastificantes, já que o amido não é um termoplástico verdadeiro, e por diferentes técnicas como modelagem térmica ou *casting*. Já se sabe que a adição de um plastificante melhora as propriedades mecânicas dos filmes e normalmente ainda é necessário realizar modificação na estrutura do amido ou na função do filme a base de amido (SUN, 2016 a).

Muitos estudos já foram realizados usando diferentes tipos de nanopartículas e mostraram uma melhora nas propriedades dos filmes. O uso das nanopartículas de amido de milho, o mesmo material da matriz, ainda é recente e poucos trabalhos foram realizados. A caracterização física, mecânica e a viscoelasticidade dos filmes com nanopartículas, ambos de amido de milho, foram realizados por (LI, 2012 e LI, 2013) que mostrou que o uso dessas nanopartículas leva a uma melhora nas propriedades dos filmes. Esses estudos também foram realizados por (LIU, 2016) e (MA, 2008). Todos esses trabalhos foram realizados em filmes com plastificantes. A síntese e caracterização de filmes com nanopartículas, ambos de amido de milho, sem plastificante e sintetizado do precipitado da nanoprecipitação ainda não foi reportado até agora.

O filme de amido com as nanopartículas também é de grande interesse da área farmacêutica devido à liberação controlada de fármacos como um substituto dos comprimidos e até mesmo dos medicamentos líquidos. A administração desses filmes pode ser oral, através da absorção da mucosa da boca, através do intestino delgado ou até mesmo pela pele (PRASAD, 2008).

3.5 Nanoprecipitação

A técnica de nanoprecipitação se baseia na redução da qualidade do solvente onde se encontra o polímero dissolvido. A nanoprecipitação pode ser causada pela alteração do pH, condições de solubilidade ou pela adição de uma solução não solvente em relação ao polímero mas ainda miscível ao solvente. É considerada como uma das primeiras técnicas usadas para encapsular fármacos e foi desenvolvida por (FESSI, 1989). É uma técnica simples, fácil, reprodutível e bastante usada para sínteses de nanopartículas. O processo de precipitação pela adição de um não solvente ocorre em quatro etapas: supersaturação, nucleação, crescimento e coagulação (ELAISSARI, 2017).

A supersaturação ocorre quando o não solvente é adicionado na solução polimérica diminuindo o potencial de dissolução do polímero no meio, levando o sistema a um estado de supersaturação (S_r). A razão da supersaturação, representada pela Equação 3.1, afeta as propriedades das nanopartículas formadas, onde um alto valor de supersaturação leva a formação de partículas menores (JOYE, 2013).

$$S_r = \frac{C_s}{C_\infty} \qquad \text{Equação 3.1}$$

Onde C_s é a razão da concentração do polímero e C_∞ é a solubilidade do polímero na mistura do solvente.

Quando a supersaturação do sistema atinge um nível crítico de concentração do solvente/não solvente, é iniciada a nucleação e o sistema começa a ganhar estabilidade termodinâmica. Dessa forma a barreira de energia (ΔG) a ser superada para formar um núcleo é representada pela Equação 3.2, (D'AADIO, 2011).

$$\Delta G = \frac{16\pi\sigma^2 v^3}{3K^2T^2(lnS_r)^2} \qquad \text{Equação 3.2}$$

Onde σ é tensão interfacial do sólido/líquido, v é o volume molar do soluto, K é constante de Boltzmann e T é a temperatura.

A associação das moléculas do soluto causada pela supersaturação leva a formação de núcleo primário que cresce até atingir um tamanho crítico que é estável contra a dissolução. A etapa de nucleação acontece até que o crescimento de núcleos esgote a solução supersaturada (D'AADIO, 2011). A razão de nucleação (N_r) segue a relação de Arrhenius e pode ser expressa pela Equação 3.3.

$$N_r = \frac{2D}{d^5} . exp\left[-\frac{\Delta G}{KT}\right] \qquad \text{Equação 3.3}$$

Onde D é difusão molecular do polímero e d é o diâmetro da molécula.

O núcleo pode crescer por condensação ou coagulação. A condensação é a adição de moléculas simples na superfície da partícula e este processo cessa ao atingir um nível abaixo da concentração de equilíbrio de saturação (D'ADDIO, 2011).

A coagulação é a adesão de partículas entre si. Ocorre quando as interações atrativas são fortes em relação às interações repulsivas. O fator que comanda a etapa de coagulação é a freqüência de colisão, chamada de eficiência de colisão, que depende na concentração de partículas, do tamanho e da temperatura. Para proteger as partículas da coagulação, agentes estabilizantes podem ser adicionados durante o preparo introduzindo uma interação repulsiva (JOYE, 2013).

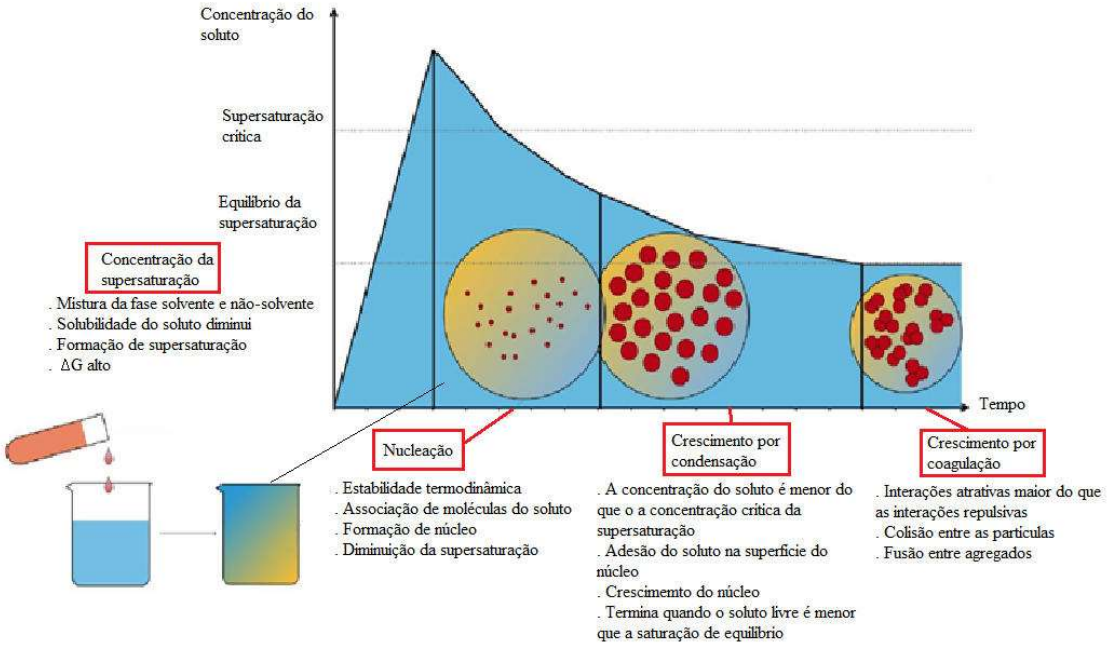


Figura 3. 7: Esquema do processo da nanoprecipitação. Adaptado de (ELAISSARI, 2017).

Os parâmetros utilizados nessa técnica são importantes para as características das nanopartículas formadas. A quantidade de polímero presente na solução polimérica interfere nas características das nanopartículas formadas. Um aumento na quantidade de polímero leva a formação de partículas grandes devido à alta viscosidade da solução

polimérica que favorece a formação de partículas maiores (CHOMY, 2002 e SIMSEK, 2013).

A ordem da adição da solução polimérica e do não-solvente influência nas características das nanopartículas formadas. Ao adicionar o não-solvente na solução polimérica, a formação de precipitados é favorecida devido à taxa de difusão solvente/não-solvente ser baixa. Logo, a adição da solução polimérica no não-solvente, diminui a quantidade de aglomerados por ter maior taxa de difusão do solvente/não-solvente (MILADI, 2016).

A proporção da solução polimérica e do não-solvente também é importante. Ao dobrar o volume do não-solvente partículas menores são formadas devido a uma maior taxa de difusão do solvente/não-solvente. A agitação mais usada na nanoprecipitação é a agitação magnética e ao aumentar a velocidade de agitação, maior a taxa de difusão e menor o tamanho das nanopartículas formadas. A temperatura da solução polimérica, também é importante. Quanto maior a temperatura, maior será a agitação molecular no meio, favorecendo o crescimento e aglomeração das nanopartículas (MILADI, 2016).

3.6 Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico ou Vitamina C é uma cetolactona hidrossolúvel, possui dois grupos hidroxila ionizáveis, sua fórmula é $C_6H_8O_6$ e o sua massa molecular é 176,12g (COSTA, 2014). É essencial na formação de proteína do colágeno, na cicatrização de feridas, na manutenção do sistema imunológico e nervoso saudável e sua atuação como um antioxidante ajuda na prevenção de doenças (SOUZA, 2015).

O ácido ascórbico possui propriedades antioxidantes, são estáveis na forma de pó, entretanto esta característica diminui quando dissolvidos em água. Fatores ambientais, tais como temperatura, pH, teor de umidade, oxigênio, íons metálicos, UV e raios-x afetam a sua estabilidade e provocam sua degradação. Além da indústria alimentícia, o ácido ascórbico também é usado como conservante nas indústrias farmacêutica, química e cosmética devido a suas propriedades antioxidantes (ARRIGONI, 2002).

O encapsulamento com uma partícula polimérica pode proteger o fármaco da oxidação, aumentando a sua estabilidade e mantendo sua atividade biológica, facilitando

sua aplicação em produtos. O encapsulamento também é uma alternativa para uma liberação controlada do fármaco (PIERUCCI, 2006).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material

Nesse projeto foram utilizados amido de milho Amidex 3001 e Amidex 4001 fornecidos pela empresa Ingredion Brasil Ing. Ind. Ltda, contendo 73% e 99-100% de amilopectina, respectivamente. O Álcool Etílico 95% foi adquirido da Sigma-Aldrich Brasil LTDA, Brasil. O ácido L-ascórbico foi adquirido pela LABSYNTH Produtos para Laboratórios LTDA, Brasil.

4.2 Síntese das nanopartículas

4.2.1 Metodologia I

As nanopartículas de amido de milho foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, baseado no procedimento desenvolvido por (MA, 2008). Primeiramente 10,7g amido de milho e 200 ml de água destilada foram adicionados em um reator, Figura 4.1, aquecido a 90°C por 1h em agitação mecânica constante a 420 rpm. Esse processo é chamado do gelatinização. A próxima etapa, depois da gelatinização, consiste na precipitação pela adição de 200 ml etanol, gota a gota, no amido gelatinizado ainda quente, também em constante agitação. Após a total adição do etanol, a solução foi resfriada até a temperatura ambiente (25°C) e mais 200 ml de etanol foi adicionado novamente, gota a gota. Os parâmetros utilizados para a síntese de nanopartículas pela metodologia I se encontram na Tabela 4.1. No final do processo a solução apresentou duas fases obtidas pela decantação: um sobrenadante transparente e um precipitado, Figura 4.2.

Tabela 4. 1: Parâmetros utilizados nas sínteses de nanopartículas de amido de milho, pela Metodologia I.

Nome*	Amido	Quant. AG	Temp Ag	Vel Agit
AGAAR_310_I	3001	10,7g	25°C	1000 rpm

* Cada letra e número do nome da amostra significa uma informação da síntese. As duas primeiras letras (AG) significam amido gelatinizado, a terceira (A) letra significa temperatura ambiente; a quarta e quinta letras (AL) significam agitação lenta. No segundo campo, o número 3 é o tipo de amido, 3001, e o último número (10) significa a quantidade de amido usado na síntese, 10.7g. No último campo (I) significa metodologia I.

Figura 4. 1: Ilustração do reator usado nesse trabalho.

Figura 4. 2: Imagem da solução da síntese das nanopartículas.

4.2.2 Metodologia II

Nesta metodologia, o amido foi gelatinizado como descrito na Metodologia I mas, ao invés de adicionar o etanol no amido gelatinizado, como é feito na metodologia I, o amido gelatinizado foi adicionado ao etanol. Este procedimento foi realizado já que a adição da solução polimérica ao não-solvente' diminui a quantidade de aglomerados por ter maior taxa de difusão do solvente/não-solvente, como descrito na seção 3.5.

Foi adicionado 1 ml de amido gelatinizado, gota a gota, em 20 ml de etanol. Essa modificação permitiu uma síntese de nanopartículas com menos resíduos. Outros parâmetros também foram modificados e estudados de modo a entender como as condições de precipitação interferem na forma e tamanho das nanopartículas formadas. Os parâmetros estudados foram: a proporção de amilopectina no amido (amido 3001 e amido 4001), quantidade de amido (10.7g, 5g e 1g de amido), temperatura do amido gelatinizado (25°C ou 95°C) durante a precipitação e a velocidade de agitação magnética na precipitação (500 rpm ou 1000 rpm). Em todas as condições de síntese de nanopartículas, a solução ficou sob agitação por 30 min após adição do amido gelatinizado. Dessa forma, os parâmetros utilizados se encontram na Tabela 4.2.

Para a análise no MEV e no AFM as amostras foram preparadas da seguinte forma: primeiramente um pedaço de silício foi posicionado sobre uma placa térmica a 50°C e a superfície foi coberta com gotas do sobrenadante da solução, que foram retirados do frasco através de uma pipeta. A amostra ficou na placa térmica até secar. Esse procedimento foi feito ao todo quatro vezes. Para análise no MET foi utilizado um grid de cobre com filme de carbono com 300 mesh e uma gota de 20 µl foi adicionado na superfície do grid e seco a vácuo. Esse procedimento foi feito quatro vezes.

Tabela 4. 2: Parâmetros utilizados nas sínteses de nanopartículas de amido de milho, pela Metodologia II.

Nome*	Amido	Quant. AG	Temp. AG	Vel. Agit.
AGAAL_310	3001	10.7 g	27 °C	500 rpm
AGAAR_310			27 °C	1000 rpm
AGQAL_310			95 °C	500 rpm
AGQAR_310			95 °C	1000 rpm
AGAAL_35	3001	5 g	27 °C	500 rpm
AGAAR_35			27 °C	1000 rpm
AGQAL_35			95 °C	500 rpm
AGQAR_35			95 °C	1000 rpm
AGAAL_31	3001	1 g	27 °C	500 rpm
AGAAR_31			27 °C	1000 rpm
AGQAL_31			95 °C	500 rpm
AGQAR_31			95 °C	1000 rpm
AGAAL_41	4001	1 g	27 °C	500 rpm
AGAAR_41			27 °C	1000 rpm
AGQAL_41			95 °C	500 rpm
AGQAR_41			95 °C	1000 rpm

* Cada letra e número do nome de cada amostra significa uma informação da síntese. As duas primeiras letras (AG) significam amido gelatinizado, a terceira (A ou Q) letra significa a temperatura: ambiente ou quente; a quarta e quinta (AL ou AR) letras significam agitação lenta ou rápida. No segundo campo, o número 3 ou 4 é o tipo de amido, 3001 ou 4001, e o último número (10, 5 ou 1) significam a quantidade de amido usado na síntese, 10.7g, 5g ou 1g.

4.3 Síntese das nanopartículas com fármaco

4.3.1 Metodologia I

A fim de obter a incorporação do fármaco nas nanopartículas, 2,5g do ácido ascórbico (AA) foi dissolvido em 200 ml de etanol sob agitação constante e então foi

adicionado, gota a gota, no sistema onde contém o amido gelatinizado. A solução ficou em agitação magnética constante de 500 rpm por 16h. No final do procedimento, também foi obtida uma solução com duas fases: um sobrenadante transparente e um precipitado branco como na Figura 4.2. Os parâmetros utilizados nas sínteses das nanopartículas com o ácido ascórbico pela metodologia I se encontram na Tabela 4.3.

Tabela 4. 3: Parâmetro utilizado na síntese de nanopartículas com ácido ascórbico pela metodologia I.

Nome	Amido	Quant. AG	Temp. AG
AGAAL_AA_31_I	3001	10,7 g	27°C

* Cada letra e número do nome da amostra significa uma informação da síntese. No primeiro campo, as duas primeiras letras (AG) significam *amido gelatinizado*, a terceira (A) letra significa a temperatura: *ambiente* e a quarta e quinta (AL) letras significam *agitação lenta*. O segundo campo (AA) significa *ácido ascórbico*. O número 3, no terceiro campo é o tipo de amido, *3001*, o número 10 significa a quantidade de amido usado na síntese, 10,7g de amido, e o símbolo (I) significa *metodologia I*.

4.3.2 Metodologia II

A fim de obter a incorporação do fármaco nas nanopartículas, 0,25g do ácido ascórbico (AA) foi dissolvido em 20 ml de etanol sob agitação constante e então 1 ml de amido gelatinizado em temperatura ambiente foi adicionado, gota a gota. A solução ficou em agitação magnética constante de 500 rpm por 16h. No final do procedimento, também é obtida uma solução com duas fases: um sobrenadante transparente e um precipitado branco como na Figura 4.2. Os parâmetros utilizados nas sínteses das nanopartículas com o ácido ascórbico se encontram na Tabela 4.4.

Tabela 4. 4: Parâmetros utilizados nas sínteses de nanopartículas com ácido ascórbico pela metodologia II.

Nome	Amido	Quant. AG	Temp. AG
AGAAL_AA_310_II	3001	10,7 g	27°C

* Cada letra e número do nome de cada amostra significa uma informação da síntese. No primeiro campo, as duas primeiras letras (AG) significam *amido gelatinizado*, a terceira (A) letra significa a temperatura: *ambiente* e a quarta e quinta (AL) letras significam *agitação lenta*. O segundo campo (AA) significa *ácido ascórbico*. O número 3, no terceiro campo é o tipo de amido, *3001*, o número 10 significa a quantidade de amido usado na síntese, 10,7g de amido, e o símbolo (II) significa *metodologia II*.

Para as análises o procedimento utilizado para o preparo das amostras é o mesmo utilizado no item 4.1.

De modo a comparar as duas metodologias usadas neste trabalho, foi realizada uma síntese de cada procedimento, amostras AGAAL_AA_310_I e AGAAL_AA_310_II, e armazenadas em refrigeração por oito meses e então foram analisadas no MET. Pela metodologia I, o ácido ascórbico foi dissolvido no etanol que é adicionado na solução polimérica, já com a primeira adição de etanol, quando em temperatura ambiente. Na metodologia II, o ácido ascórbico é dissolvido no etanol e então é adicionado 1 ml da solução polimérica.

4.4 Síntese dos filmes com nanopartículas de amido

Através do precipitado da solução das nanopartículas, obtido pela Metodologia II, foi possível fazer filmes com nanopartículas de amido de milho por *"casting"*. Para que a solução tenha bastante precipitado a proporção de amido gelatinizado e etanol foi aumentada. Foi adicionado 50 ml de amido gelatinizado em temperatura ambiente, gota a gota, em 200ml de etanol em agitação magnética constante de 500 rpm por 30 min.

Após a separação das fases da solução, 30 ml do precipitado foi despejado em uma placa de petri, com 10 cm de diâmetro. Os filmes foram secos em estufa à 50°C por 16h e armazenados na própria placa de petri para posteriores análises. Foram sintetizados filmes mudando a concentração de amido e filme com ácido ascórbico. As condições de sínteses dos filmes utilizadas se encontram na Tabela 4.5.

Tabela 4. 5: Parâmetros utilizados para as sínteses dos filmes.

Nome	Amido	Quant. AG	Tempo
F_310	3001	10.7 g	30 min
FAA_310			16h
F_35		5g	30 min
F_31		1g	30 min

* Cada letra e número do nome de cada amostra significa uma informação da síntese. No primeiro campo, as duas primeiras letras (F ou FAA) significam *filme de amido* ou *filme de amido com ácido ascórbico*. No segundo campo, o primeiro número (3) significa amido *3001* e o seguinte (10, 5 ou 1) significam a quantidade de amido na síntese, *10.7g, 5g ou 1g*.

Para as análises os filmes foram cortados, 1 x 1 cm, e analisados no MEV, FTIR, DRX, AFM e MET, sem recobrimento de ouro ou de carbono.

4.5 Caracterização das nanopartículas de amido e dos filmes

Os materiais obtidos foram caracterizados por Microscopia de Força Atômica (AFM), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourrier (FTIR) e Difração de Raio-X (DRX)..

4.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) permitiu obter informações como formato e tamanho das nanopartículas e características da superfície dos filmes. Desta forma, para a análise das nanopartículas foram utilizados pedaços de silício com a solução seca em sua superfície, como descrito no item 4.4. Para a análises dos filmes, foram utilizados pedaços de 1cm x 1cm fixados em um porta amostra com fita carbono. Todas as amostras não foram recobertas com ouro ou carbono e foram analisadas no microscópio FEI Helios Nanolab DualBean (JSM 6460 LV) do Núcleo de Microscopia da Divisão de Materiais do INMETRO. As condições utilizadas foram 1kV e 13pA para

as nanopartículas e 700kV e 13pA para os filmes. Através das micrografias, o diâmetro das partículas foi determinado utilizando o programa Image J.

4.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) permitiu obter informações como tamanho de partículas e estrutura das nanopartículas. Desta forma, para a análise das nanopartículas foi pingado 20µl do sobrenadante da solução em um grid de cobre com filme de carbono e foi seco a vácuo, como foi descrito no item 4.4. As amostras foram analisadas no microscópio Fei Tecnai, a 120kV do Núcleo de Microscopia da Divisão de Materiais do INMETRO. Através das micrografias, o diâmetro das partículas foi determinado utilizando o programa Image J.

4.5.3 Microscopia de Força Atômica

A Microscopia de Força Atômica (AFM) permitiu a obtenção das alturas das NPs através do AFM JPK™ (JPK Instruments AG, Colditzstr, Berlin, Alemanha), modelo NanoWizard® 1, por varredura no modo intermitente. O AFM também foi utilizado para analisar a morfologia da superfície dos filmes e as alturas das partículas presentes nos filmes. O equipamento utilizado foi do Laboratório de Engenharia de Superfícies, COPPE/UFRJ. Através das imagens, a altura das partículas foi determinada utilizando o programa Gwyddion.

4.5.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

A espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier foi usada para obter espectros de absorção do filme puro e com o AA de forma a determinar se houve alterações nas ligações químicas (YOON, 2013). Para a realização da análise, foi utilizado o equipamento Thermo Scientific Nicolet ™ 6700 (Thermo Scientific Instruments Corporation, Madison, WI, USA) do Laboratório Multi Usuário da COPPE/UFRJ. As amostras foram medidas em modo de refletância total atenuada (ATR) com cristal de seleneto de zinco (ZnSe) e os espectros foram medidos em um intervalo de 4000 – 550 cm^{-1} por acumulação de 128 scans e com 2cm^{-1} da resolução.

4.5.5 Difração de Raio-X

A difração de Raios X foi utilizada para estudar a cristalinidade dos filmes puros e também para confirmar a eficiência de encapsulamento do fármaco, devido à ausência dos picos de difração do fármaco cristalino, confirmando o encapsulamento. (SOUZA *et al.,* 2015). Foi utilizado um difratômetro (XRD–6000 Shimadzu diffractometer, Japan) com radiação CuKα do Laboratório Multi Usuário da COPPE/UFRJ. Os dados foram tomados numa região de 10° - 80° de ângulo de difração com varredura de 0,02° min^{-1} e um tempo de contagem de 1s por passo. A tensão e a corrente aplicada da fonte de Raios-X foi de 30 kV e 30 mA, respectivamente.

5. RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os principais que permitiram a caracterização das nanopartículas e dos filmes de amido com uso da microscopia eletrônica de varredura e de transmissão e da microscopia de força atômica.

Além das nanopartículas de amido, foram desenvolvidos métodos de preparação de filmes produzidos a partir do precipitado da síntese de nanopartículas de amido por nanoprecipitação. Também com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica, da espectroscopia de infravermelho e de difração de raios-X avançamos na caracterização dos filmes.

5.1 Caracterização das nanopartículas de amido

5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens obtidas no MEV foram muito úteis numa primeira análise das amostras produzidas. As micrografias da Figura 5.1 ilustram as nanopartículas sintetizadas baseada na metodologia I e II. Observa-se que quando é adicionado o álcool no amido gelatinizado existe a formação de grandes aglomerados e de resíduos de polímeros que não foram particulados, ver Figura 5.1 (a). Por outro lado, quando se adiciona o amido gelatinizado no álcool observa-se a formação de algumas partículas de diâmetro de 35 a 50 nm e a formação de aglomerados e resíduos foi um pouco menor, como pode ser visto na Figura 5.1 (b).

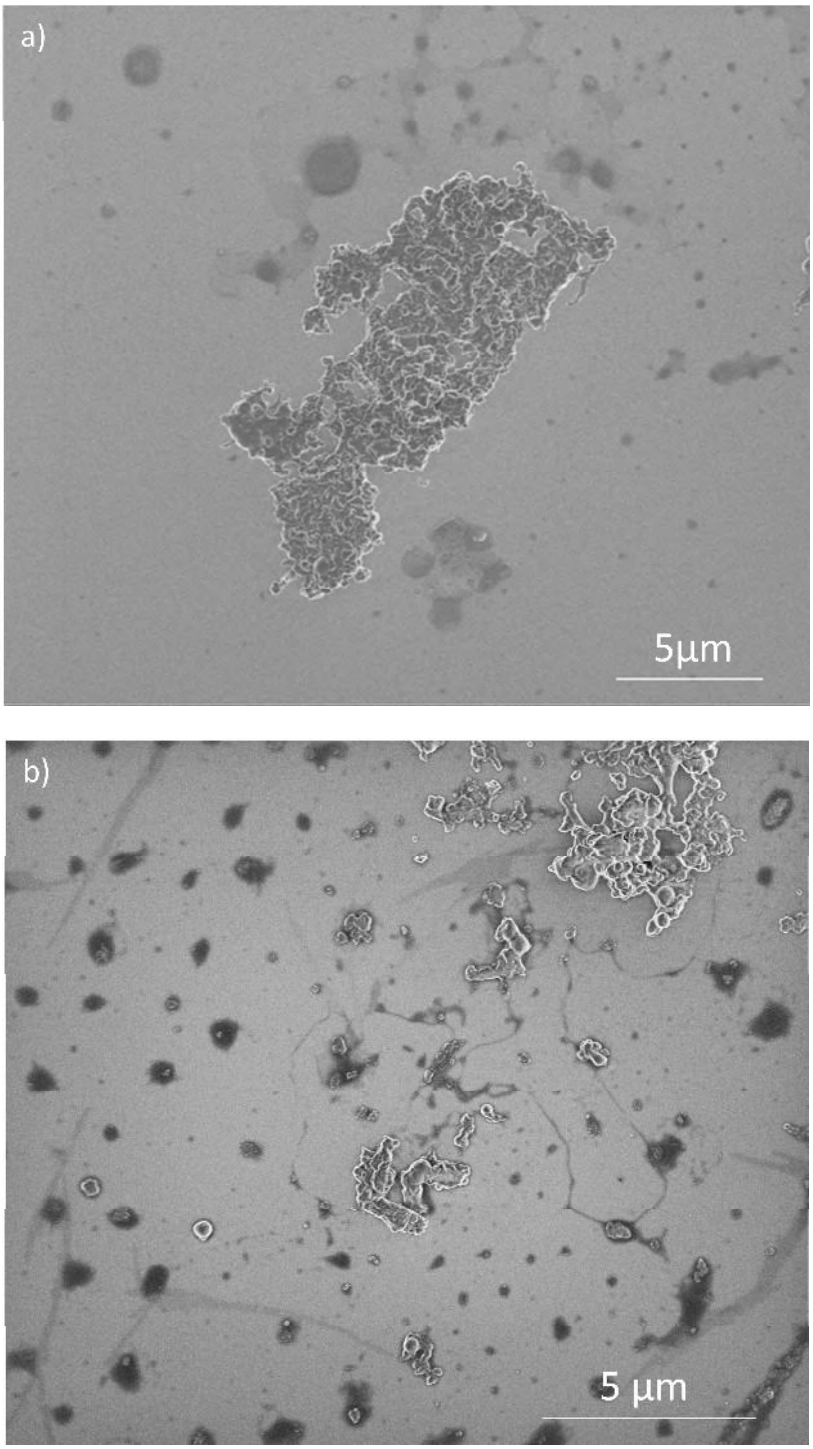
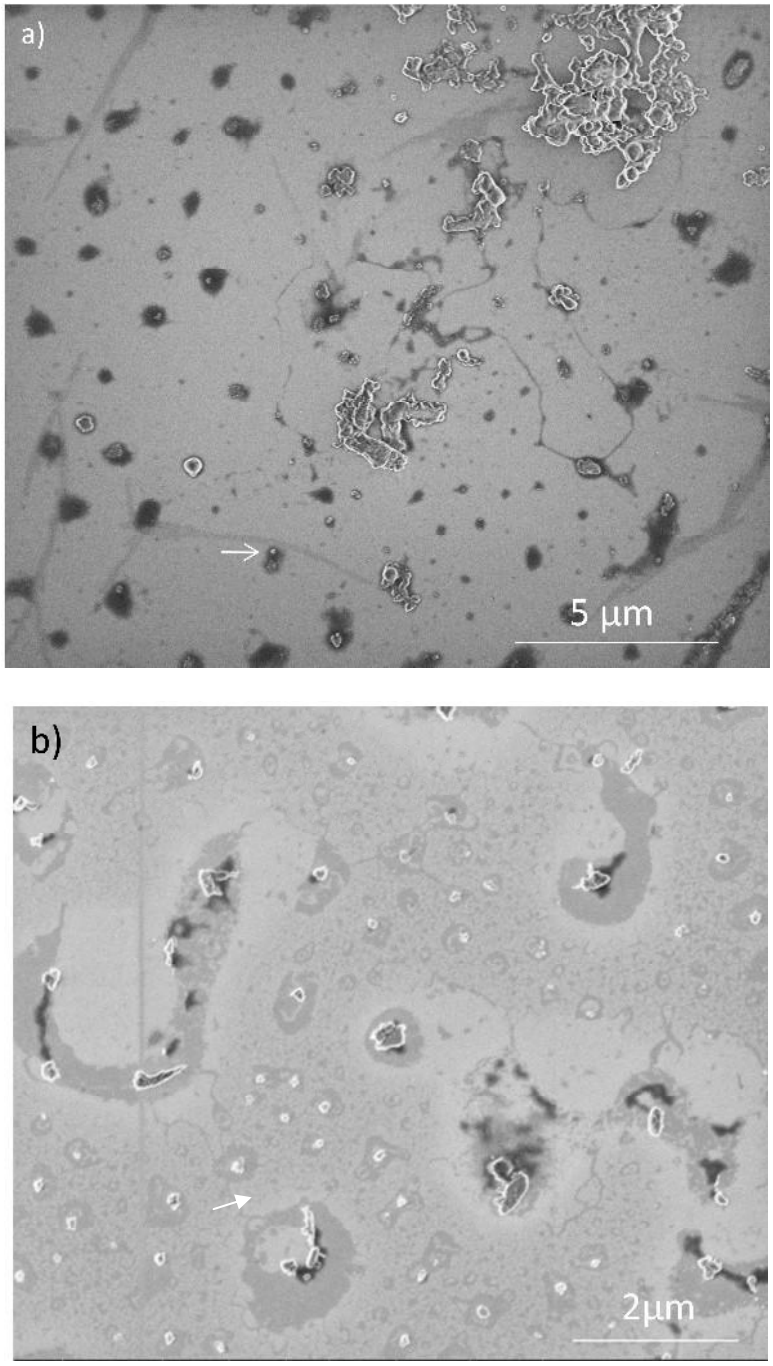


Figura 5. 1: Imagens por MEV das nanopartículas de amido sintetizadas pela (a) metodologia I (AGAAR_310_I) e pela (b) metodologia II (AGAAR_310_II).

Das várias preparações das amostras foi possível verificar que ao diminuir a concentração de amido na síntese a taxa de produção de nanopartículas aumentou e a quantidade de resíduos e aglomerados diminui. Esses resultados podem ser vistos nas micrografias de MEV da Figura 5.2, onde foram sintetizadas nas mesmas condições:

amido gelatinizado em temperatura ambiente e velocidade de agitação rápida, variando somente a quantidade de amido. Esses resultados estão de acordo com modelos que afirmam que ao diminuir a concentração do polímero, haverá uma menor quantidade de polímero por gota de amido gelatinizado, diminuindo a chance das moléculas colidirem durante a nanoprecipitação, favorecendo a nucleação e não o crescimento das partículas (MILADI, 2016).



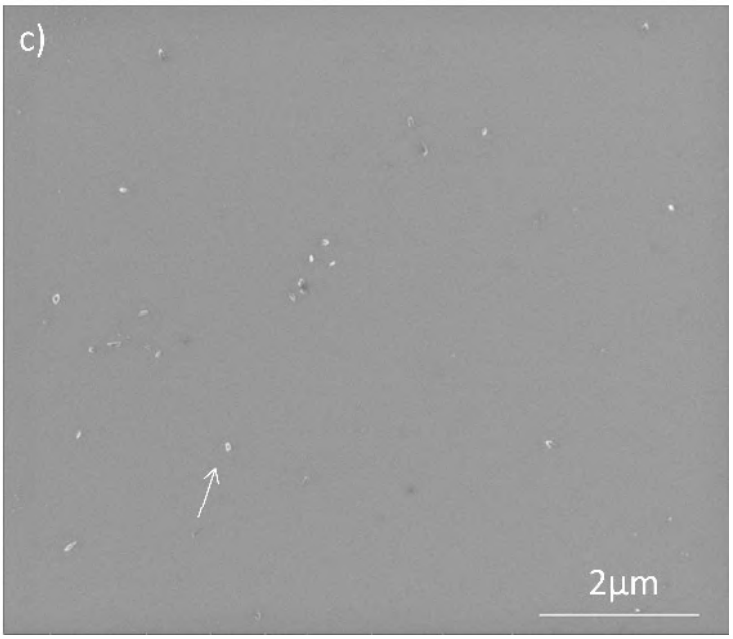


Figura 5. 2: Micrografias por MEV das sínteses das nanopartículas de amido com diferentes concentrações de amido. Síntese com (a) 10,7g de amido - AGAAR_310; (b) 5g de amido - AGAAR_35; e (c) 1g de amido - AGAAR_31. Nas micrografias uma partícula foi identificada com uma seta para melhor visualização.

Com a variação da temperatura do amido gelatinizado, de 95° para 25°C, e da velocidade de agitação, 500 rpm para 1000 rpm, na nanoprecipitação, diferentes partículas tanto com formatos circulares e hexagonais, quanto com tamanhos diferentes, de 35nm até 550 nm, foram obtidas, o que pode ser observado nas micrografias da Figura 5.3 a 5.5. O aumento da temperatura do amido gelatinizado leva a um aumento da agitação molecular, aumentando a chance das moléculas poliméricas colidirem durante a síntese formando nanopartículas maiores e até mesmo aglomerados. Já o aumento da velocidade da agitação está relacionado à taxa de difusão da água no álcool. Quanto maior a velocidade de agitação, maior é a taxa de difusão e menor são as partículas formadas. Nas Tabelas 5.1 a 5.3 encontram-se o tamanhos médios das partículas encontradas em cada síntese.

Na síntese das nanopartículas com 10,7g de amido, foram observados grandes aglomerados e resíduos de amido gelatinizado que não foi particulado. Apesar disso, partículas circulares foram formadas, mas em pouca quantidade. O tamanho das partículas diminuiu devido a diminuição da concentração de amido na síntese, Figura 5.3.

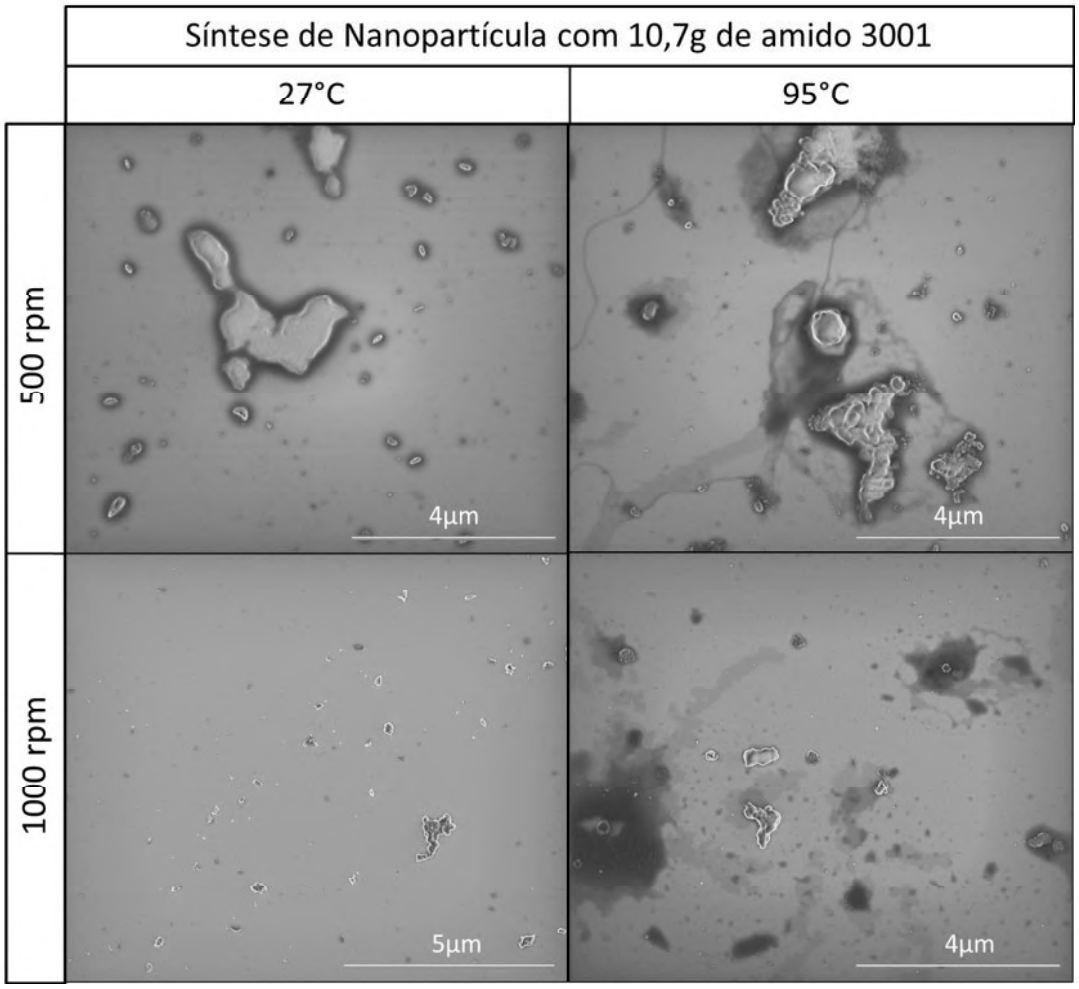


Figura 5. 3: Micrografia por MEV das nanopartículas de amido obtidas na síntese com 10,7g de amido 3001 pela metodologia II. (a) AGQAR_310, (b) AGQAL_310, (c) AGAAR_310 e (d) AGAAL_310.

Tabela 5. 1: Tamanho médio das partículas formadas pela síntese com 10,7g de amido 3001.

Síntese com 10,7g de amido 3001				
Forma da partícula	95°C		27°C	
	500 rpm	1000 rpm	500 rpm	1000 rpm
Circular	50 nm	46 nm	41 nm	35 nm

O uso de 5g de amido na síntese das nanopartículas levou a formação de partículas hexagonais e partículas circulares, como pode ser observado na Figura 5.4.

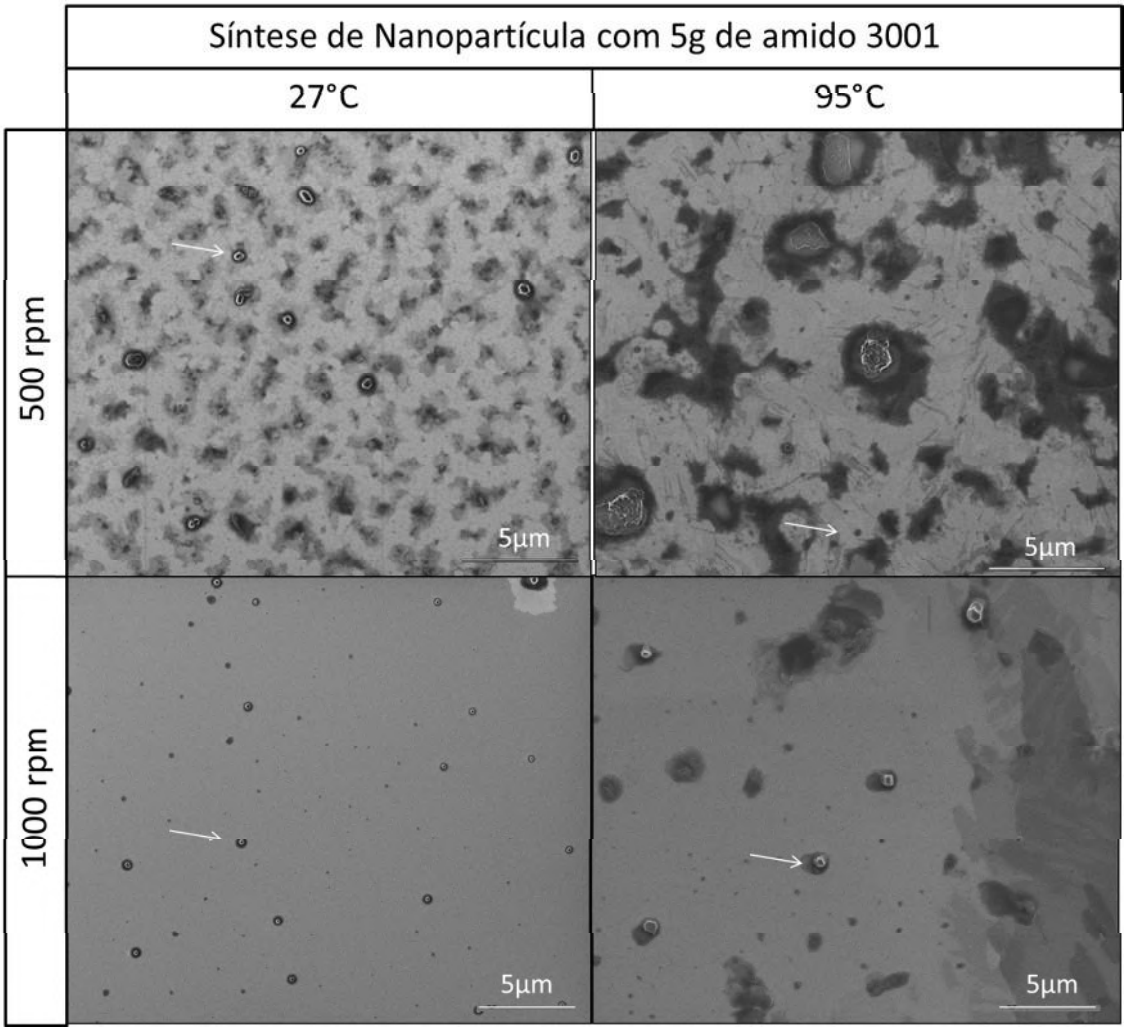


Figura 5. 4: Micrografia por MEV das nanopartículas de amido obtidas na síntese com 5g de amido 3001 pela metodologia II. (a) AGQAR_35, (b) AGQAL_35, (c) AGAAR_35 e (d) AGAAL_35.

Tabela 5. 2: Tamanho médio das partículas formadas pela síntese com 5g de amido 3001.

Síntese com 5g de amido 3001				
Forma da partícula	95°C		27°C	
	500 rpm	1000 rpm	500 rpm	1000 rpm
Hexagonal	470 nm	440 nm	300 nm	200 nm
Circular	120 nm	50 nm	45 nm	30 nm

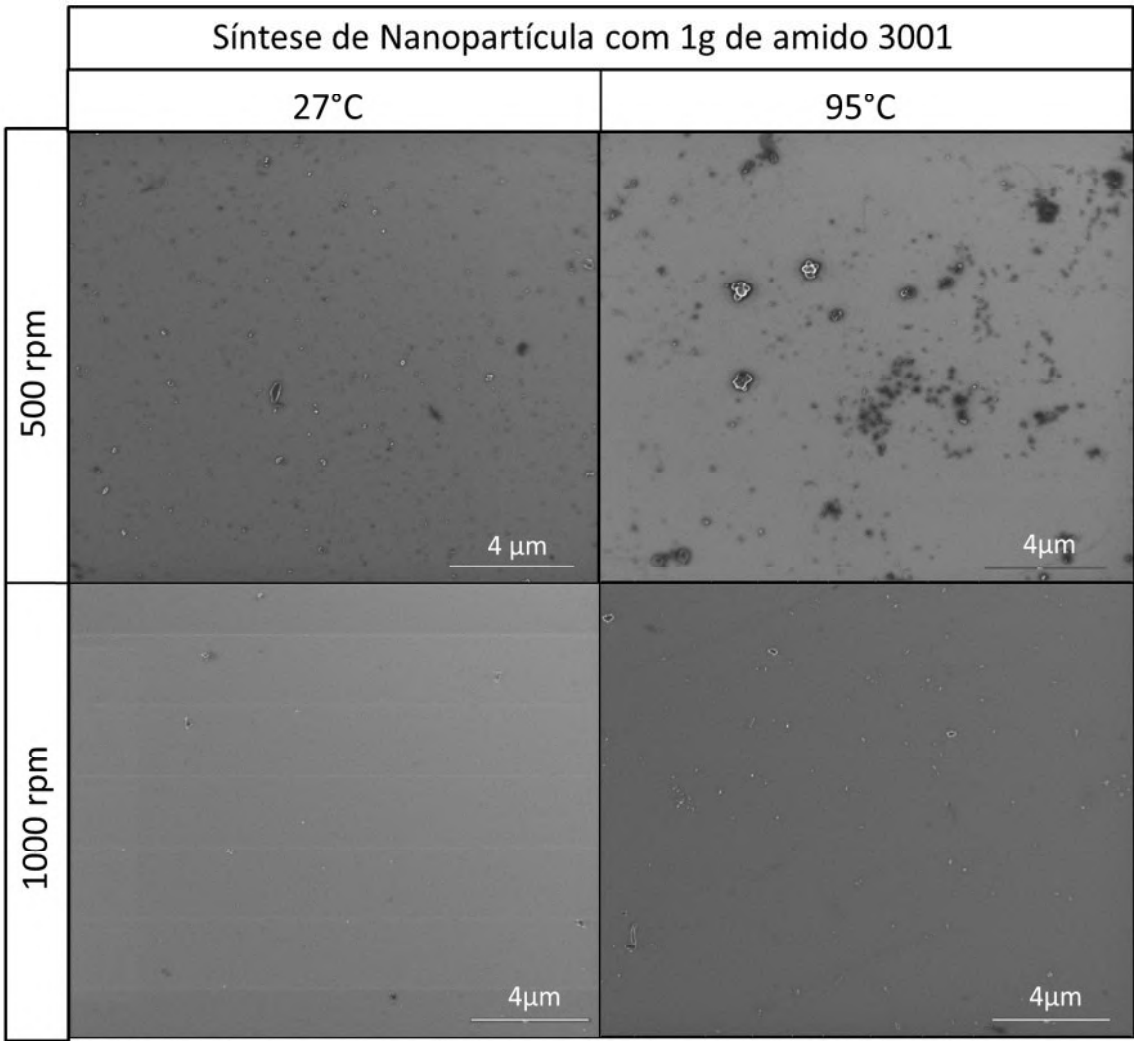


Figura 5. 5: Micrografia por MEV das nanopartículas de amido obtidas na síntese com 1g de amido 3001 pela metodologia II. (a) AGQAR_31, (b) AGQAL_31, (c) AGAAR_31 e (d) AGAAL_31.

Tabela 5. 3: Tamanho médio das partículas formadas pela síntese com 1g de amido 3001.

Síntese com 1g de amido 3001				
Forma da partícula	95°C		27°C	
	500 rpm	1000 rpm	500 rpm	1000 rpm
Circular	120 nm	95 nm	60 nm	35 nm

Foi muito interessante observar que a síntese das nanopartículas de amido com o amido 4001 levou a formação de partículas com formato hexagonal e retangular. Os tamanhos médios das partículas se encontram na Tabela 5.4. Nessa síntese também foi

observado uma maior taxa de produção de partículas ao usar o amido gelatinizado em temperatura ambiente e com uma agitação magnética rápida, 1000 rpm, ver Figura 5.6 (c). Nessas condições observamos também que as quantidades de resíduos e de aglomerados diminuíram. Apesar de não aparecer em todas as imagens da Figura 5.6, todas as condições de síntese levaram a formação de agulhas, como pode ser visto na Figura 5.6 (a) e (d).

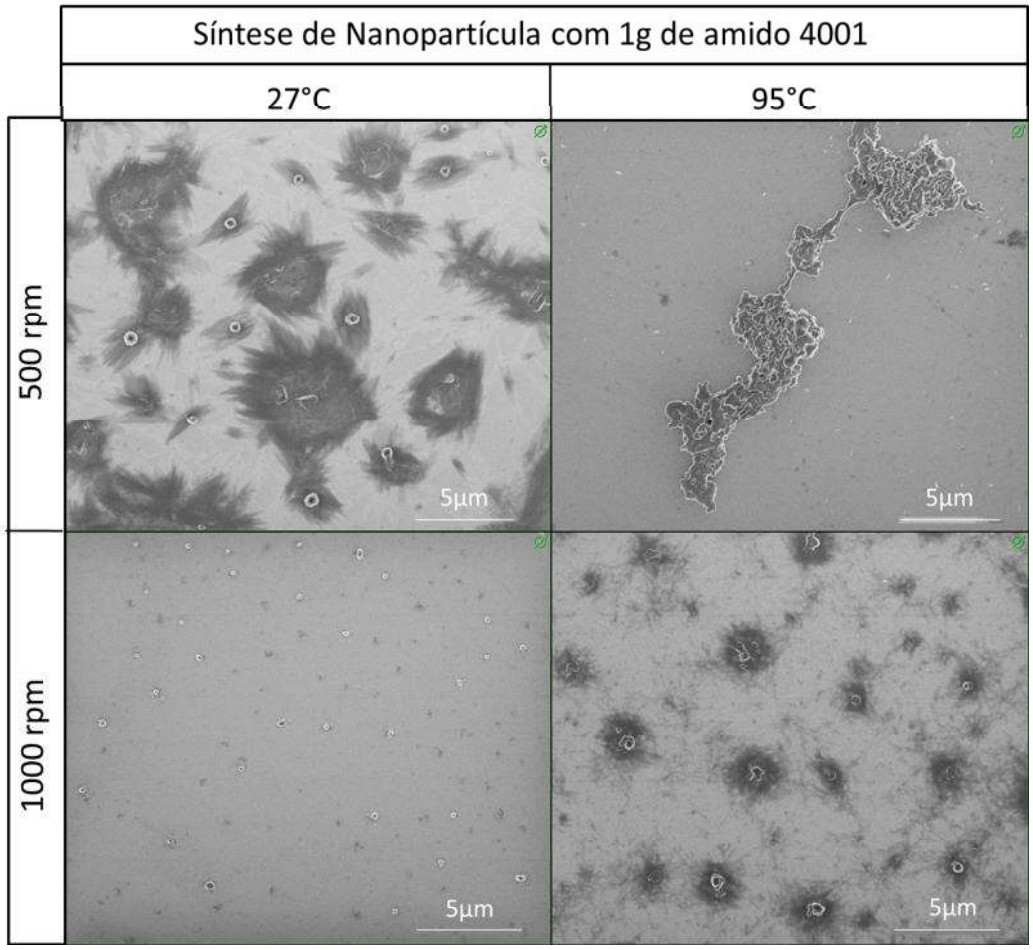


Figura 5. 6: Imagens por MEV das nanopartículas obtidas nas sínteses em diferentes condições com 1g de amido 4001. (a) AGQAR_41, (b) AGQAL_41, (c) AGAAR_41 e (d) AGAAL_41.

Tabela 5. 4: Tamanho médio das partículas formadas pela síntese de 1g de amido 4001.

Síntese com 1g de amido 4001				
Forma da Partícula	95°C		27°C	
	500 rpm	1000 rpm	500 rpm	1000 rpm
Hexagonal	-	-	400 nm	300 nm
Retangular	-	550 nm	450 nm	200 nm
Circular	120 nm	90 nm	60 nm	55 nm

5.1.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Através do MET foi possível obter mais detalhes do processo de formação das partículas. Observou-se, por exemplo, que a síntese com maior quantidade de amido produziu partículas ocas em resíduo de amido, tal como ilustrado na Figura 5.7. As partículas ocas apresentam um tamanho de 30 nm com uma casca de 10 nm. Com 5g de amido observou-se a formação de partículas hexagonais de 260 nm e aglomerados, Figura 5.8. Ao utilizar 1g de amido na síntese, observou-se uma tendência de formação de partículas aglomeradas, ver Figura 5.9. Todas as amostras analisadas foram sintetizadas nas mesmas condições: temperatura do amido gelatinizado, em temperatura ambiente, e velocidade de agitação magnética de 1000 rpm pela metodologia II.

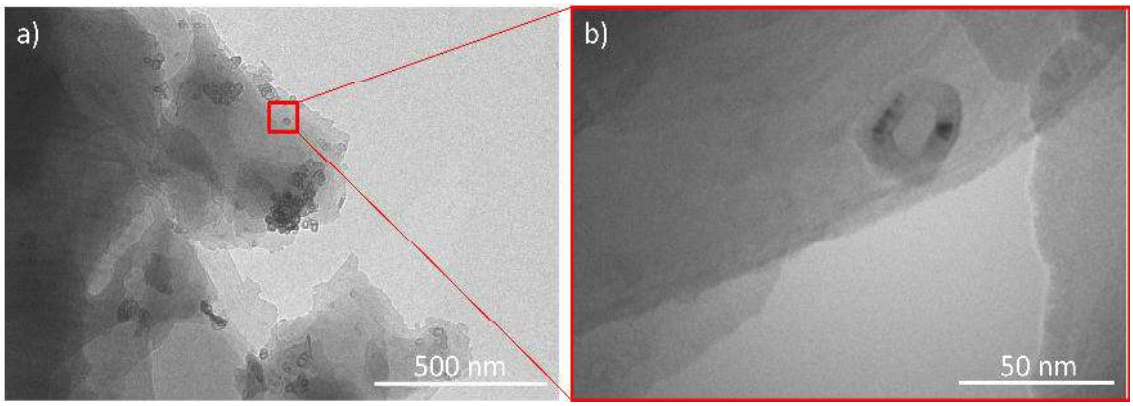


Figura 5. 7: Micrografia por MET da síntese de nanopartículas de amido com 10,7g de amido 3001 (a) e um aumento de umas das partículas (b) (AGAAR_310).

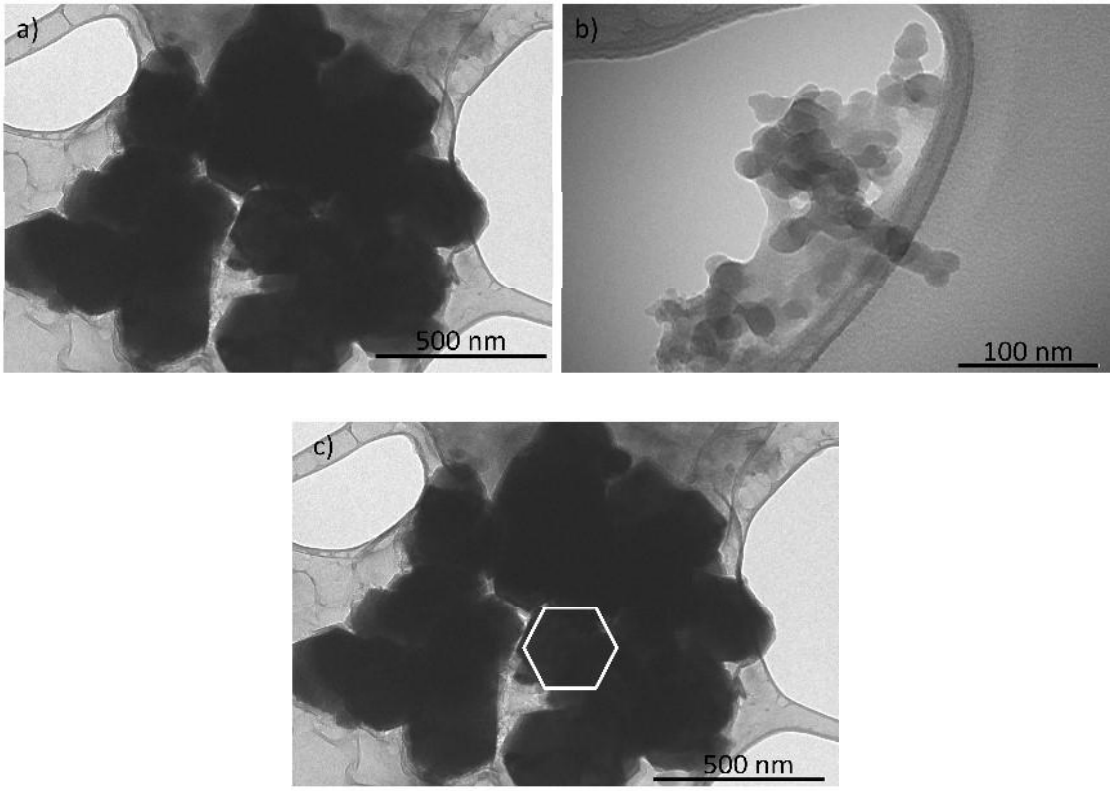


Figura 5. 8: Micrografia por MET da síntese de nanopartículas de amido com 5g de amido 3001. Observaram-se partículas com formatos hexagonais (a), aglomerados (b) e um destaque da partícula hexagonal (c) (AGAAR_35).

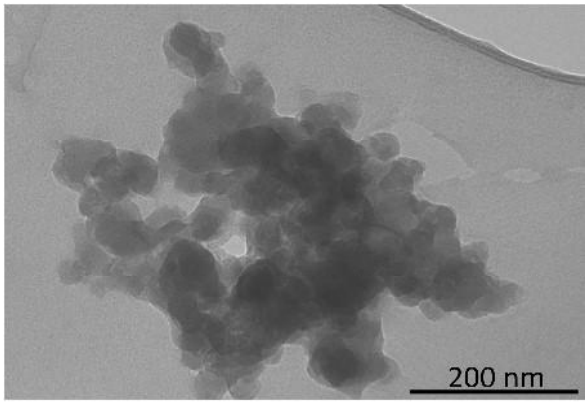


Figura 5. 9: Micrografia por MET da síntese de partículas de amido com 1g de amido 3001 (AGAAR_31).

Outra via mais rica na formação das partículas constou da síntese das nanopartículas com 1g do amido 4001, onde foi observada a formação de aglomerados de partículas com formatos arredondados e partículas com formato hexagonal e

retangular de tamanho de 145 nm e 64x88 nm, respectivamente, como pode ser observado na Figura 5.14. Não é muito claro o que induz tal geometria nas partículas, no entanto, a seleção da geometria pode, eventualmente, ser útil na função de carreador de fármacos. As condições de síntese foram as mesmas das amostras anteriores, amido gelatinizado em temperatura ambiente e com velocidade de agitação de 1000 rpm.

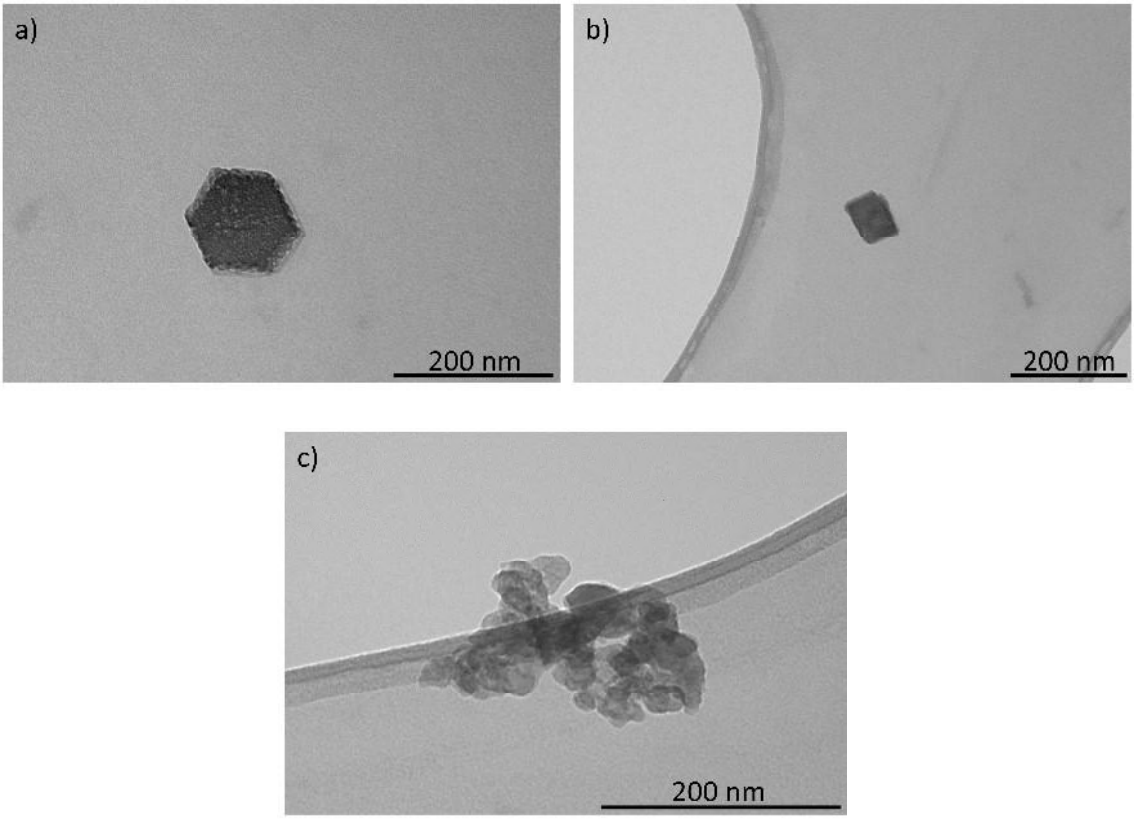


Figura 5. 10: Micrografia por MET da síntese de nanopartículas de amido com 1g de amido 4001 (AGAAR_41). Observaram-se partículas com formatos hexagonais (a), retangulares (b) e aglomerados de partículas com formatos arredondados.

5.1.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Outra microscopia utilizada foi a de força atômica, que possibilita, obter a altura das partículas. Através do AFM se observou que ao diminuir a concentração de amido de 10,7g para 1g na síntese, as partículas formadas são menores e também houve uma menor quantidade de resíduos de amido e aglomerados, como podem ser visto nas micrografias da Figura 5.11. O mesmo foi observado na Figura 5.1 obtida pelo MEV. É interessante notar que o uso do amido 4001 na síntese levou a formação de partículas

com diferentes alturas, ver Tabela 5.6, e sem presença de resíduo. Devido ao limite de resolução do MEV e a não deposição de uma camada metálica sobre as amostras, as partículas menores só puderam ser observadas pelo AFM. As amostras analisadas apresentaram as mesmas condições de síntese, com o amido gelatinizado em temperatura ambiente e a velocidade de agitação de 1000 rpm.

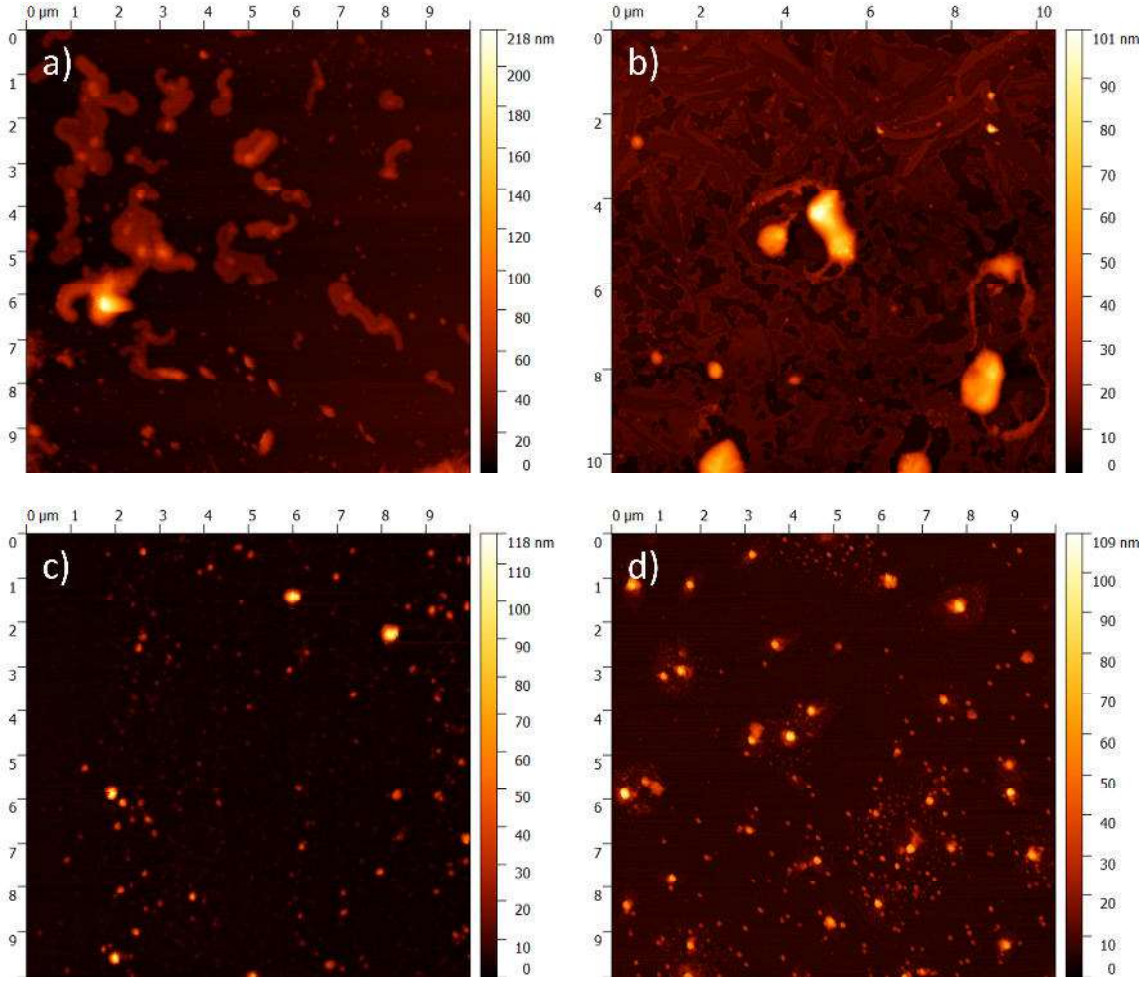


Figura 5. 11: Imagens por AFM das partículas das sínteses em diferentes concentrações de amido 3001 (a) 10.7g de amido – AGAAR_310, (b) 5g de amido – AGARR_35, (c) 1g de amido – AGAAR_31 e (d) 1g de amido – AGAAR_41.

Por outro lado, ao utilizar o amido gelatinizado em temperatura ambiente ou quente, e com uma velocidade de agitação lenta ou rápida durante a síntese, diferentes tamanhos de partículas foram obtidas, ver Tabela 5.5, e podem ser observados nas imagens das Figuras 5.12 a 5.14. Observa-se que a maior taxa de formação de partículas, de 5 nm a 25 nm, foi obtida utilizando 1g de amido com o amido

gelatinizado em temperatura ambiente e com velocidade de agitação rápida. Na síntese das nanopartículas de amido com 10,7g de amido levou a formação de nanopartículas com valores de altura variando entre 15 nm a 60 nm e muitos resíduos de amido. Já na síntese das nanopartículas com 5g de amido, as nanopartículas de amido apresentaram um tamanho entre 7 nm a 30 nm e presença de fibras e resíduos de amido. De fato, esses resultados também foram observados no MEV, Figura 5.3 a 5.5.

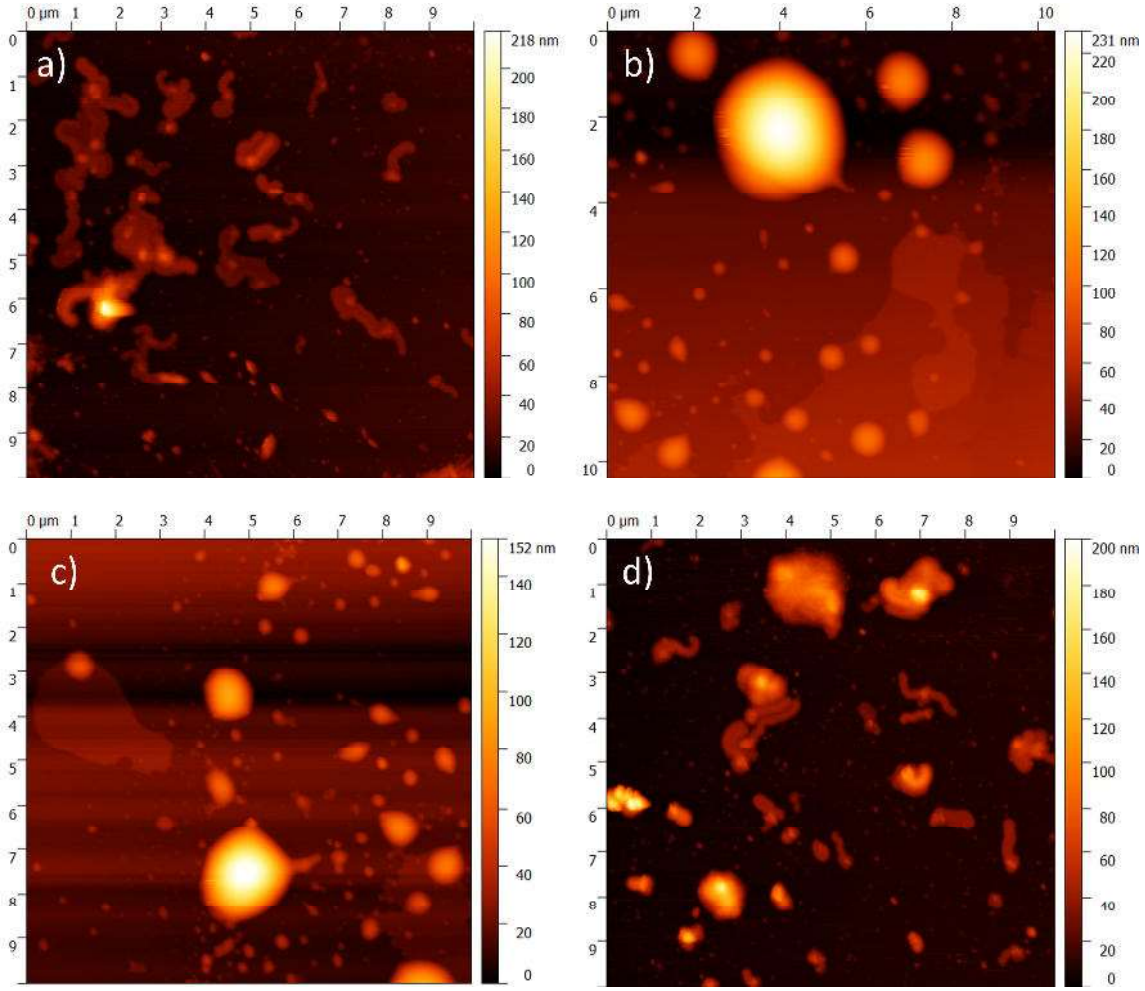


Figura 5. 12: Imagens por AFM das nanopartículas das sínteses em diferentes condições e com concentração de 10.7g de amido 3001. As condições são (a) AGQAR, (b) AGQAL, (c) AGAAR, (d) AAQAL e o (e) histograma com a altura da nanopartícula da amostra AGAAR_310.

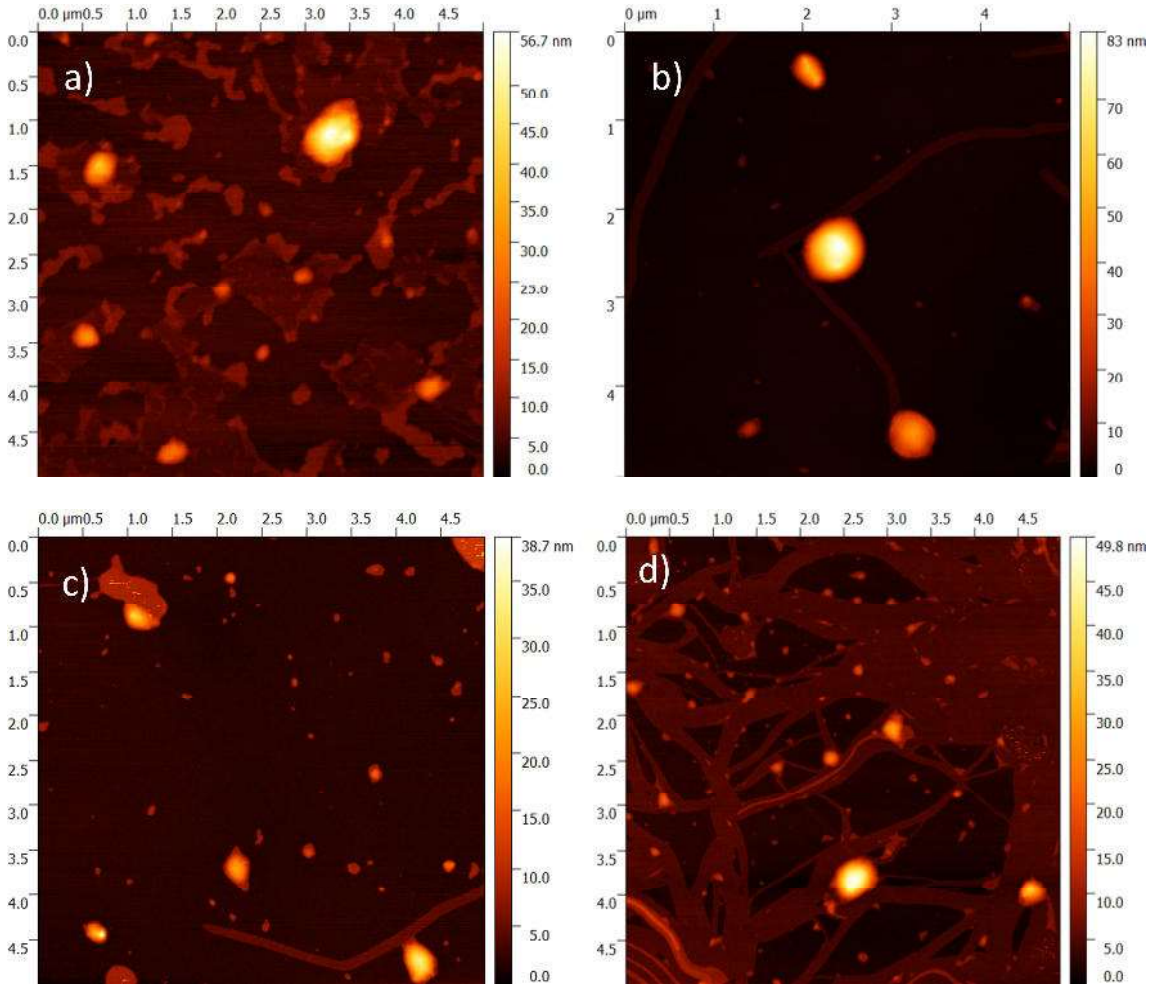


Figura 5. 13: Imagens por AFM das nanopartículas das sínteses em diferentes condições e com concentração de 5g de amido 3001. As condições são (a) AGQAR, (b) AGQAL, (c) AGAAR e (d) AGAAL.

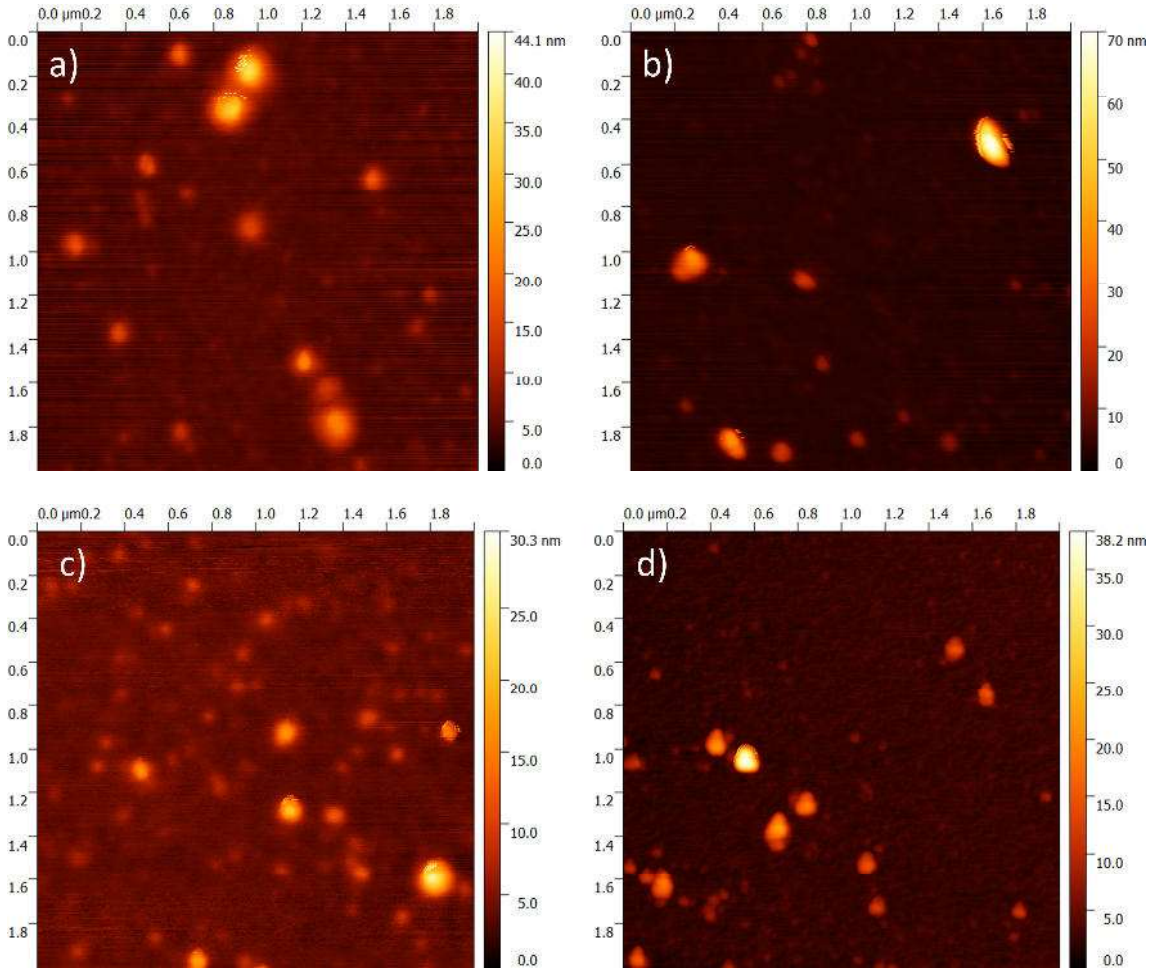


Figura 5. 14: Imagens por AFM das nanopartículas das sínteses em diferentes condições e com concentração de 1g de amido 3001. As condições são (a) AGQAR, (b) AGQAL, (c) AGAAR e (d) AGAAL.

Tabela 5. 5: Altura média das partículas formadas nas sínteses obtidas com o amido 3001.

	95°C		27°C	
	500 rpm	1000 rpm	500 rpm	1000 rpm
10,7g de amido	30 – 130 nm	20 – 100 nm	20 – 70 nm	15 - 60 nm
5g de amido	8 – 70 nm	8 – 50 nm	7 – 40 nm	7 – 30 nm
1g de amido	7 – 50 nm	7 – 40 nm	5 – 30 nm	5 – 25 nm

Já o uso do amido 4001 na síntese das nanopartículas permitiu obter alta taxa de produção de partículas com diferentes alturas, de 20 a 70 nm. Tanto com o amido gelatinizado quente ou temperatura ambiente e com velocidade de agitação lenta, 500 rpm, apresentou resíduos. No entanto, com a agitação rápida, 1000 rpm, não se observou resíduos, (Figura 5.15). O que confirma os resultados observados nas imagens por MEV (Figura 5.6).

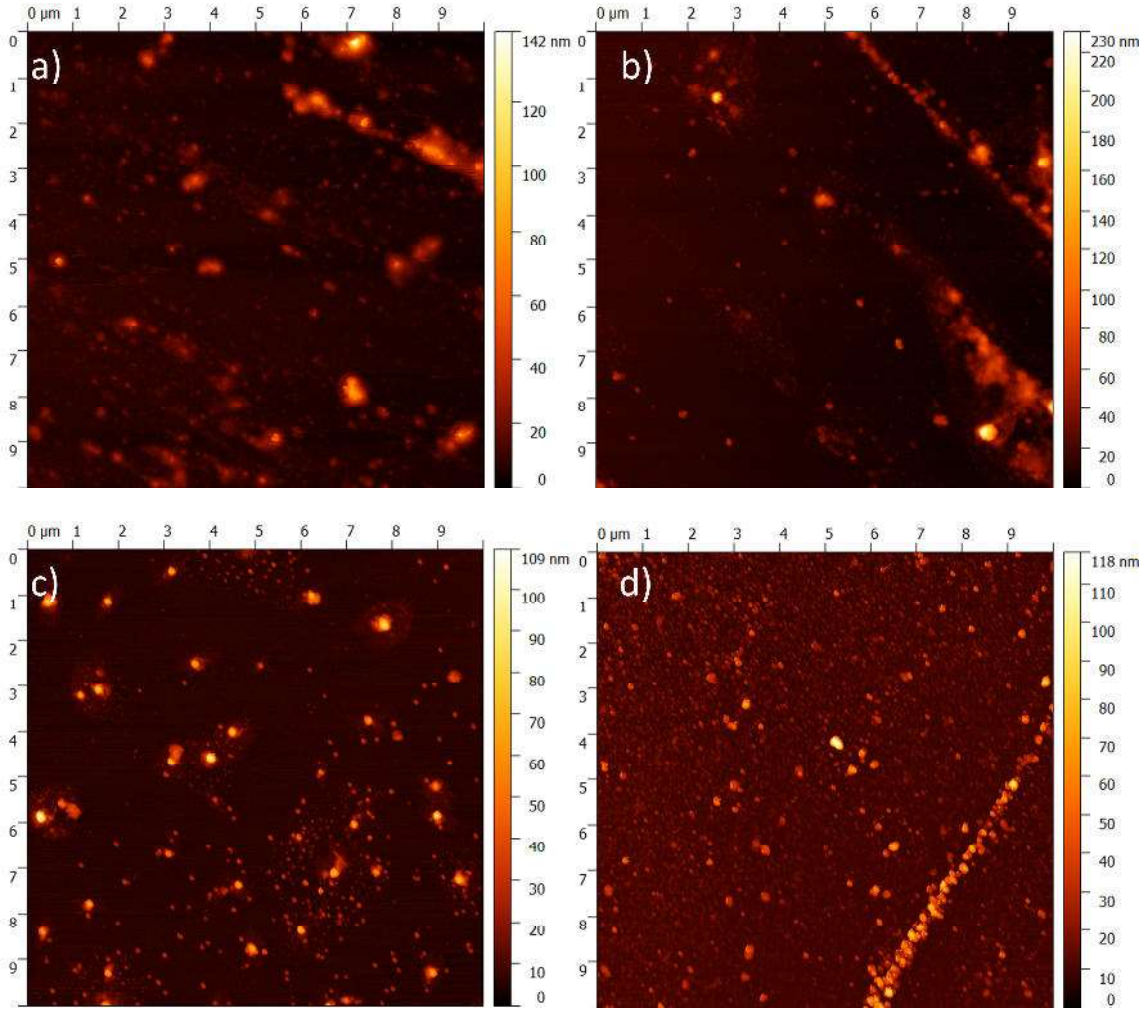


Figura 5. 15: Imagens por AFM das nanopartículas da síntese com concentração de 1g de amido 4001. As condições são (a) AGAAR, (b) AGAAL, (c) AGQAR e (d) AGQAL.

Tabela 5. 6: Altura média das partículas formadas nas sínteses obtidas com o amido 4001.

	95°C		27°C	
	500 rpm	1000 rpm	500 rpm	1000 rpm
1g de amido	22 – 120 nm	20 – 100 nm	20 – 90 nm	18 – 70 nm

5.2 Nanopartículas de amido com o fármaco

5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As nanopartículas sintetizadas com o ácido ascórbico apresentaram características diferentes das nanopartículas sintetizadas sem o fármaco. Na micrografia por MEV da Figura 5.16 observa-se nanopartículas, sintetizadas pela Metodologia II, com um formato arredondado e com um tamanho de 250 a 40 nm.

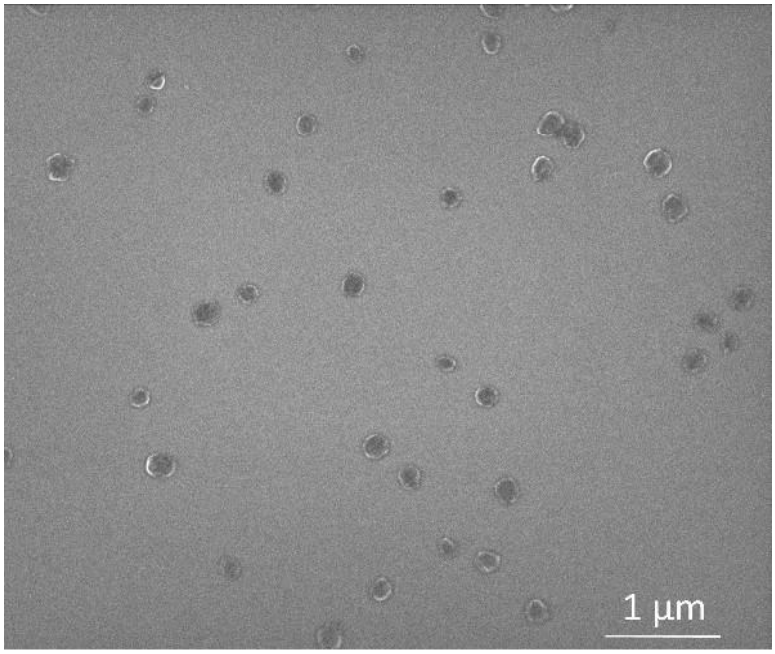


Figura 5. 16: Micrografia por MEV das nanopartículas com ácido ascórbico pela M etodologia II (AGAAL_AA_310).

Após oito meses de síntese das nanopartículas de amido com o ácido ascórbico, foram analisadas no MEV. Como pode ser observada na Figura 4.3 a síntese pela

metodologia I, apresentou uma coloração amarelada devido à oxidação do ácido ascórbico após os oito meses onde no primeiro dia não apresentava essa coloração. Essa mudança de cor, não aconteceu na amostra sintetizada pela metodologia II.

Figura 4. 3: Imagem das amostras das nanopartículas de amido com ácido ascórbico, após oito meses, sintetizada pela metodologia I (esquerda) e pela metodologia II (direita).

A síntese pela metodologia I, não pode ser observado pelo MEV. Como a solução apresentou muito ácido ascórbico livre, ao prepara a amostra formou-se uma película sobre a superfície do silício, dificultando a análise das partículas. Já pela metodologia II, observou muitas nanopartículas com um formato arredondado e de diferentes tamanhos, de 200 nm a 50 nm, como pode ser observado na Figura 5.7 (b).

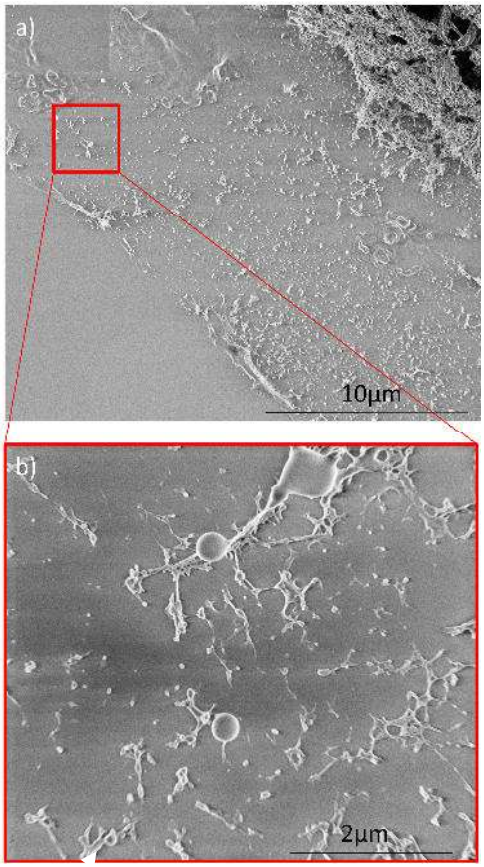


Figura 5. 17: Micrografia por MEV das nanopartículas de amido com ácido ascórbico sintetizadas após 8 meses pela metodologia II – AGAAL_AA_310 (a) e um aumento (b).

5.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Ao adicionar o ácido ascórbico na síntese das nanopartículas de amido, sintetizadas pela metodologia II, as nanopartículas apresentaram um tamanho maior, de 150 nm, do que as nanopartículas sem o fármaco, de 30 nm, e um formato arredondado, Figura 5.18. Essas micrografias de MET confirmam o que foi visto na micrografia de MEV, na Figura 5.16.

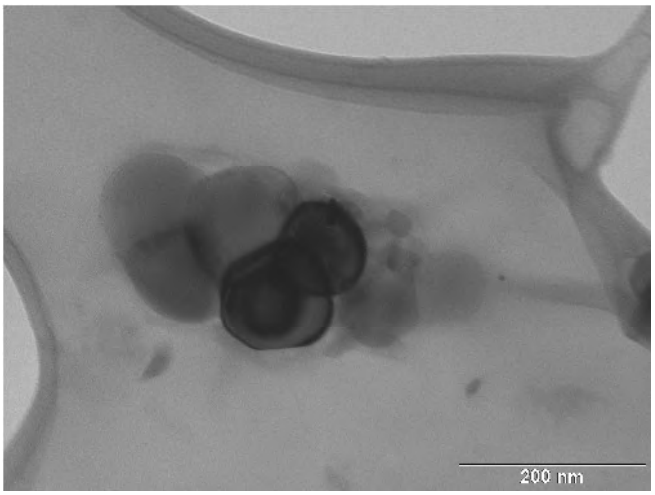


Figura 5. 18: Micrografia das nanopartículas de amido com ácido ascórbico sintetizadas pela metodologia II e com 10,7g de amido (AGAAL_AA_310).

Mudar a ordem de adição do não-solvente e da solução polimérica influenciou na formação das nanopartículas de amido com ácido ascórbico. As soluções de nanopartículas com ácido ascórbico foram analisadas após oito meses de síntese pelo MET e apresentaram uma diferença na quantidade de partículas e no seu tamanho, como pode ser observado na Figura 5.19. Nanopartículas de 6 nm podem ser observadas na síntese pela metodologia I. Observa-se que as nanopartículas sintetizadas pela metodologia II, apresentam tamanhos de 20 nm a 5 nm e com um formato arredondado.

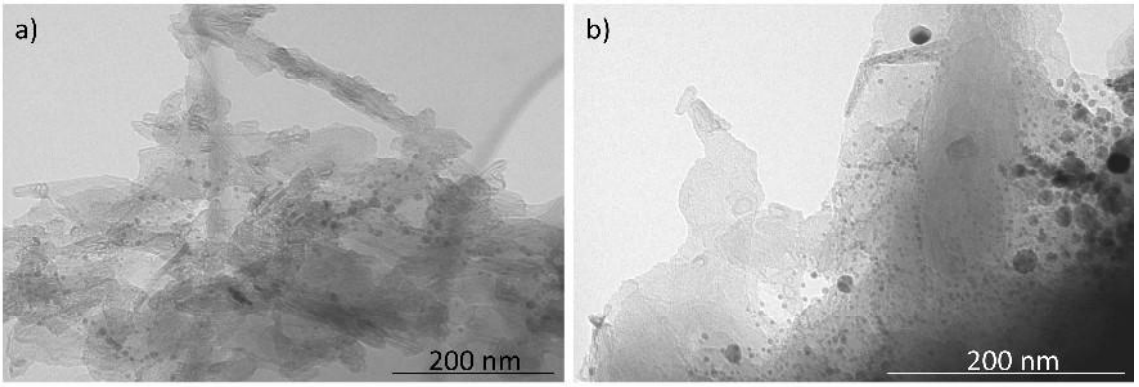


Figura 5. 19: Micrografia por MET das nanopartículas de amido com ácido ascórbico sintetizadas pela (a) metodologia I (AGAAL_AA_310_I) e pela (b) metodologia II (AGAAL_AA_310_II).

5.2.3 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Observa-se que a síntese das nanopartículas pela metodologia II, formou muitas partículas, Figura 5.20. As nanopartículas de amido com ácido ascórbico apresentaram partículas com altura de 5,5 nm a 25nm.

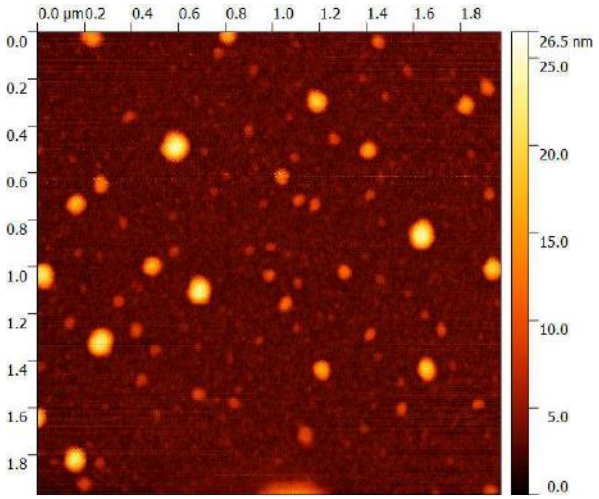


Figura 5. 20: Imagens por AFM das nanopartículas de amido com ácido ascórbico sintetizadas pela metodologia II.

5.3 Filmes de amido com nanopartículas

Na Figura 4.4 observa-se um pedaço de cada filme sintetizado. O filme com ácido ascórbico apresentou uma cor amarelada e os filmes sem o fármaco, são esbranquiçados. Com um paquímetro foi feita uma média das medidas das espessuras dos filmes. O filme com 10.7g de amido apresentou uma espessura de 148 µm. O filme com 5g de amido teve uma espessura de 123 µm e com 1g de amido, o filme teve 69 µm de espessura. Já o filme com o ácido ascórbico apresentou a maior espessura do que o filme sem o fármaco, 155 µm, bem mais rígido e mais quebradiço do que os outros filmes.

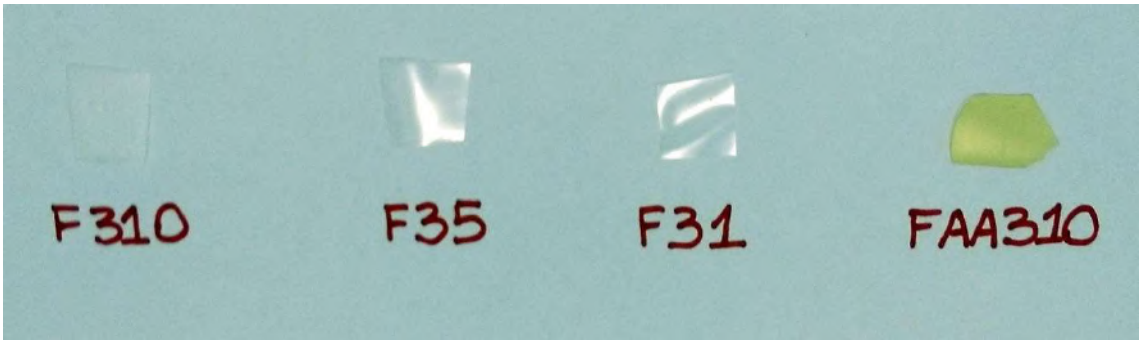
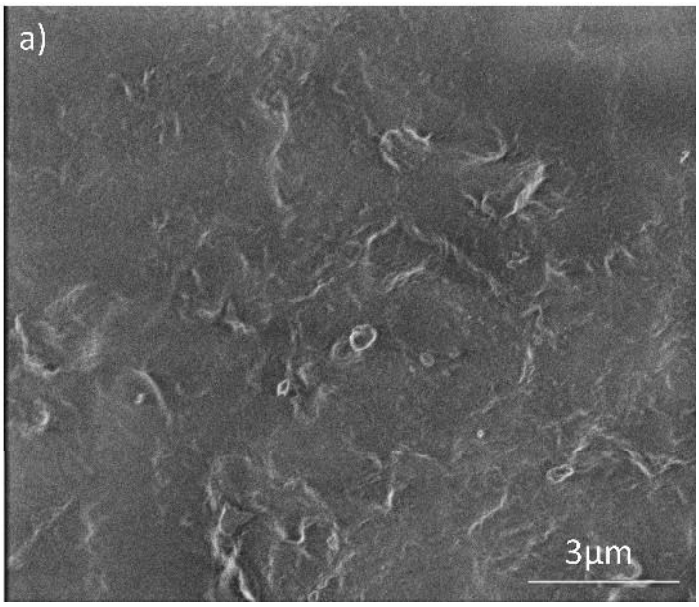


Figura 4. 4: Imagens dos filmes de amido sintetizados com (a) 10.7g de amido, (b) 5g de amido, (c) 1g de amido e (d) 10.7g de amido e ácido ascórbico.

5.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias de MEV dos filmes de amido produzidos com o precipitado da solução da síntese de nanopartículas podem ser vistas na Figura 5.23. Como pode ser observado, ao diminuir a concentração de amido para 1g forma-se um filme com uma superfície mais lisa. Além disso, os filmes apresentam partículas com um tamanho de 80 nm e com uma maior taxa de produção, Figura 5.23 (c). Por outro lado o filme sintetizado com maior quantidade de amido, 10,7 g, apresentou uma superfície mais irregular e menos partículas, com um tamanho de 500 nm, ver Figura 5.23 (a). Já o filme sintetizado com 5g de amido, ver Figura 5.23 (b), apresentou características intermediárias aos dois filmes, com partículas de 150 nm.



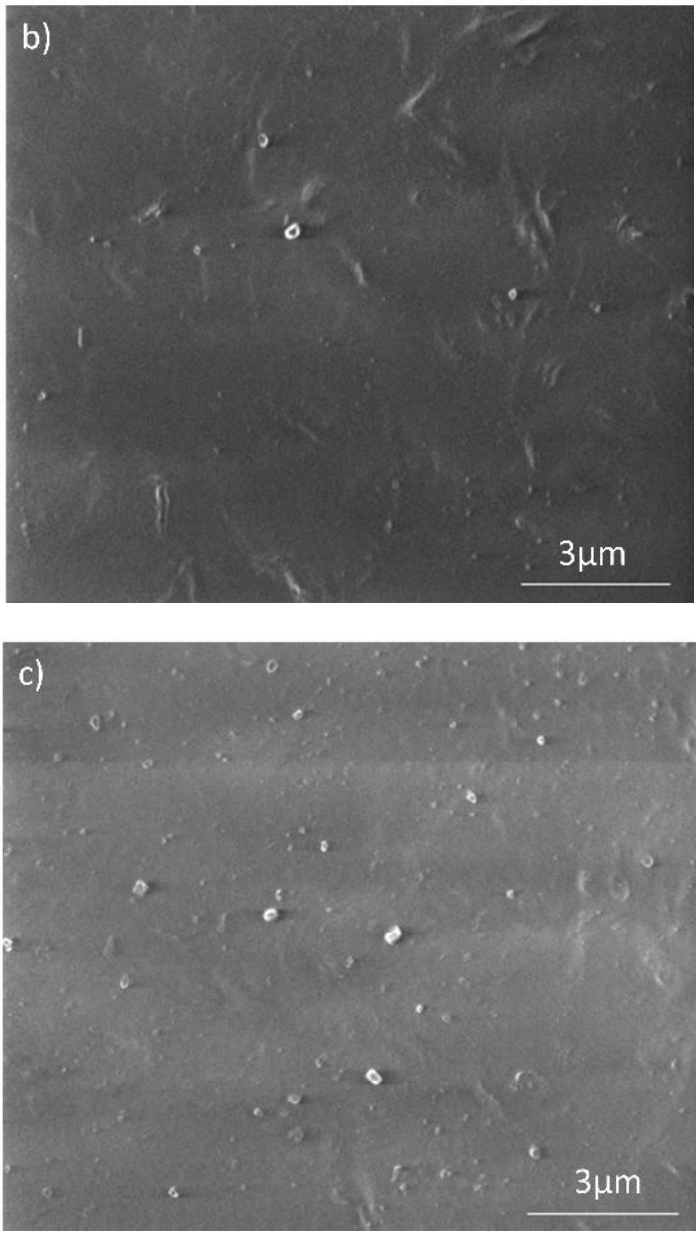


Figura 5. 21: Imagens por MEV dos filmes com diferentes concentrações de amido, Filme de amido sintetizado com (a) 10.7g de amido, (b) 5g de amido e (c) 1g de amido.

Nas Figuras 5.24 pode-se observar, respectivamente, o filme de amido e o filme de amido com ácido ascórbico. A adição do ácido ascórbico durante a nanoprecipitação das partículas levou a formação de partículas maiores, de 150 nm até 970 nm, sugerindo que a metodologia permitiu a formação de partículas e o encapsulamento em uma única etapa apesar da coloração amarelada do filme, que indica a presença do ácido ascórbico não encapsulado e também oxidado, ver Figura 4.4.

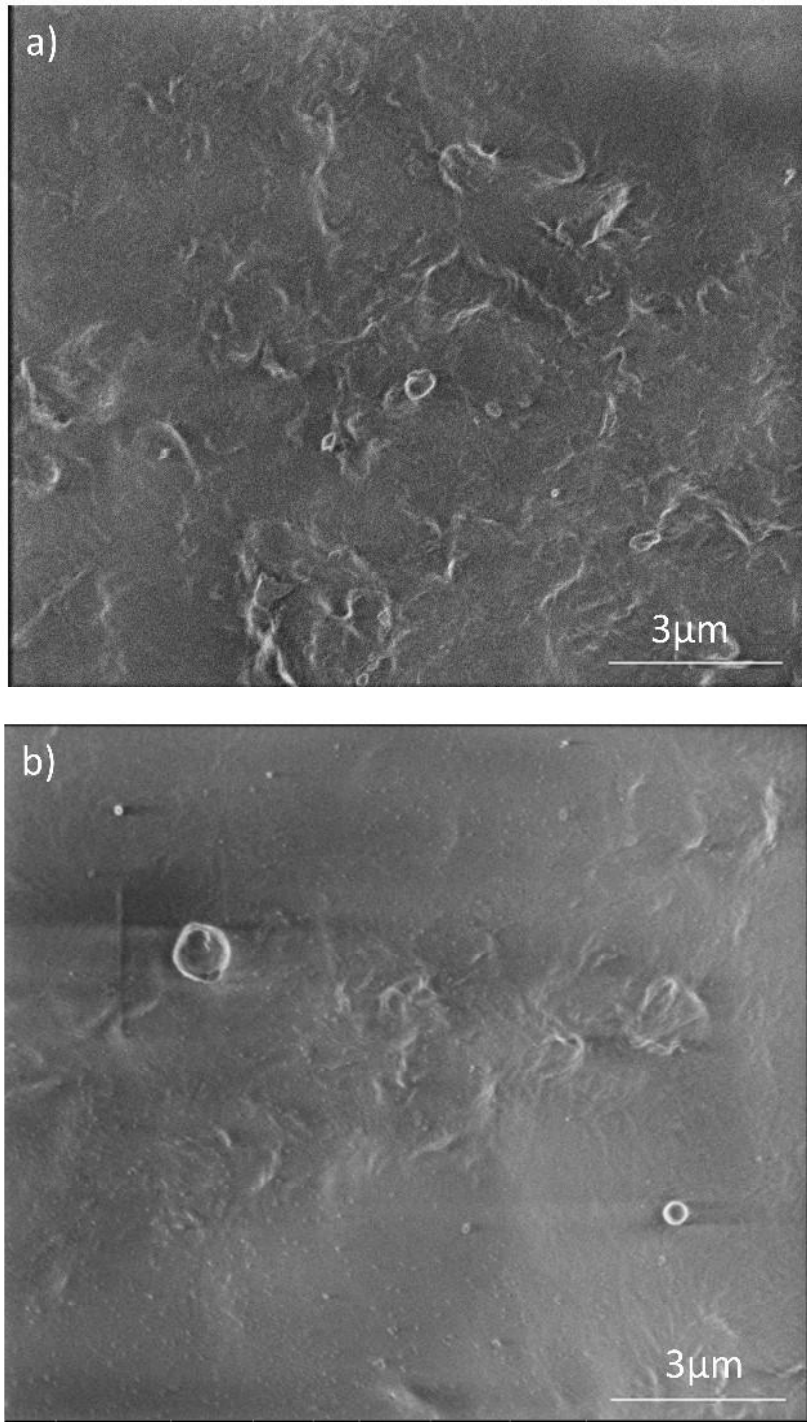


Figura 5. 22: Imagens por MEV do filme de amido (a) e do filme de amido com ácido ascórbico (b).

5.3.2 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Imagens obtidas por AFM permitiu obter a altura e o contraste de fase dos filmes de amido, ver Figuras de 5.25 a 5.27. Nas imagens de contraste de fase, pode-se observar melhor a presença das nanopartículas na superfície dos filmes. O filme preparado com uma menor concentração de amido, 1g, ver Figura 5.27, apresentou uma quantidade maior de partículas do que o filme de amido sintetizado com 10,7g de amido, ver Figura 5.25. Os resultados dessa análise estão de acordo com as micrografias de MEV, Figura 5.23.

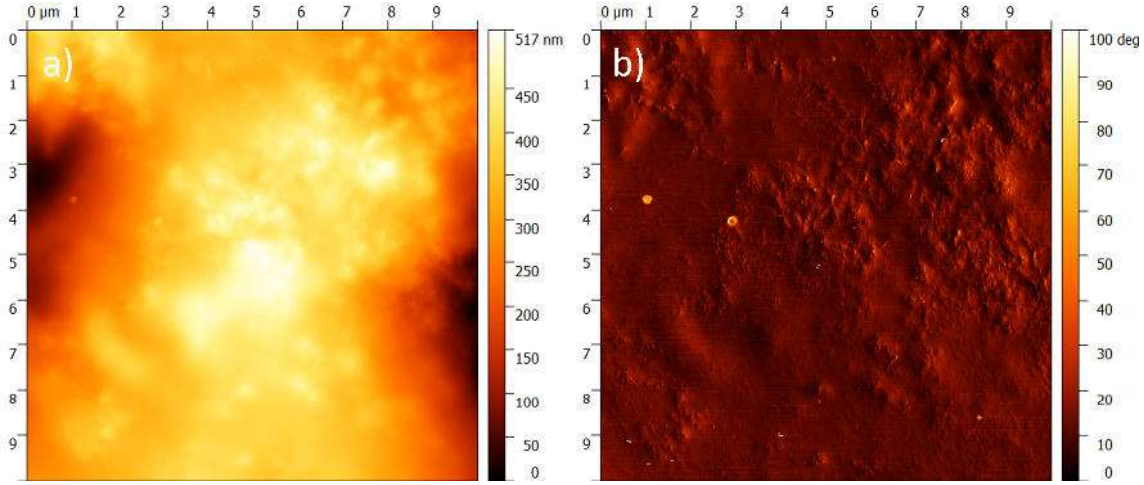


Figura 5. 23: Imagens de AFM do filme de amido com 10,7g de amido. Imagem de altura (a) e de contraste de fase (b).

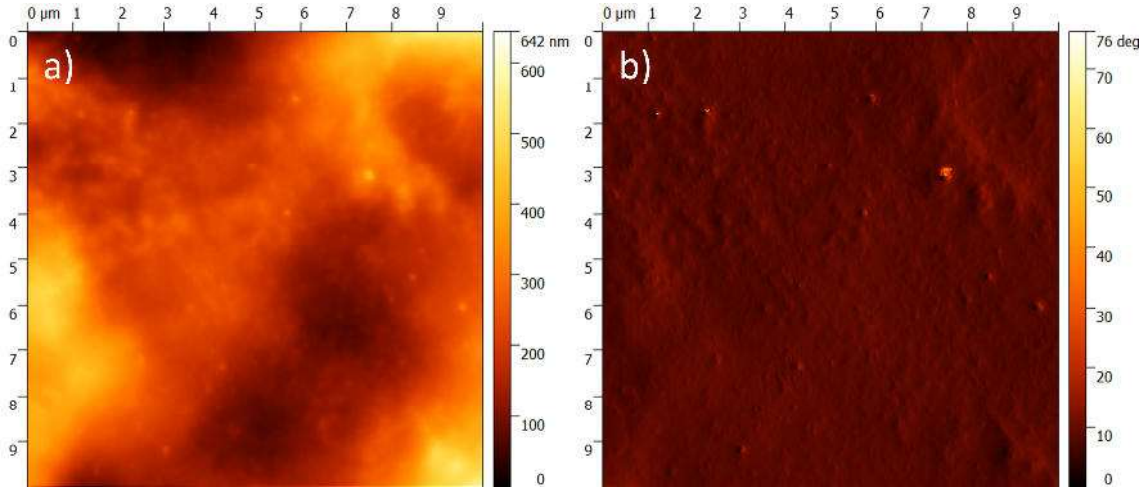


Figura 5. 24: Imagens de AFM do filme de amido com 5g de amido. Imagem de altura (a) e de contraste de fase (b).

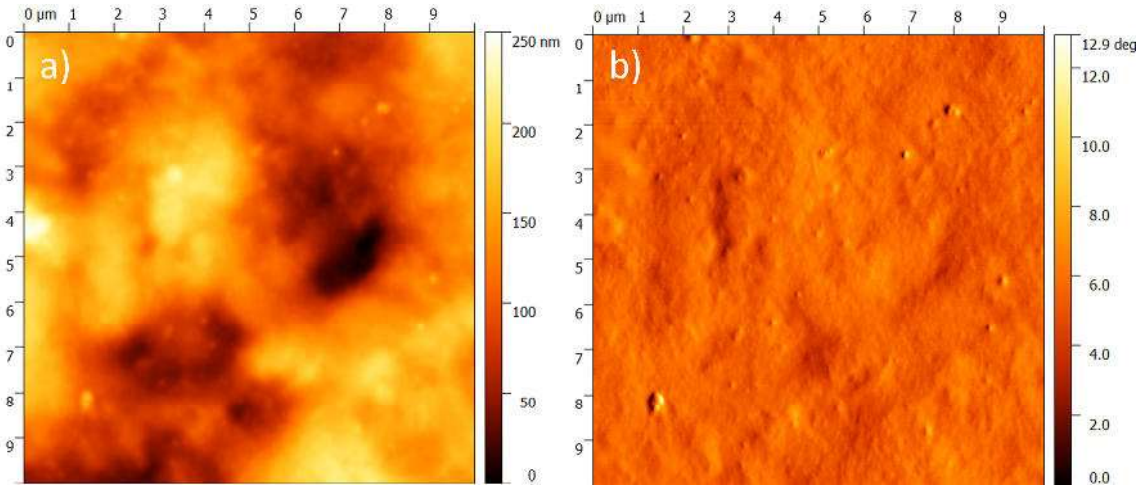


Figura 5. 25: Imagens de AFM do filme de amido com 1g de amido. Imagem de altura (a) e de contraste de fase (b).

Medidas de altura e de contraste de fase em filmes de amido com o ácido ascórbico podem ser vistos na Figura 5.28. Foi observado que foram formadas partículas maiores na superfície, com altura entre 300 a 400 nm. Observa-se também que as partículas encontram-se bem incorporadas na matriz do filme, o que confirma o que foi observado na micrografia da Figura 5.24 (b) por MEV.

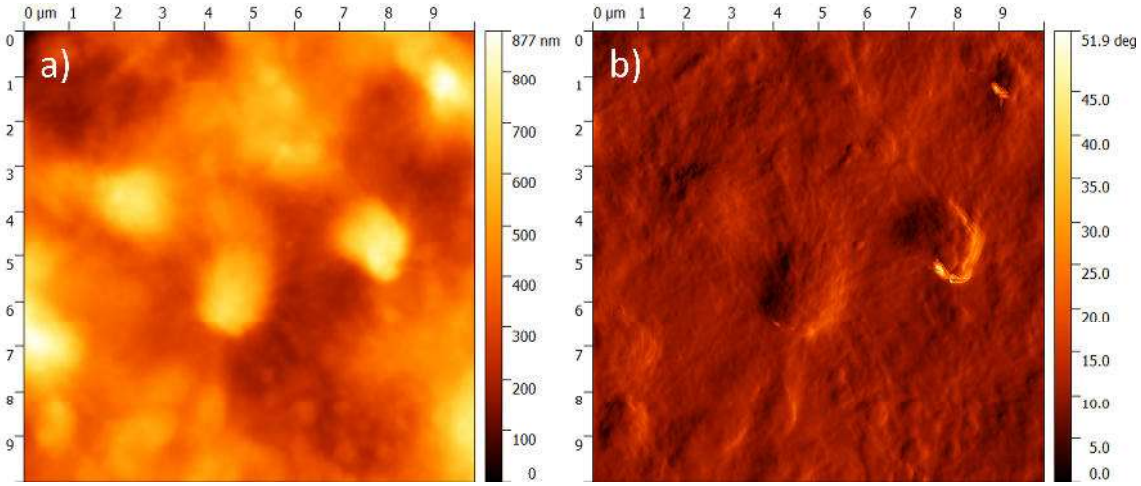


Figura 5. 26: Imagens de AFM de filme com ácido ascórbico com 10.7g de amido.

5.3.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Com o objetivo de se inferir as ligações químicas presentes nas amostras, foram feitas medidas do espectro de FTIR em pó do amido de milho 3001 e de filmes de amido de milho tal como apresentados na Figura 5.26. No espectro do pó do amido de milho observa-se a banda de absorção forte no intervalo de 3700 – 3000 cm^{-1} que é atribuída à ligação de hidrogênio dos grupos hidroxilas do amido. O pico característico em 2926 cm^{-1} é da ligação C-H dos átomos de hidrogênio do anel metano do amido. O pico característico em 1640 cm^{-1} é devido à vibração das ligações dos grupos O-H da água. Para a comparação dos espectros, todos foram normalizados pela intensidade de absorbância de uma banda considerada padrão característico do amido em 995 cm^{-1}, o qual é atribuído as deformações de tensão da ligação C-O-C. As principais bandas também foram observadas por (RAMIREZ, 2011).

Comparando-se o espectro do pó do amido 3001 com os espectros dos filmes também de amido, observa-se que não houve deslocamento dos picos nem o surgimento de novos picos, tal como pode ser visto na Figura 5.29.

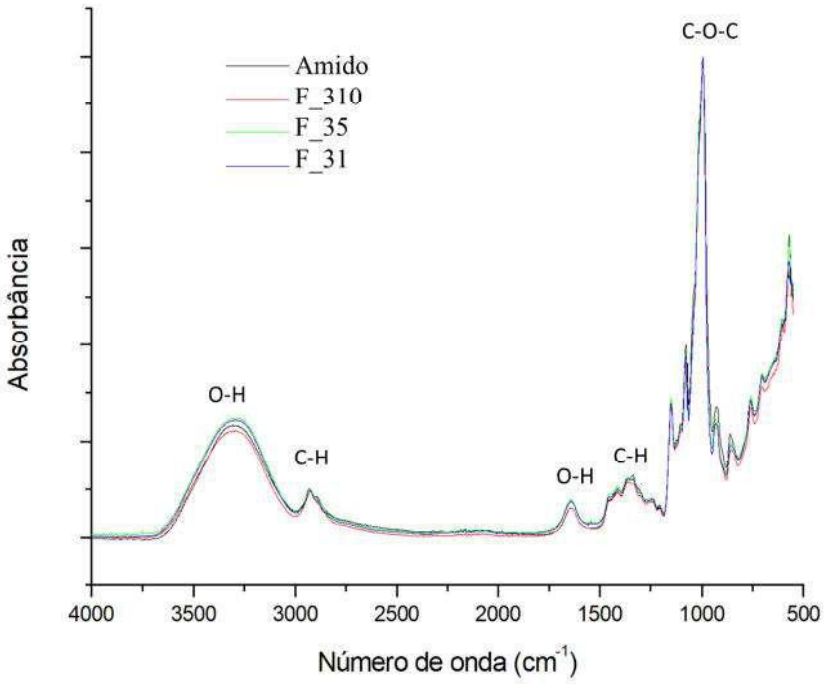


Figura 5. 27: Espectrograma do pó do amido de milho 3001, em preto, do filme de amido com 10,7g de amido, em verde, filme de amido com 5g de amido, em azul, e o filme de amido com 1g de amido, em vermelho.

A espectroscopia por FTIR do pó do ácido ascórbico está apresentada na Figura 5.30 e corresponde com os picos observados por (UMER, 2014 e ODA, 2011). A espectroscopia do filme de amido e do filme de amido com ácido ascórbico estão apresentados na Figura 5.31. O filme com o ácido ascórbico apresentou um espectro semelhante ao filme de amido sem o fármaco, apresentado dois picos característicos do ácido ascórbico. Um pico em 1759 cm^{-1}, característico da ligação C=O, e um pico em 1681 cm^{-1} que é característico da ligação C=C, como pode ser observado na Figura 5.31.

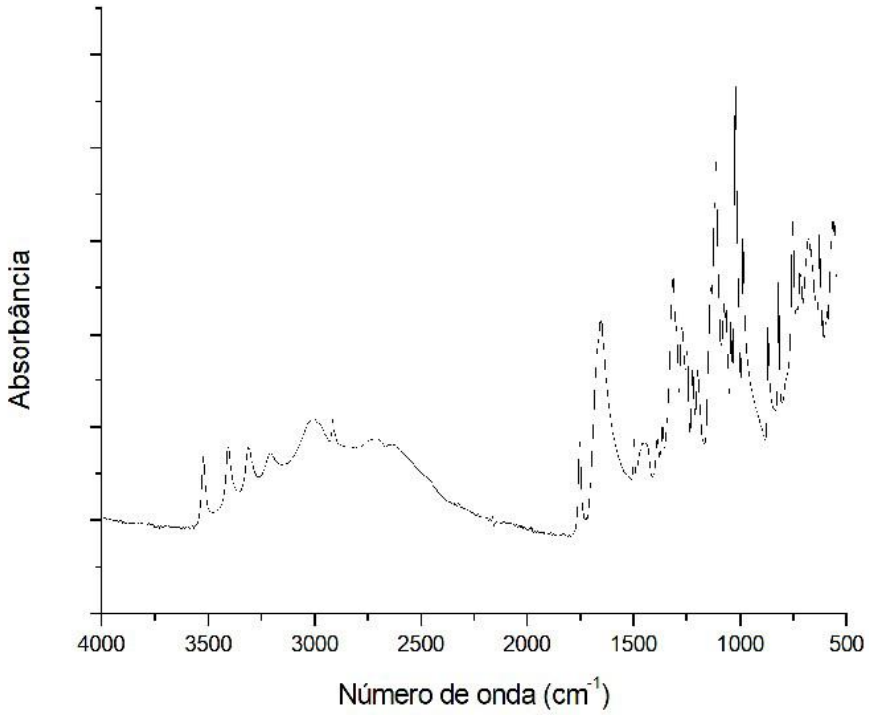
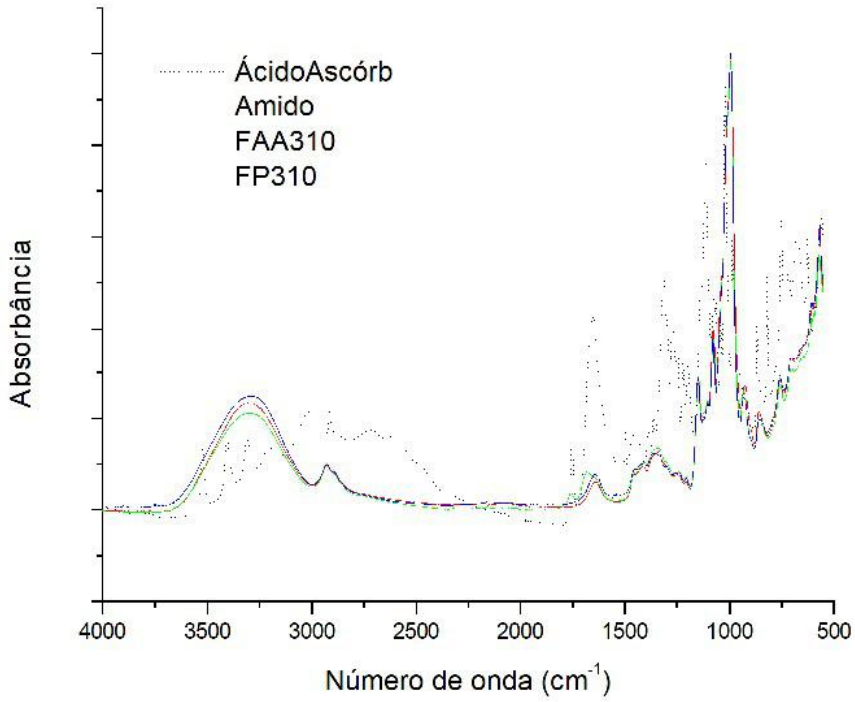


Figura 5. 28: Espectrograma do pó do ácido ascórbico.



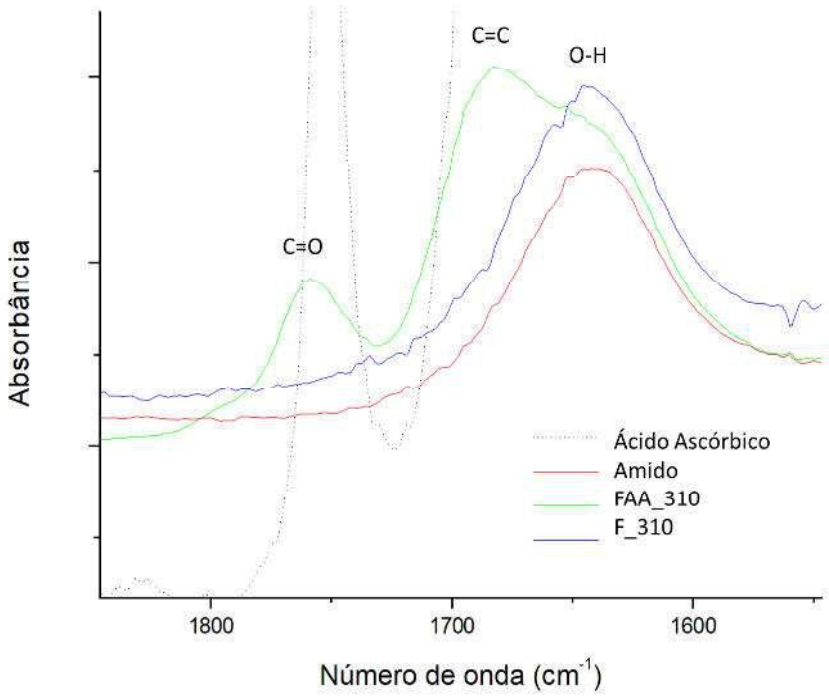


Figura 5. 29: Espectrograma do (a) pó do ácido ascórbico, pó do amido de milho 3001, filme com ácido ascórbico (FAA_310) e do filme puro com 10,7g de amido (FP_310). Em (b) observa-se um aumento da região 2000-1500 cm^{-1}.

5.3.4 Difração de Raios-X

Com o objetivo de investigar o grau de cristalinidade dos filmes de amido, foi feita a difração de raios-x do pó do amido de milho e dos filmes de amido, que estão apresentados na Figura 5.32. O pó do amido de milho 3001 apresentou os principais picos em 2θ = 14.8°, 16,9°, 17,7° e 22,8° que representam o padrão de difração Tipo-A. Os resultados concordam com o que foi reportado por (SOEST, 1996). O uso do precipitado do processo da nanoprecipitação para a formação dos filmes levou a alteração na estrutura cristalina do amido 3001. Os filmes apresentaram uma estrutura bem menos cristalina. O filme sintetizado com 10,7g de amido apresentou um pico em 2θ = 16,5°, característico da cristalinidade do Tipo B, e um pico em 2θ = 19,3° que é característico da cristalinidade Tipo Vh. O filme sintetizado com 5g de amido apresentou um pico em 2θ = 17,1°, característico da cristalinidade do Tipo B, e um pico em 2θ = 18,9°, característico da cristalinidade do Tipo Vh. Outro filme sintetizado, este com 1g de amido, apresentou a menor cristalinidade e um pico em 2θ = 17,2°, característico da cristalinidade Tipo B, e um pico em 2θ = 21,6°, característico da cristalinidade Tipo Vh. Os valores dos picos concordam com o que foi reportado por (SOEST, 1996).

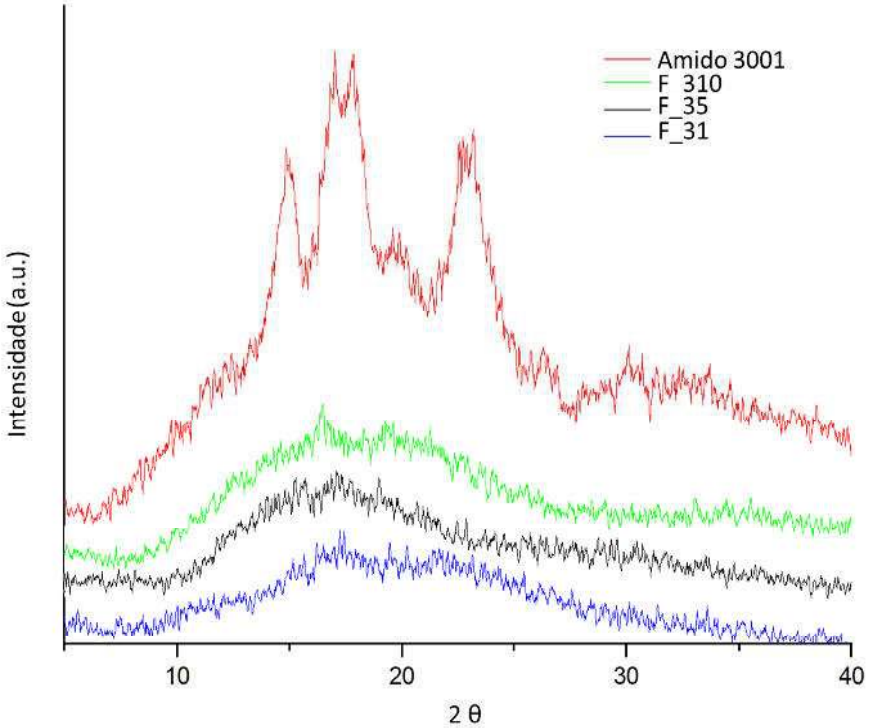


Figura 5. 30: Difratograma do pó do amido de milho 3001, do filme com 10,7g de amido (F_310), filme com 5g de amido (F_35) e do filme com 1g de amido (F_31).

O padrão de difração do pó do ácido ascórbico está representado na Figura 5.33. A difração do pó do amido de milho e do filme de amido com e sem AA estão representados na Figura 5.34. Os resultados mostram que o filme com o ácido ascórbico apresenta uma maior cristalinidade do que o filme sem o ácido ascórbico e apresentou picos em 2θ = 12,9°, 19,9°, 21,8° e 24,2° característicos da cristalinidade Tipo Vh e um pico em 2θ = 16,9° característico da cristalinidade Tipo B.

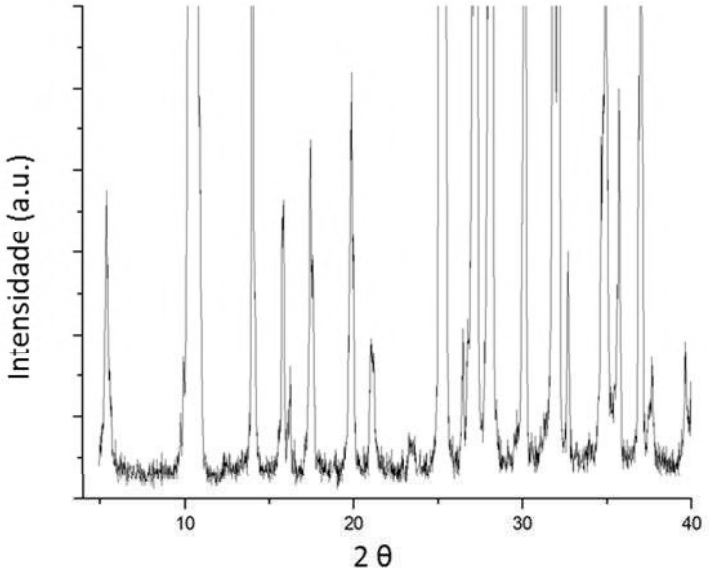


Figura 5. 31: Imagem do aumento do difratograma do pó do ácido ascórbico.

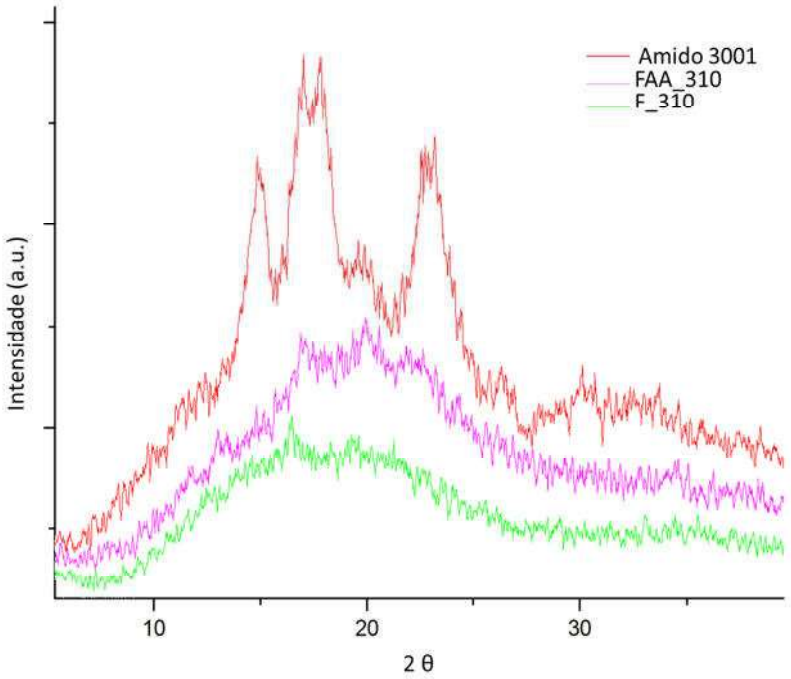


Figura 5. 32: Difratograma do pó do amido de milho 3001, do filme de amido com 10,7g de amido (F_310) e do filme de amido com o ácido ascórbico com 10,7g de amido (FAA_310)

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1 Nanopartículas de amido

Na nanoprecipitação, muitos parâmetros podem ser determinantes nas características físicas das nanopartículas formadas, como o tamanho e a eficiência de encapsulamento do fármaco. Como foi observado nos resultados a ordem de adição da solução polimérica e do não-solvente mostraram exercer um efeito nas características das nanopartículas formadas. Segundo (MILADI, 2016), ao adicionar o não-solvente na solução polimérica, a formação de aglomerados e de partículas grandes é favorecida, já que a difusão lenta entre o etanol e a água faz com que o polímero leve mais tempo para chegar à concentração crítica supersaturada. Observamos que ao adicionar a solução polimérica no não-solvente, existe a formação de partículas com tamanhos menores e uma menor formação de aglomerados devido a uma rápida difusão entre o etanol e a água. Esses resultados foram observados nas imagens do MEV, ver Figura 5.1.

A quantidade de polímero na solução polimérica influencia nas características das nanopartículas formadas. O aumento da concentração do polímero esta diretamente relacionada à supersaturação (Sr) que leva a um aumento no tamanho das partículas. O valor da supersaturação é a razão entre a concentração do polímero em função da sua solubilidade no meio, Equação 3.1. Quando o sistema tem uma grande quantidade de polímero, o valor de Sr é maior e consequentemente o valor da razão de nucleação (Nr) é menor, Equação 3.3, levando a formação de grandes partículas. A viscosidade da solução polimérica que aumenta com o aumento da concentração de polímero, também dificulta a difusão do não-solvente favorecendo a formação de partículas maiores (MILADI, 2016 e D'AADIO, 2011). Através das imagens do MEV, na Figura 5.2, é possível observar partículas maiores na síntese que teve uma maior quantidade de amido e partículas menores com uma quantidade menor de amido. Pelo AFM, Figura 5.11 e Tabela 5.5, esses mesmos resultados podem ser observados corroborando com os resultados do MEV.

A velocidade de agitação durante a nanoprecipitação também é um fator importante no processo da formação das partículas, Figura 6.1. O aumento da velocidade de agitação diminui a freqüência de colisão entre as cadeias polímericas, para uma mesma concentração de polímero no meio. Em ua solução com menor

concentração de polímero e agitação rápida, o número de colisões diminui não levando a coagulação das partículas formadas (MILADI, 2016 e JOYE, 2013).

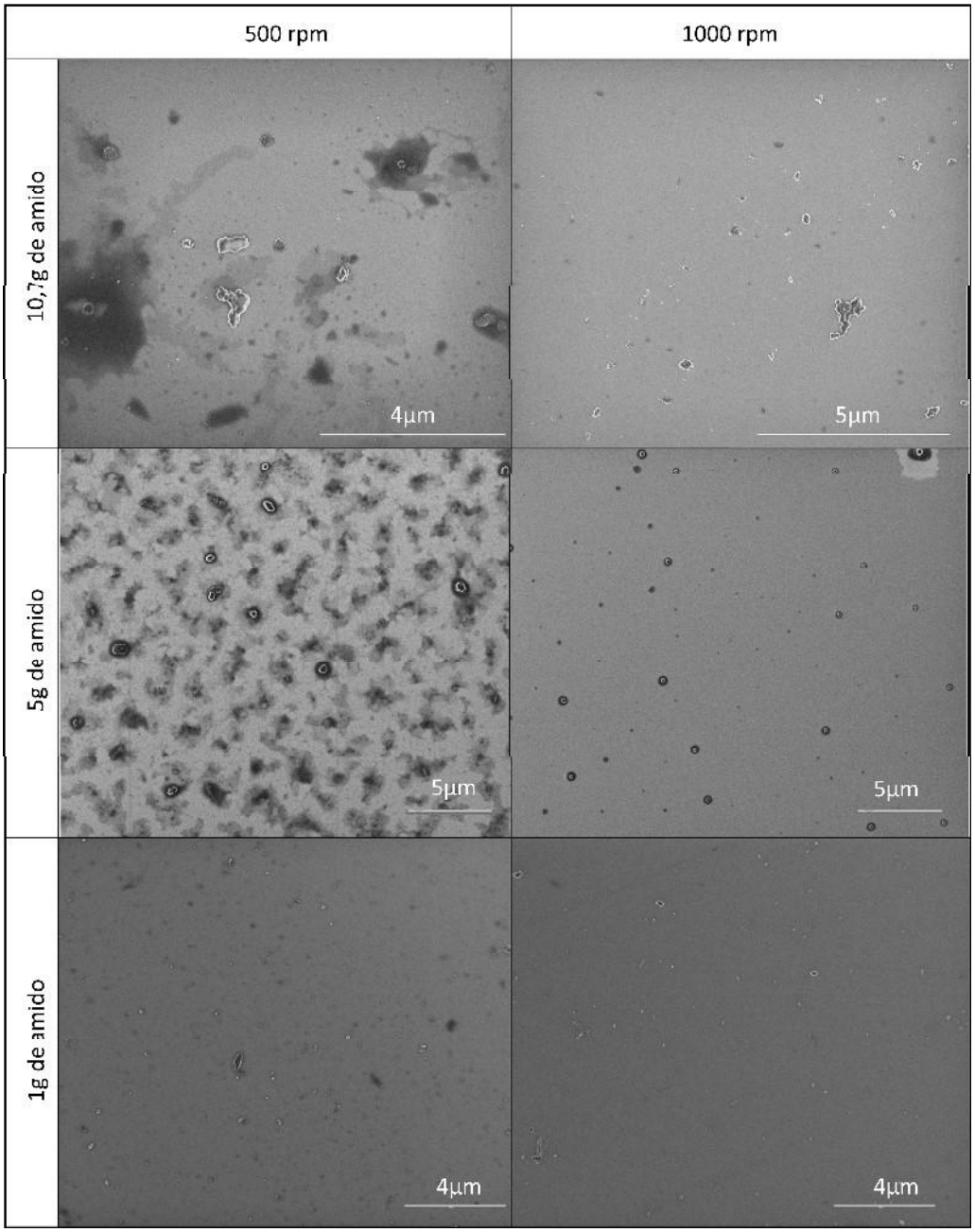


Figura 6. 1: Micrografias de MEV das nanopartículas de amido sintetizadas com diferentes valores de amido e diferentes valores de agitação.

A temperatura do amido gelatinizado na nanoprecipitação é outro parâmetro que interfere na formação e nas características das partículas formadas. Quando a solução polimérica está aquecida, maior é a agitação molecular aumentando a frequência de colisão que leva a formação de partículas maiores. Dessa forma, na nanoprecipitação, quanto mais quente for a solução polimérica, menor a agitação e maior a concentração

de amido, maior serão as partículas formadas por favorecer um maior valor de Sr, menor valor de Nr e uma maior frequência de colisão entre os polímeros (MILADI 2016; D'ADDIO, 2011 e JOYE, 2013).

As diferentes condições de síntese levaram a formação de partículas com diferentes formatos, Figuras 6.2 até 6.4. Como foi visto nos resultados, a síntese com 10,7g levou a formação de partículas circulares, de aglomerados e de resíduos, como pode ser observado na Figura 6.2. Ao utilizar 5g de amido na síntese, as partículas formadas apresentaram dois formatos, hexagonal e circular, e uma menor quantidade de resíduo, ver Figura 6.3. Já com o uso de 1g de amido, as partículas apresentaram um único formato, circular, Figura 6.4.

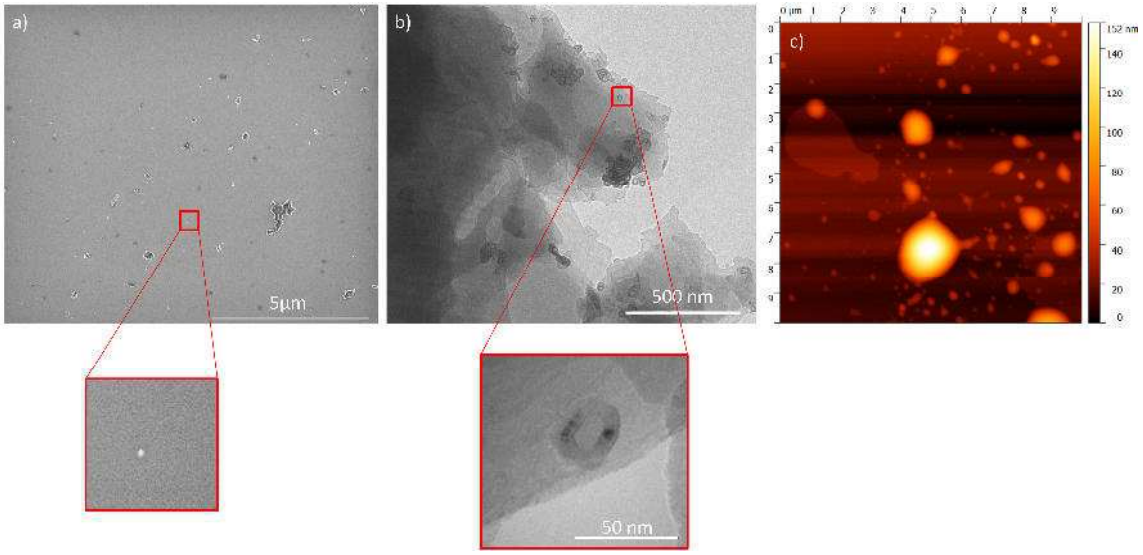


Figura 6. 2: Nanopartículas de amido da síntese de 10,7g de amido, (a) micrografia de MEV e um aumento de uma das partículas, (b) micrografia por MET e um aumento de uma das partículas e (c) imagem de altura por AFM das partículas.

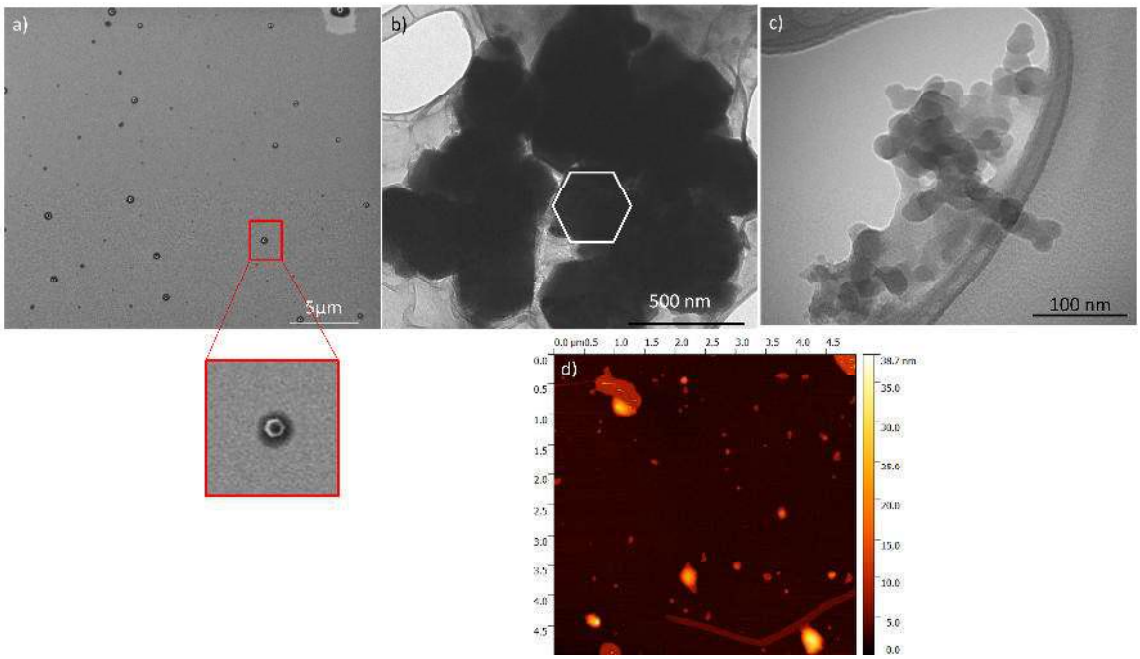


Figura 6. 3: Nanopartículas de amido da síntese de 5g de amido, (a) micrografia de MEV e um aumento de uma das partículas, micrografia por MET da (b) partícula hexagonal e (c) da partícula circular aglomerada e (d) imagem de altura por AFM das partículas.

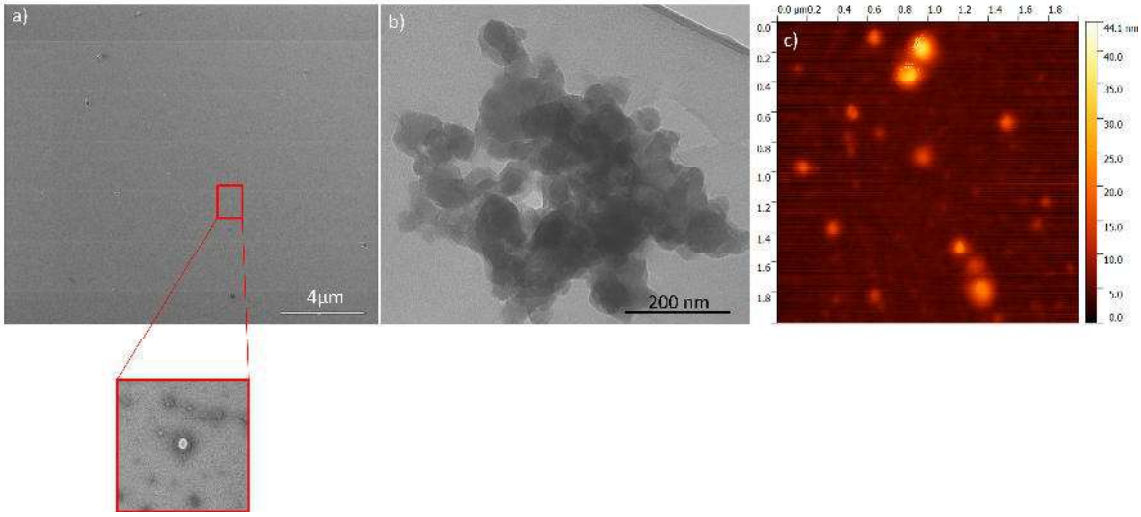


Figura 6. 4: Nanopartículas de amido da síntese de 1g de amido, (a) micrografia de MEV e um aumento de uma das partículas, (b) micrografia por MET e (c) imagem de altura por AFM das partículas.

Através do MET foram observadas partículas com diferentes formatos devido às diferentes condições de síntese. Ao sintetizar as nanopartículas com uma maior quantidade de amido, 10,7 g, observou-se a formação de aglomerados e neles há presença de nanopartículas ocas, Figura 6.2 (b). Segundo (LIU, 2016) essas nanopartículas ocas, que forma chamadas de nanocristais tubulares de amido, foram

formados por resíduos de nanocristais de amido que se arranjam e recombinaram formando nanocristais tubulares através do tratamento com amônia após a hidrólise ácida. A síntese com 5g de amido a micrografia de MET, Figura 6.3 (b), apresentou menos aglomerados e uma maior quantidade de partículas com formato hexagonal que apresenta um tamanho similar das partículas hexagonais observadas no MEV, Figura 5.4. Ao utilizar 1g de amido na síntese, Figura 6.4, formou-se grande quantidade de partículas circulares com tamanhos homogêneos o que também é observado nas micrografias por MEV e pelas imagens por AFM. Essas nanopartículas, hexagonais e circulares, também foram reportadas por (LE CORRE, 2014; SUN, 2016 a e SUN, 2016 b).

O uso do amido 4001, que contém 99-100% de amilopectina, apresentou formação de nanopartículas hexagonais e retangulares, como pode ser observado na Figura 6.5. O tamanho das nanopartículas não foi uniforme, variando de 20nm a 70nm, e segundo (SUN, 2016 b), amidos com baixo teor de amilose formam partículas de diversos tamanhos quando sintetizados por nanoprecipitação.

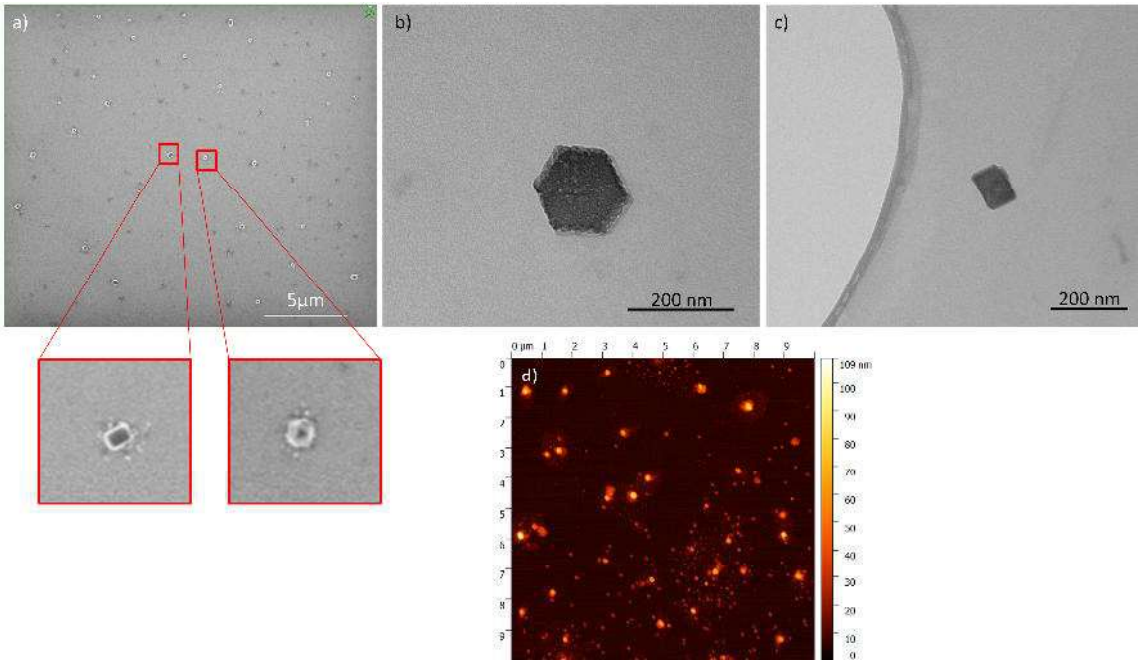


Figura 6. 5: Nanopartículas de amido da síntese de 10,7g de amido 4001, (a) micrografia de MEV e um aumento de das partículas, (b) e (c) micrografia por MET das partículas e (d) imagem de altura por AFM das partículas.

6.2 Nanopartículas de amido com o fármaco

O uso do ácido ascórbico na síntese das nanopartículas levou a formação de partículas com tamanho e morfologia diferente. As nanopartículas com o ácido ascórbico apresentaram um tamanho de 200 nm e com um formato esférico. Já as partículas sem o fármaco, apresentaram um tamanho de 50 a 30 nm e um formato circular, Figura 6.4.

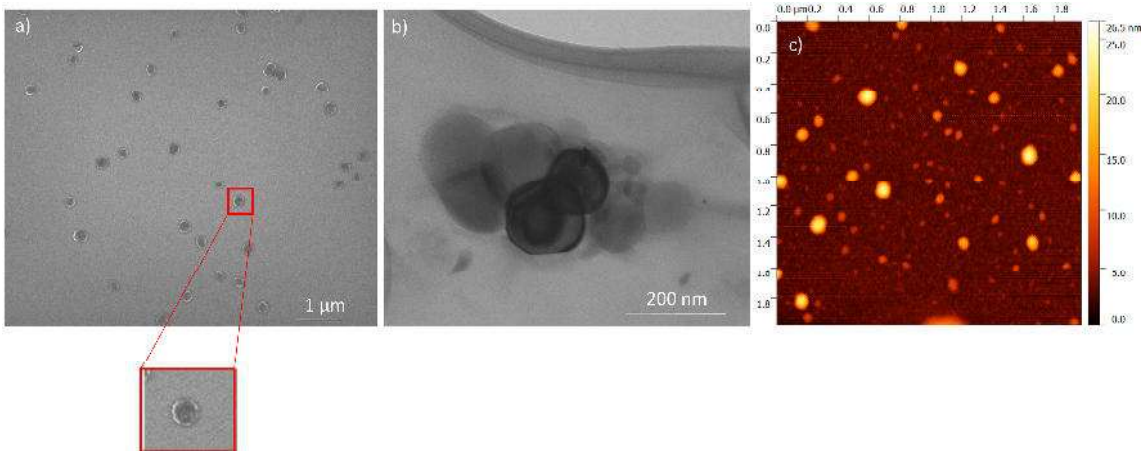


Figura 6. 6: Nanopartículas de amido da síntese de 10,7g de amido com ácido ascórbico, (a) micrografia de MEV e um aumento de uma das partículas, (b) micrografia por MET e (c) imagem de altura por AFM das partículas.

As partículas sintetizadas pela metodologia I e II foram analisadas por MET após oito meses de síntese. A síntese pela metodologia I apresentou uma mudança na coloração da solução, de transparente foi para amarela, ver Figura 4.3. Essa mudança de cor indica a oxidação do ácido ascórbico que pode ter acontecido por apresentar água em um terço da solução, 33,3%. Como o ácido ascórbico é muito mais solúvel e instável em água do que em etanol, a metodologia I se torna menos apropriada para a síntese das nanopartículas com esse fármaco (SHALMASHI, 2008). A síntese pela metodologia II apresenta menos de 5% de água na solução, dessa forma a solução de partículas com o ácido ascórbico não tem essa mudança de cor. Pelas micrografias de MET, a solução das partículas sintetizadas pela metodologia II, apresentou partículas com tamanhos de 20 a 5 nm. Na solução de partículas sintetizada pela metodologia I, devido ao excesso de ácido ascórbico na superfície do silício, formou uma película sobre a superfície, dificultando a visualização das partículas, sendo possível observar somente através do MET. Pelos resultados de MET, Figura 5.19, pode-se observar maior quantidade de

partículas, e maiores, na solução da síntese pela metodologia II. Através desses resultados preliminares e pela coloração das soluções, pode-se afirmar que a síntese pela metodologia II é mais eficiente e adequada para a síntese das partículas com o ácido ascórbico.

6.3 Filmes de amido com nanopartículas

O uso do precipitado obtido pela nanoprecipitação permitiu a formação de filme de amido com nanopartículas por *"casting"*. Desta forma os parâmetros utilizados na síntese interferiram tanto nas características dos filmes formados quanto nas características das nanopartículas. Ao utilizar 10,7g de amido o filme formado apresentou uma superfície mais irregular e com poucas partículas, como pode ser observado na Figura 6.7. Devido a quantidade de amido e das outras condições de síntese, amido gelatinizado em temperatura ambiente e agitação magnética de 500 rpm, as nanopartículas apresentaram um tamanho maior. Quando foi utilizado 1g de amido, a superfície do filme foi mais lisa e com muitas partículas pequenas, como pode ser observado na Figura 6.9. Por ter uma concentração menor de amido, as partículas formadas foram menores e em maior quantidade por ter um valor de Sr menor, um valor de Nr menor e consequentemente uma menor frequência de colisão. Ao usar 5g de amido na síntese, o filme de amido apresentou características intermediárias aos outros dois filmes, ver Figura 6.8, assim como também aconteceu com as nanopartículas.

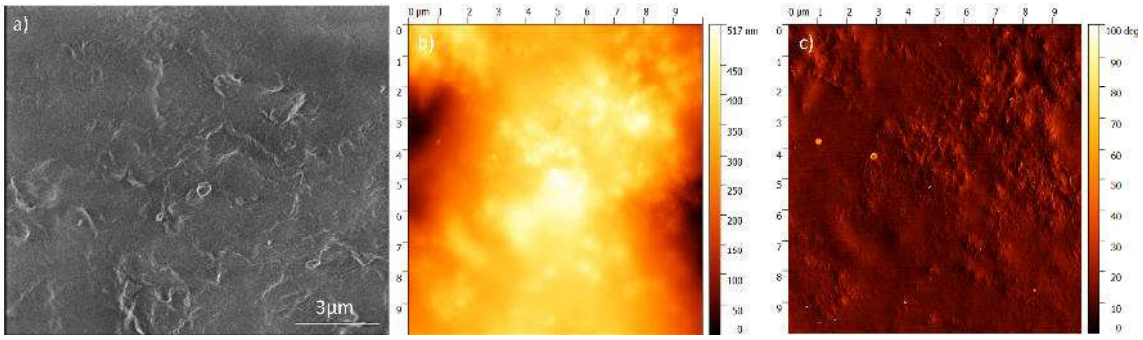


Figura 6. 7: Filme de amido com nanopartículas de amido da síntese de 10,7g de amido, (a) micrografia de MEV, (b) imagem de altura e (c) de contraste de fase por AFM.

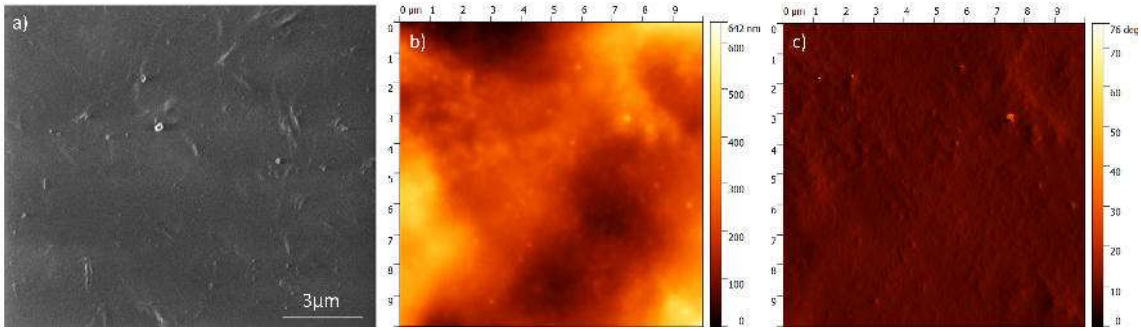


Figura 6. 8: Filme de amido com nanopartículas de amido da síntese de 5g de amido, (a) micrografia de MEV, (b) imagem de altura e (c) de contraste de fase por AFM.

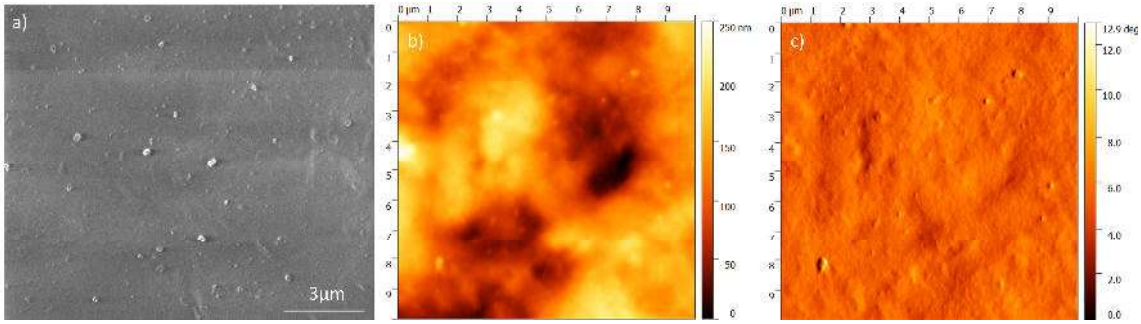


Figura 6. 9: Filme de amido com nanopartículas de amido da síntese de 1g de amido, (a) micrografia de MEV, (b) imagem de altura e (c) de contraste de fase por AFM.

Através do FTIR se observou que os filmes apresentaram o mesmo espectro do que o amido em pó utilizado na síntese e não houve mudança estrutural nas moléculas, Figura 5.26. Como a análise foi realizada no filme e a quantidade de nanopartícula por área na matriz do filme é pequena, é difícil de analisar os resultados das nanopartículas que apresentam as mesmas bandas, mas com uma intensidade menor (SUN, 2016 b).

Os padrões de difração dos filmes apresentaram estrutura cristalina tipo B e Vh. A cristalinidade tipo B é devido ao amido gelatinizado que não virou partícula e a cristalinidade tipo Vh é devida à nanopartícula. A gelatinização destrói a cristalinidade do amido e ao entrar em contato com o etanol nanopartículas de amido são precipitadas com estrutura cristalina tipo Vh, originada das estruturas de hélice simples feito de amilose e etanol (LIU, 2016 e SUN, 2016 b).

O padrão de difração dos filmes mudou ao usar quantidades diferentes de amido na síntese. O filme de 10,7g apresentou maior cristalinidade tipo B e pouca

cristalinidade tipo Vh por ter poucas nanopartículas e muito amido não particulado, como pode ser observado na Figura 6.7. O filme com 1g apresentou picos de menores intensidades do tipo B e apresentou pico do tipo Vh. Devido a uma maior produção de nanopartículas, restando menos material de amido gelatinizado, a intensidade do pico tipo B diminui. como pode ser observado na Figura 6.9. Já o filme com 5g de amido, Figura 6.8, apresentou um padrão de difração intermediário aos dois outros filmes. Esse resultado também está de acordo com os resultados obtidos por MEV e AFM, Figura 5.24 e Figura 5.25 a 5.27, da síntese das nanopartículas.

O filme com o ácido ascórbico apresentou uma coloração amarela devido à oxidação do ácido ascórbico não encapsulado e através dos resultados, Figura 6.10, observou-se partículas maiores, devido ao encapsulamento do fármaco. A espectroscopia por FTIR apresentou duas bandas a mais que são características do ácido ascórbico, Figura 5.31. Por não apresentar alteração na banda 3500 cm^{-1} não ocorre ligação de hidrogênio entre os polímeros do amido com o ácido ascórbico (YOON, 2013). No resultado do padrão de difração, Figura 5.34, observou-se uma maior cristalinidade do que os outros filmes. O aumento da cristalinidade pode ser devido à presença de partículas maiores na superfície aumentando a intensidade dos picos característicos da cristalinidade tipo B e Vh e pela presença de ácido ascórbico não encapsulado.

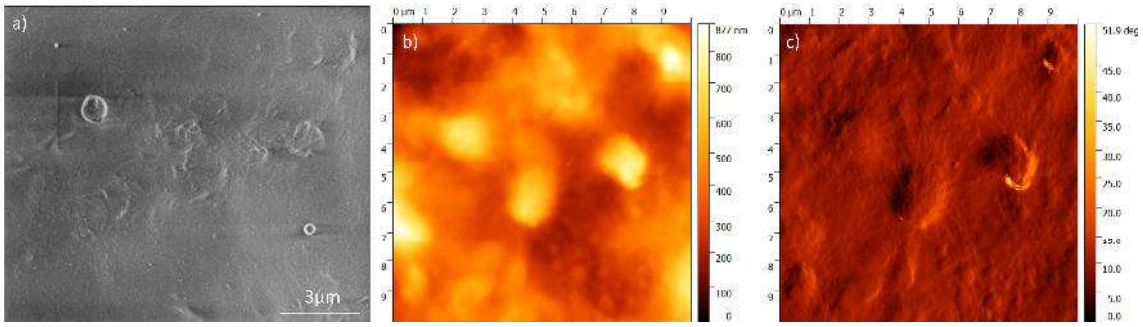


Figura 6. 10: Filme de amido com nanopartículas de amido e ácido ascórbico da síntese de 10,7g de amido, (a) micrografia de MEV, (b) imagem de altura e (c) de contraste de fase por AFM.

Como mostrado, há muitos parâmetros que podem interferir nas características físicas das nanopartículas, sendo necessário determinar quais parâmetros são idéias para formar a nanopartícula com a característica desejada.

7. CONCLUSÃO

Com os resultados foi possível observar que os parâmetros na nanoprecipitação e a quantidade de amilose presente no amido, são fatores determinantes na formação de nanopartículas de amido de milho.

A ordem de adição do não-solvente e do solução polimérica interfere na taxa de produção de nanopartículas. Desta forma, a adição do amido gelatinizado no etanol proporciona uma maior taxa de produção de nanopartículas e menor quantidade de resíduos no sobrenadante.

Em relação à quantidade de amido de milho usado na gelatinização, foi visto que uma menor quantidade de amido leva a uma maior produção de nanopartículas. Para os filmes, uma menor quantidade de amido, leva a formação de filmes mais finos, com uma superfície menos irregular e com uma maior quantidade de partículas pequenas na superfície.

A temperatura do amido gelatinizado e a velocidade de agitação durante a nanoprecipitação também são parâmetros determinantes na formação das nanopartículas. Quanto menor a temperatura do amido gelatinizado e quanto maior a velocidade, menor o tamanho das partículas formadas.

A amilose também mostrou ser um parâmetro importante na morfologia das partículas formadas. O amido que tem uma quantidade menor de amilose, o amido 4001, leva a formação de partículas com formatos hexagonais e retangulares e com diferentes tamanhos.

O procedimento de síntese das nanopartículas com o ácido ascórbico mostrou ser eficiente para encapsular o fármaco durante a nanoprecipitação com a metodologia proposta neste trabalho, metodologia II. Essa metodologia ainda mostrou ser mais estável para as nanopartículas com o ácido ascórbico do que a metodologia baseada de (MA, 2008).

Os filmes de amido sintetizados não apresentaram mudanças significativas nas espectroscopias por FTIR em relação ao pó do amido de milho. Somente no filme de amido com o ácido ascórbico, foram observadas duas bandas características das ligações C=C e C=O, que está presente na molécula do ácido ascórbico. O ácido ascórbico

também não está ligado por ligações de hidrogênio nos polímeros do amido de milho, não atuando como um agente crosslinking.

Os difratogramas mostraram que os filmes não apresentam o mesmo padrão de difração do que o pó de amido de milho devido ao processo da nanoprecipitação, prevalecendo cristalinidade tipo B do amido gelatinizado e a cristalinidade tipo Vh das nanopartículas. O filme com o ácido ascórbico apresentou mais cristalinidade do que os filmes de amido e esse aumento da cristalinidade pode estar correlacionado com o tamanho das partículas na matriz do filme.

8. SUGESTÃO PARA FUTUROS TRABALHOS

Como perspectiva desse trabalho, seria interessante otimizar os estudos sobre as propriedades mecânicas dos filmes obtidos de modo a comparar com os tradicionais filmes de amido sintetizados com um plastificante, como por exemplo, o glicerol.

Pretende-se melhorar a eficiência da produção das nanopartículas e a eficiência do encapsulamento do fármaco nas nanopartículas pelo processo de nanoprecipitação rápida (do inglês *Flash Nanoprecipitation Process*), isto acarretará em um controle melhor no tamanho das nanopartículas formadas. Além disso, é bem interessante estudar os meios de liberação do ácido ascórbico encapsulado.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRIGONI, O., and DE TULLIO, M.C. "Ascorbic acid: much more than just an antioxidant". Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1569, p. 01-09 (2002).

BAKER, A. A. "Internal structure of the starch granule revealed by AFM". Carbohydrate Research, v.330, p. 249-256 (2001).

BLANSHARD, J. M. V. "starch granule structure and function: a physicochemical approach". Starch: Properties and Potencial, p. 16-54 (1987).

BULÉON, A., COLONNA, P., PLANCHOT, V. and BALL, S. "Starch granules: structure and biosynthesis". International Journal of Biological Macromolecules, v. 23, pp. 85-112 (1998).

CHIN,S. F; YAZID, S. N. A. M. and PANG, C. S. "Preparation and characterization of starch nanoparticles for controlled release of curcumin". International Journal of Polymer Science (2014).

CHORNY, M.; FISHBEIN, I.; DANENBERG, H.D. and GOLOMB, G. "Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics". Journal of Controled Release, vol. 83, p. 389–400 (2002).

COSTA, C. S. C. "Aplicação de proteínas de reserva da ervilha verde (psum sativum, L) no encapsulamento de ácido ascórbico por spray drying, obtenção de nano e micropartículas e avaliação da biodisponibilidade in vitro" Tese de doutorado, Pós-graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro (2014).

D'ADDIO, S.M., and PRUD'HOMME, R.K. "Controlling drug nanoparticle formation by rapid precipitation". Adv. Drug Delivery Rev. vol. 63, p. 417–426 (2011).

DENARDIN, C. C. AND SILVA, L. P. "Starch granules structure and its regards with physicochemical properties" Ciência Rural, Santa Maria, vol. 39, p. 945-954 (2009).

DUFRESNE, A. and LE CORRE, D. “starch: nanoparticles: a review”. Biomacromolecules, vol. 11, p. 1139-1153 (2010).

ELAISSARI, A.; FESSI, H.; ROMAN, R. A.; RODRIGUEZ, S. A. G.; NAZARI, AQ. A.; GERGES, H.; MILADI, K.; BADRI, W.; TARHINI, M. and RIVAS, C. J. M. “Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery”. International Journal of Pharmaceutics (2017).

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N. and BENITA, S. “Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement”. International Journal of Pharm., vol. 55 (1989).

FREDERIKSEN, H. K.; HANSEN, H. C.; BORGGAARD, O. and PEDERSEN, M. “Starch encapsulated chlorpyrifos: Release rate, insecticidal activity and degradation in soil”. Journal of Microencapsulation, vol. 19(3), p. 319–331 (2002).

HIZUKURI, S. “Measurement of the chain length of amylopectin and its relevance to the origin of crystalline polymorphism of starch granules”. Biochimica et Biophysyca Acte, vol. 760, p. 188–191 (1983).

JOYE, I. J. and MCCLEMENTS, D. J. “Production of nanoparticles by anti-solvent precipitation for use in food systems”. Tends Food Science Technology, vol. 34(2), p. 109–123 (2013).

KEETALS, C. J. A. M.; VAN VLIET, T. and WALSTRA, P. “Gelation and retrogradation of concentrated starch systems: effect of concentration and heating temperature”. Food Hydrocolloids, vol. 10, p. 363-368 (1996).

LE CORRE, D. and ANGELIER, H. “Preparation and application of starch nanoparticles for nanocomposites: a review”. Reactive and Functional Polymers, vol. 85, p. 97-120 (2014).

LI, D.; ADHIKARI, B.; WNAG, L. nad SHI, A. “Characterization of starch films containing starch nanoparticles – Part 1: Physical and mechanical properties”. Carbohydrate Polymers, vol. 96, p. 593-601 (2012).

LI, D.; ADHIKARI, B.and SHI, A. “Characterization of starch films containing starch nanoparticles. Part 2: Viscoelasticity and creep properties”. Carbohydrate Polymers, vol 93, p. 602-610 (2013).

LIM, S. T.; PARK, S. S. and KIM, H. Y. “Preparation, characterization and utilization of starch nanoparticles”. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces (2014).

LIU, W.; GONG, B.; TAN, H.; YU, D.; SONG, Z and LUCIA, A. L. “Understanding shape and morphology of unusual tubular starch nanocrystals”. Carbohydrate Polymers vol. 151, p. 666-675 (2016).

MA, X.; CHANG, P. R.; JIAN, R. and YU, J. “Fabrication and Characterization of Citric Acid-Modified Starch Nanoparticles / Plasticized-Starch Composites”. Biomacromolecules, vol. 9, p. 3314-3320 (2008).

MAHKAM, M. “Starch-based polymeric carriers for oral-insulin delivery”. Journal of Biomedical Materials Research Part A, vol. 92A, p. 1392–1397 (2010).

MALI, S., GROSSMANN, M. V. E. and YAMASHITA, F. “Starch films: production, properties and potential of utilization.". Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n. 1, p. 137-156 (2010).

MILADI, K.; SFAR, S.; FESSI, H. and ELAISSARI, A. “Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications”. Polymer Nanoparticles for Nanomedicines. Springer International Publishing, p. 17–53 (2016).

MIZIL, O. “Synthesis of N-(Methyl,Ethyl,Isopropyl,Isopentyl ,and 2-phenyletyl) -5,6-O-isopropylidene- L-Ascorbic acid”. Journal of Kerbala University, p. 59-74 (2010).

OLIVEIRA, L. M.; ARAÚJO E. S. and GUEDES S. M. L. “Gamma irradiation effects on poly(hydroxybutyrate)”. Polymer Degradation and Stability, v. 91, pp. 2157-2162 (2007).

OCHUBIOJO, E. M. and RODRIGUES, A. “Starch: from food to medicine”. Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry, Dr. Benjamin Valdez (Ed) (21012).

RAMÍREZ, M. G. “Desenvolvimento de biocompósitos de amido termoplástico reforçados por fibra de coco Verde”. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná (2011).

UMER, A; NAVEED, S.; RAMZAN, N.; RAFIQUE, M. S. nad IMRAN, M. “A green method for the synthesis of copper nanoparticles using l-ascorbic acid”. Revista Materia, p. 197-203 (2014).

PARK, H. J.; WHITESIDE, W. S.; CHA, D. S and BAE, H. J. “Film and pharmaceutical hard capsule formation properties of mungbean, waterchestnut and sweet potato starches”. Food and Chemistry, vol. 106, p. 96-105 (2008).

PARKER, R. and RING, S. G. “Aspects of the physical chemistry of starch”. Journal of cereal science, vol. 34, p. 1–17 (2001).

PARRA, D. F., TADINI, C. C. and LUGAO, A. B. “Mecganical prperties and water vapor transmission in some blends of cassava starch edible films”. Carbohydrate Polymer, vol. 58, p. 475-481 (2004).

PIERUCCI, A.P.T.R.; ANDRADE, L.R.; BAPTISTA, E. B.; VOLPATO, N. M., and ROCHA-LEÃO, M.H.M. “New microencasulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector”. Journal of Microencapsulation, vol. 23, p. 654-662 (2006).

PRASAD, P. V.; PAL, P. C.; RAO, D. N.; SHRIVASTAV T. G. and GE, R.. “Oral thin films. Orally Disintegrating tablet and film Technologies”. 5th edition (2008).

SHALMASHI, A. and ELIASSI, A. “Solubility of L-(+)-ascorbic acid in water, ethanol, methanol, propan-2-ol, acetone, acetonitrile, ethyl acetate and tetrahydrofuran from (293 to 323) K”. Journal of Chemical Engineering Data, vol. 53 (2008).

SIMŞEK, S.; EROĞLU, H.; KURUM, B. and ULUBAYRAM, K. “Brain targeting of Atorvastatin loaded amphiphilic PLGA-b-PEG nanoparticles”. Journal Microencapsulation, vol. 30, p. 10–20 (2013).

SOEST, J. J. G. V.; HULLEMAN, S. H. D.; WIT, D. and VLIEGENTHART, J. F. G. “Crystallinity in starch bioplastics”. Industrial Crops and Products, vol. 5, p. 11-22 (1996).

SOUZA, R. C. R. and ANDRADE, C. T. “Investigação dos Processos de Gelatinização e Extrusão de Amido de Milho”. Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 10, p. 24-30 (2000).

SOUZA, C. A. G.; SIQUEIRA, S. M. C.; AMORIMA, A. F. V.; MORAISA, S. M.; GONÇALVES, T.; GOMESA, R. N.; CUNHA, A. P. and RICARDO, N. M. P. S. “Encapsulação do ácido l-ascórbico no biopolímero natural galactomana por spray‑drying: preparação, caracterização e atividade antioxidante”. Química Nova, vol. 38, p. 877-883 (2015).

SUN, Q.; XIONG, L.; XI, T.; ZHANG, S.; JIANG, S. and LIU, C. “Characterization of edible corn starch nanocomposite films: The effect of self-assembled starch nanoparticles”. Starch Journal, vol. 68, p. 239-248 (2016 a).

SUN, Q.; XIONG, L.; JIANG, S.; LIU, C. e QIN, Y. “Characterization of Starch Nanoparticles Prepared by Nanoprecipitation: Influence of Amylose content and Starch Type”. Industrial Crops and Products, p. 182-190 (2016 b).

YOON, S. and BYUN, H. “Crosslinked potato starch-based blend films using ascorbic acid as plasticizer”. Journal Agric Food Chemistry (2013).

ZHOU, J.; FU, Y.; WANG, Q.; CHANG, Y. and YAN, X. “Effect of drying conditions on crystallinity of amylose nanoparticles prepared by nanoprecipitation”. International Journal of Biological Macromolecules, vol. 97, p. 481-488 (2017).