## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

## FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

## ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

## NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO PRODUZIDAS POR NANOPRECIPITAÇÃO E RETICULAÇÃO QUÍMICA: PROCESSOS E CARACTERIZAÇÃO

### Eng<sub>a</sub>. Rafaela Costa Souza Bicudo *Autora* Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana *Orientadora*

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas - São Paulo Fevereiro, 2011

## FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -UNICAMP

B473n	Bicudo, Rafaela Costa Souza Nanopartículas de ácido hialurônico produzidas por nanoprecipitação e reticulação química: processos e caracterização / Rafaela Costa Souza Bicudo Campinas, SP: [s.n.], 2011.
	Orientador: Maria Helena Andrade Santana. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.
	1. Ácido hialurônico. 2. Nanopartículas. 3. Precipitação (Química). I. Santana, Maria Helena Andrade. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

 Título em Inglês: Hyaluronic acid nanoparticles produced by nanoprecipitation and chemical crosslinking: processes and characterization
Palavras-chave em Inglês: Hyaluronic acid, Nanoparticles, Precipitation (Chemistry)
Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos
Titulação: Mestre em Engenharia Química
Banca examinadora: Sônia Maria Malmonge, Fernanda Martins
Data da defesa: 24/02/2011
Programa de Pós Graduação: Engenharia Química Dissertação de Mestrado defendida por Rafaela Costa Souza Bicudo e aprovada em 24 de fevereiro de 2011 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana

Prof. Dra. Sônia Maria Malmonge

Dra. Fernanda Martins

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Rafaela Costa Souza Bicudo e aprovada pela comissão julgadora em 24 de fevereiro de 2011.

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana

À Deus, que me proporcionou tantos bons companheiros e oportunidades nessa vida, aos meus pais, à minha irmã e ao meu marido, por toda paciência, atenção, apoio e incentivo.

#### AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus, por mais uma oportunidade de aprendizado e crescimento.

Este trabalho só foi possível graças à colaboração de algumas pessoas. Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana pela aceitação, orientação, apoio e incentivo durante todo o período de trabalho.

Agradeço também à Dra. Fernanda Martins por todas as sugestões e auxílio, além da participação na banca examinadora.

À Profa. Dra. Sônia Maria Malmonge, pelas contribuições e sugestões ao longo do trabalho, além da participação na banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Francisco Pessine por auxiliar nas análises de dicroísmo circular, além da participação na banca de qualificação.

Ao Prof. Dr. César Costapinto Santana, por ter disponibilizado o uso do seu laboratório.

Ao técnico Carlos Leite pelo auxílio nas análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Engenharia Química e ao Prof. Dr. Roy Bruns, do Instituto de Química, pelos conhecimentos adquiridos, pela experiência transmitida, por todo apoio e incentivo.

Ao técnico do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos, Gilson Barbosa Maia Jr., pela dedicação, amizade, paciência e criatividade na resolução dos problemas.

A todos os colegas do LDPB, pela amizade, companhia, alegria, auxílio e incentivo diários.

Agradeço em especial aos meus pais e à minha irmã que, mesmo a distância, estiveram sempre presentes me apoiando, me incentivando e rezando por mim.

Ao meu marido, por toda paciência, compreensão, zelo, auxílio e incentivo.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Х

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima."

Louis Pasteur

#### **RESUMO**

O ácido hialurônico (AH) é um mucopolissacarídeo natural, hidrofílico, composto de unidades alternadas de N-acetil-D-glicosamina e ácido D-glucurônico, unidas por ligações β-1,3 e  $\beta$ -1,4. Ele possui diversas aplicações médicas, farmacêuticas e cosméticas, nas quais ele é usado na sua forma nativa ou reticulado, formando hidrogéis de alta viscosidade ou nanopartículas para encapsulação e/ou liberação modificada de bioativos. A produção de partículas de AH é geralmente feita por emulsificação água/óleo, envolvendo tensoativos e reticulação química. Todavia, as partículas produzidas possuem alta polidispersidade e necessitam da posterior remoção do óleo. Portanto, processos livres de óleo e de tensoativos são vantajosos, embora ainda pouco estudados. Neste trabalho, nanopartículas de AH foram produzidas por nanoprecipitação e reticulação química com dihidrazida adípica (ADH) e cloridrato de carbodiimida (EDCl), em processos descontínuo e contínuo, na ausência de óleo e tensoativos. O processo descontínuo foi conduzido em tanque agitado, em escoamento turbulento no seio da solução. Já o processo contínuo foi realizado em um sistema de microcanais de fluxo cruzado, no qual uma solução aquosa de AH, com ADH e EDCl, fluiu no canal principal e a solução orgânica nos dois canais laterais, simultaneamente. Nesse caso, a nanoprecipitação ocorreu em escoamento laminar no interior do microcanal principal, na interface formada entre o solvente orgânico e a água. Em ambos os casos foi estudada a influência dos solventes etanol, álcool isopropílico e acetona nos processos e nas propriedades finais das partículas. Nanopartículas estáveis de AH foram produzidas com os três solventes orgânicos utilizados e em ambos os processos. Todavia, no processo descontínuo, o tamanho das partículas dependeu da tensão superficial do sistema, enquanto no contínuo o tamanho foi dependente da afinidade água-solvente orgânico. Além disso, no processo descontínuo, foi demonstrado que a quantidade usada de solvente orgânico e a ordem e o momento de sua adição influenciam no tamanho final das nanopartículas, que a adição de ADH e EDCl no início do processo não modificou o tamanho das partículas e que o pH influencia na formação dos núcleos de precipitação e na velocidade da reação de reticulação. Já no processo contínuo, além de se analisar a influência do tipo de solvente orgânico, analisou-se a vazão da solução orgânica e a concentração de AH. Ambos os processos são simples, reprodutíveis e produzem, em uma única etapa, nanopartículas de AH livres de óleo e de tensoativos, ampliando suas aplicações médicas, farmacêuticas e cosméticas.

**Palavras-chave:** ácido hialurônico, nanopartículas, nanoprecipitação, solução *bulk*, microcanais

#### ABSTRACT

Hyaluronic acid (HA) is a natural, hydrophilic mucopolisaccharide composed of alternating units of D-glucuronic acid and N-acetylglucosamine joined by  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -1,4 linkages. It has several medical, pharmaceutical and cosmetics applications, in which it is used in its native form or reticulated, forming hydrogels of high viscosity or nanoparticles for encapsulation and controlled delivery of bioactives. The production of HA nanoparticles is usually made by emulsification water/oil, involving surfactants and crosslinking reaction. However, the particles produced have high polydispersity and require the subsequent oil removal. Therefore, processes free of oil and surfactants are advantageous, although still poorly studied. In this study, HA nanoparticles were produced by nanoprecipitation and chemical crosslinking with adipic dihydrazide (ADH) and chloride carbodiimide (EDCl), in discontinuous and continuous processes, in the absence of oil and surfactants. The discontinuous process was conducted in a stirred tank, in a turbulent flow within the solution. The continuous process was conducted in a cross-flow microchannel, in which a HA aqueous solution with ADH and EDCl flowed into the main channel and the organic solution flowed simultaneously in the two side channels. Nanoprecipitation occurred in laminar flow inside the microchannels, formed at the interface between the organic solvent and water. In both cases it was studied the influence of the solvents ethanol, isopropyl alcohol and acetone on the processes and on the final properties of the particles. Stable HA nanoparticles were produced with the three organic solvents used and in both processes. However, in the discontinuous process, the particle size depended on the surface tension of the system, while in the continuous process it was dependent on the affinity water-organic solvent. Besides, in the discontinuous process, it was demonstrated that the quantity of organic solvent used and the order and time of addition influenced on HA nanoparticles final size, that the addition of ADH and EDCl at the beginning of the process did not modify the final particles size, and that the pH influenced on coil globules formation and on the velocity of the crosslinking reaction. In the continuous process, besides analyzing the influence of the organic solvent used, it was analyzed the influence of the organic solvent flow and of HA concentration. Both processes are simple, reproducible and produce, in a single step, HA nanoparticles free of oil and surfactants, extending their medical, pharmaceutical and cosmetic applications.

Key words: hyaluronic acid, nanoparticles, nanoprecipitation, bulk solution, microchannels

AGRADECIMENTOS	ix		
RESUMO			
ABSTRACT xiv			
NOMENCLATURA			
1) INTRODUÇÃO	1		
2) OBJETIVO			
3) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA			
3.1) Ácido Hialurônico	7		
Histórico	7		
Estrutura e Propriedades	7		
Viscoelasticidade	. 10		
• Fontes	. 11		
• Funções	. 11		
Aplicações	. 12		
Mercado	. 13		
3.2) Reticulação	14		
3.3) Propriedades dos solventes orgânicos	21		
3.4) Nanopartículas	28		
Nanopartículas de AH	. 29		
3.5) Métodos de preparação de nanopartículas poliméricas	30		
3.6) Processamento microfluídico	33		
3.7) Caracterização das nanopartículas	39		
Diâmetro médio e polidispersidade	. 39		
Potencial Zeta	. 41		
Morfologia	. 42		
• Estabilidade das dispersões	. 42		
Concentração de AH	. 43		
Tensão superficial	. 43		
Dicroísmo circular	. 44		
4) RESULTADOS E DISCUSSÃO	47		

# SUMÁRIO

4.1) Efeitos dos solventes orgânicos nas nanopartículas de ácido hialurônico obtidas por		
precipitação e reticulação química		
4.2) Influência do pH na produção de nanopartículas de ácido hialurônico por precipitação. 7		
4.3) Síntese de nanopartículas de ácido hialurônico por nanoprecipitação controlada em		
solução <i>bulk</i> ou em canais microfluídicos95		
4.4) Produção de nanopartículas de ácido hialurônico por processo contínuo no interior de		
microcanais: efeitos da concentração de AH e da taxa de vazão relativa119		
5) CONCLUSÕES		
6) SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS139		
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		
8) APÊNDICE		

## NOMENCLATURA

A/O: emulsão água/óleo
ADH: dihidrazida adípica
AH: ácido hialurônico
C <sub>a</sub> : concentração da amostra de AH retirada para análise da concentração
D: coeficiente de difusão de uma partícula (cm <sup>2</sup> /s)
DC: dicroismo circular
d <sub>i</sub> : diâmetro da partícula i presente na distribuição de tamanhos
DLS: espalhamento dinâmico de luz
DVS: divinilsulfona
EDCl: cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
F: força de atração entre duas cargas
FTIR: Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GAGs: glicosaminoglicanos
HNa: hialuronato de sódio
IPA: álcool isopropílico
IPT-SP: Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo
k: constante de Boltzmann
m <sub>a</sub> : massa total de AH que foi liofilizada
m <sub>F</sub> : massa de AH presente no filtrado
MET: microscopia eletrônica de transmissão
MEV: microscopia eletrônica de varredura
n <sub>i</sub> : número de partículas i presentes na distribuição de tamanhos
NHSS: N-hidroxi-sulfo-succinimida
ORD: dispersão óptica rotatória
PAHy: poliaspartil-hidrazida
PEC: polieletrólitos complexos
POE: poli(óxido) de etileno
q ou q*: cargas
R: constante dos gases perfeitos (Pa.m <sup>3</sup> /mol.K)
r: distância (m)
R <sub>h</sub> : raio hidrodinâmico da partícula (m)

SLN: nanopartícula lipídica sólida

T: temperatura (K)

Va: volume da amostra de AH retirada para análise da concentração

V<sub>solvente</sub>: volume molar do solvente (m³/mol)

X<sub>polímero-solvente</sub>: parâmetro de interação polímero-solvente

X<sub>solvente-água</sub>: parâmetro de interação solvente-água

Y: rendimento do processo de ultrafiltração

Z-average: diâmetro médio cumulativo das partículas (nm)

 $\delta_D$ : componente que representa o efeito da força de dispersão de London no parâmetro de solubilidade de Hansen (MPa<sup>0,5</sup>)

 $\delta_{\text{H}}$ : componente que representa o efeito da força de ligação de hidrogênio no parâmetro de solubilidade de Hansen (MPa<sup>0,5</sup>)

 $\delta_P$ : componente que representa o efeito da força de atração ou repulsão devido à polaridade das moléculas no parâmetro de solubilidade de Hansen (MPa<sup>0,5</sup>)

 $\delta_v$ : parâmetro que combina os componentes do efeito da força de dispersão de London ( $\delta_D$ ) e da polaridade ( $\delta_P$ )

 $\Delta\delta$ : diferença entre o parâmetro de solubilidade de Hansen do solvente e da água (Pa<sup>0,5</sup>)

 $\Delta \delta_{\text{pol}\text{imero-solvente}}$ : diferença entre o parâmetro de solubilidade de Hansen do solvente e do polímero (Pa<sup>0,5</sup>)

 $\delta_{água}$ : parâmetro de solubilidade de Hansen da água (Pa<sup>0,5</sup>)

 $\delta_{polímero}$ : parâmetro de solubilidade de Hansen do polímero (Pa<sup>0,5</sup>)

 $\delta_{\text{solvente}}$ : parâmetro de solubilidade de Hansen do solvente (Pa<sup>0,5</sup>)

ε: constante dielétrica de um meio uniforme

 $\eta$ : viscosidade do solvente (Pa.s)

μ: momento de dipolo elétrico permanente (D)

## 1) INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (AH) é um mucopolissacarídeo linear, natural, que contém unidades alternadas de ácido D-glucurônico e N-acetil-glicosamina unidas por ligações  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,4. Ele está presente em todos os vertebrados e também na cápsula de algumas cepas de *Estreptococcus*, mas está ausente em fungos, plantas e insetos (Kogan *et. al.*, 2007).

O AH é um dos principais constituintes do humor vítreo do olho humano, do fluido sinovial das articulações e do cordão umbilical. Entretanto, a maior quantidade de AH reside no tecido cutâneo, estando presente tanto na derme quanto na epiderme. A crista de galo, um pedaço de pele especializada, tem ainda maiores quantidades de AH, atingindo até 7,5 mg/mL (Hascall e Laurent, 1997).

O AH pode imobilizar a água no tecido da pele e dessa forma mudar o volume e a compressibilidade da derme. No fluido sinovial, ele proporciona a lubrificação necessária para as juntas e serve como absorvedor de impacto (Soltes *et. al.*, 2006 *apud* Kogan *et. al.*, 2007). Ele também pode influenciar a proliferação celular, diferenciação e reparação de tecidos, e desempenhar o papel de sequestrador dos radicais livres gerados pelos raios ultravioletas do sol. Por fim, ele é reconhecido por desempenhar importantes papéis na embriogênese, transdução de sinais, mobilidade celular e está associado ao câncer invasivo e à metástase (Kogan *et. al.*, 2007).

O mercado global de AH concentra-se principalmente nos Estados Unidos, Japão e Europa, sendo o Brasil um país em grande crescimento de consumo do mesmo. Estima-se que em 2005 o AH movimentou, sozinho, cerca de 1 bilhão de dólares. Dentro disso, o AH para uso médico apresenta um preço mais elevado, entre US\$40000 e US\$60000 por quilo, enquanto o AH para fins cosméticos tem um valor entre US\$1000 e US\$2000 por quilo.

Atualmente, há um grande interesse por materiais na escala nanométrica, devido ao seu potencial em áreas científicas e tecnológicas, como catálise, materiais optoeletrônicos, tribologia e bioencapsulação e liberação controlada de fármacos (Azevedo, 2002). Na maioria dos trabalhos de nanoencapsulação, os sistemas que se mostraram particularmente interessantes foram os de nanopartículas de polímeros biodegradáveis.

O AH natural é rapidamente degradado *in vivo* tanto pela via enzimática quanto por radicais livres e espécies reativas de oxigênio associadas a respostas inflamatórias (Prestwich *et. al.*, 2004). Além disso, o AH natural é solúvel em água à temperatura ambiente. Por isso, derivados do AH quimicamente modificados têm sido desenvolvidos com melhores

propriedades mecânicas e biológicas para aplicações específicas médicas, farmacêuticas e industriais (Tomihata e Ikada, 1997).

As modificações químicas típicas do AH envolve grupos carboxílicos e/ou grupos hidroxila da cadeia principal. No grupo carboxílico podem ocorrer principalmente reações de esterificação e reações mediadas por carbodiimidas, como a dihidrazida adípica. Já no grupo hidroxila podem ocorrer reações de sulfonação, esterificação, ativação com brometo de cianogênio e oxidações com periodato (Prestwich, 2010).

Segundo Prestwich e colaboradores (1998), a reticulação do AH pode ser realizada com diferentes agentes de reticulação capazes de reagir com o AH nativo ou modificado. Dentre as diferentes possibilidades destaca-se a reticulação do AH com hidrazida adípica (ADH). Na metodologia correntemente empregada, acopla-se a hidrazida aos grupos carboxílicos do ácido glucurônico do AH, em pH entre 4,0 e 4,75, em reação mediada por carbodiimidas.

A reticulação de partículas de AH utilizando ADH possui várias vantagens: o AH nativo é utilizado, a reação química ocorre à temperatura ambiente e em meio aquoso, os subprodutos da reação de reticulação, como uréia e reagentes remanescentes podem ser facilmente removidos pelos métodos convencionais, tais como a diálise, a precipitação e a ultra-filtração, a utilização de reagentes químicos tóxicos como hexano, clorofórmio, cloreto de metileno ou glutaraldeído não é necessária, assim como o uso de equipamentos mecânicos sofisticados (Yun *et. al.*, 2004).

Kubo (2005) realizou um estudo exploratório da influência da velocidade de agitação nas partículas de hialuronato de sódio (HNa) produzidas por emulsificação de uma fase aquosa em óleo mineral (A/O) usando o tensoativo Span 80. Os resultados experimentais mostraram que o diâmetro médio das partículas pode ser reduzido com o aumento da velocidade de agitação, porém o cisalhamento imposto na interface A/O produziu uma grande dispersão de tamanhos de partículas, desde a faixa nanométrica até a micrométrica, que foi a faixa de tamanho dominante. Além disso, o processo de emulsificação necessitou do uso de tensoativo e posterior retirada do óleo através de lavagens com álcool isopropílico.

Visando a eliminação da fase oleosa, Hu *et. al.* (2006) patentearam um processo de produção de nanopartículas de AH livres de tensoativo e de óleo. O processo compreendeu a substituição da fase oleosa por acetona, onde a fase aquosa contendo o HNa foi inicialmente precipitada no solvente orgânico e em seguida reticulada com ADH e cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDCl). A reação de reticulação foi lenta, em torno de 44

horas, porém resultou em partículas de AH, livres de óleo e de tensoativos, com tamanho uniforme de 200 nm.

Do ponto de vista da formulação, a liberdade de escolha dos solventes é particularmente interessante, pois permite que se tenha uma vasta seleção de solventes com os quais se pode formular um grande número de polímeros e fármacos. Além disso, usando diferentes solventes para se preparar as nanopartículas é possível modificar não apenas o tamanho médio das partículas, mas também as suas estruturas interna e externa, como, por exemplo, a porosidade e a rugosidade. Todas essas propriedades das nanopartículas levam à melhora do carreamento de compostos ativos, da cinética de controle e liberação e eventualmente modifica o comportamento biológico das nanopartículas (Galindo-Rodriguez *et. al.*, 2004).

Além do processo descontínuo em tanque agitado, atualmente tem sido também estudada a produção de nanopartículas em processo contínuo, no interior de microcanais. Zhang e colaboradores (2008a e b), por exemplo, apresentaram um método de produção de nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) num sistema de microcanais em fluxo contínuo, através de nanoprecipitação. O sistema foi montado com capilares interconectados, nos quais eram injetadas, simultaneamente, uma fase lipídica solubilizada em solvente orgânico e uma fase aquosa com surfactante. O solvente da fase lipídica se difundia rapidamente para a fase aquosa, resultando na supersaturação de lipídio e consequente formação das SLNs na interface entre os dois fluidos. Outros estudos envolvendo a formação de lipossomas já foram também descritos na literatura (Jahn *et. al.*, 2004, 2007).

Esse trabalho visa o estudo da produção de nanopartículas de AH através da nanoprecipitação, em processos descontínuo e contínuo, ambos na ausência de óleo e tensoativos. Os resultados obtidos serão importantes para aplicações que envolvem a encapsulação e a liberação controlada de fármacos, por se tratar de um processo simples, que não requer etapas posteriores de redução de tamanho e por ser passível de condução em larga escala.

#### 2) **OBJETIVO**

Estudar a produção de nanopartículas de AH através da nanoprecipitação e da reticulação química, na ausência de óleo e de tensoativos, em processos descontínuo e contínuo.

As etapas e aspectos abordados em seu desenvolvimento são:

 1 – Análise da influência do solvente orgânico no processo descontínuo de produção de nanopartículas de AH.

2 – Análise da influência da concentração da solução de AH e da vazão da solução orgânica na produção contínua de nanopartículas de AH.

3 – Comparação das nanopartículas de AH obtidas pelos processos descontínuo e contínuo.

4 – Análise da influência do pH no processo descontínuo de produção de nanopartículas de AH.

## 3) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1) Ácido Hialurônico

#### Histórico

Em 1934, Karl Meyer e John Palmer descreveram um procedimento para isolar um novo glicosaminoglicano do humor vítreo dos olhos de bovinos. Eles mostraram que essa substância continha um ácido urônico, um amino-açúcar e nenhum sulfo-éster, levando ao nome "ácido hialurônico". Isto marcou o nascimento de uma das mais versáteis e fascinantes macromoléculas (Hascall e Laurent, 1997).

#### • Estrutura e Propriedades

O ácido hialurônico (AH) é um mucopolissacarídeo linear, natural que contém unidades alternadas de ácido D-glucurônico e N-acetil-glicosamina unidas por ligações  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,4 . Ele pertence a um grupo de substâncias chamadas glicosaminoglicanos (GAGs). Todavia, ele é muito diferente dos outros GAGs na maioria dos aspectos. Sua estrutura primária é mais simples, é a única não sulfatada e não contém peptídios. Apesar de consistir de apenas uma cadeia polissacarídica como os outros glicosaminoglicanos (Figura 1), sua massa molar é geralmente da ordem de milhões de Daltons. A uniformidade de sua estrutura parece, à primeira vista, restringir suas funções biológicas, mas essa limitação é superada pelo número de sítios de ligação específicos com o AH existentes em outras moléculas ou em superfícies celulares (Fraser *et. al.*, 1997).



B: hidrogênios axiais que contribuem para a face hidrofóbicaFigura 1 – Estrutura química do dissacarídeo do AH

O pK dos grupos carboxílicos nas unidades de ácido glucurônico do AH é entre 3 e 4, dependendo das condições iônicas. Em pH 7, estes grupos estão predominantemente ionizados e a molécula de AH é um poliânion que tem associado a ela contra-íons catiônicos para manter a neutralidade de carga (Hascall e Laurent, 1997). Já o pK total do AH é 2,9.

Todas as várias funções biológicas do AH estão relacionadas com as suas diversas conformações e interações específicas. A conformação do AH pode ser afetada pelo ambiente local, como pela força iônica, pela constante dielétrica local, pela exposição a forças mecânicas perturbadoras e pela presença de espécies que interagem com suas cadeias, tais como proteínas e lipídios (Cowman e Matsuoka, 2005).

Dada a relação entre as propriedades do AH e seu ambiente, em 2004, foi estudado o efeito da força iônica em soluções de AH e foi destacado a grande expansão do volume hidrodinâmico do AH com a diminuição da força iônica da solução (Garg e Hales, 2004). Isso ocorreu devido à característica de polieletrólito do AH. Em solventes não aquosos ele apresenta o mesmo comportamento de um polímero normal. Contudo, em soluções aquosas, seus grupos carregados podem ser rodeados por pequenas cargas opostas (contra-íons). Dessa forma, em soluções aquosas, suas propriedades conformacionais são altamente dependentes da natureza e da concentração dos íons presentes (Van Krevelen, 1990). Resumidamente, os domínios moleculares do AH se contraem em soluções com maiores forças iônicas e se expandem quando em soluções com menores forças iônicas devido ao efeito de repulsão entre os grupos carboxílicos adjacentes ao longo da cadeia de AH (Gatej *et. al.*, 2005).

Em solução fisiológica, a estrutura de uma molécula de AH é reforçada através de uma combinação da estrutura química do dissacarídeo, ligações internas de hidrogênio e interações com o solvente. Os átomos de hidrogênio axiais (indicados na Figura 1) formam uma região não polar, relativamente hidrofóbica, enquanto as cadeias no plano equatorial formam uma face mais polar e hidrofílica, criando uma torção na estrutura da fita. Por isso, uma molécula de AH assume uma estrutura de enovelamento aleatório expandido em soluções fisiológicas e ocupam um grande domínio, como mostrado na Figura 2 (Hascall e Laurent, 1997):



Figura 2 – Modelo da fita de AH num domínio tridimensional (Hascall e Laurent, 1997)

A cor azul da caixa representa o domínio da molécula em solução. A alternância azul e vermelha na fita simboliza a estrutura torcida do AH com partes hidrofílica (faces azuis) e partes hidrofóbica (faces vermelhas). A vista de topo da Figura 2 é apresentada na Figura 3:



Figura 3 – Vista de topo da Figura 2 ilustrando o tamanho médio dos poros e a exclusão parcial de grandes moléculas, apresentadas em amarelo (Hascall e Laurent, 1997)

O domínio estrutural do AH tem interessantes e importantes consequências. Pequenas moléculas, como água, eletrólitos e nutrientes podem se difundir livremente no solvente, dentro do domínio. Contudo, grandes moléculas, como proteínas, são parcialmente excluídas do domínio. Todavia, as cadeias de AH estão constantemente movimentando-se na solução. Com isso, os poros efetivos na rede mudam continuamente de tamanho e posição. Dessa forma, podem existir poros de todos os tamanhos, permitindo que todas as moléculas possam passar através de uma rede de AH, mas com diferentes graus de retardo em função de seus volumes hidrodinâmicos (Hascall e Laurent, 1997).

O AH também se auto-agrega, em parte ajudado pelas ligações entre os fragmentos hidrofóbicos. A estrutura secundária, apresentada na Figura 2, possui propriedades fascinantes: ambas as partes são idênticas, mas um lado da fita corre em sentido oposto ao do

outro lado, sendo então antiparalelas. Com isso, o que é possível de um lado da fita também é possível no outro e, assim, agregados podem crescer a partir de ambos os lados (Hascall e Laurent, 1997).

#### • Viscoelasticidade

A concentração do AH em tecidos é muitas vezes mais elevada do que seria se as moléculas individuais mantivessem seus domínios estruturais expandidos. Em muitos casos, o AH é organizado na matriz extracelular por interações específicas com outras macromoléculas da matriz. No entanto, AH de alta massa molar e em concentração elevada em solução (por exemplo, massa molar de 5 milhões de Daltons em concentrações acima de 0,1 mg/mL) também pode formar redes moleculares emaranhadas através de interações estéricas e auto-agregação entre as moléculas. Essas redes exibem propriedades diferentes do que se teria com moléculas isoladas de AH. Elas podem resistir a fluxos rápidos de fluido e de curta duração, apresentando propriedades elásticas que podem distribuir carga ou forças de cisalhamento dentro da rede (Figura 4). Por outro lado, um fluxo lento e de longa duração pode parcialmente separar e alinhar as moléculas, permitindo sua circulação e exibindo propriedades viscosas. Procedimentos para a introdução de ligações cruzadas covalentes em matrizes de AH têm sido desenvolvidos para criar redes estáveis e materiais semi-sólidos exibindo nítidas propriedades viscoelásticas (Hascall e Laurent, 1997).



Figura 4 – Ilustração das propriedades viscosas e elásticas do AH em soluções (Hascall e Laurent, 1997)

A propriedade mais característica do AH é sua viscoelasticidade no estado hidratado. Tanto a elasticidade quanto a viscosidade são anômalas, ou seja, não são constantes e variam com a taxa de cisalhamento ou movimento oscilatório. Tal comportamento sugere que o AH seja um lubrificante biológico ideal, reduzindo a carga de trabalho em rápidos movimentos, sendo, por isso, abundante nos fluidos sinoviais das juntas, bainhas dos tendões e bolsas sinoviais. Além disso, a viscosidade e a elasticidade estão positivamente relacionadas à massa molar e à concentração, o que deve ser considerado nos diversos usos médicos e cirúrgicos do AH (Fraser *et. al.*, 1997).

#### • Fontes

O AH produzido comercialmente é obtido de materiais ou estruturas de origem animal e/ou de bactérias, através da fermentação ou do isolamento direto.

É quase certo que a maioria dos vertebrados sintetiza AH em algum ponto de sua história natural, sendo essa capacidade reprimida ou ativada em circunstâncias modificadas (Fraser *et. al.*, 1997).

O AH está presente em todos os vertebrados e também na cápsula de algumas cepas de *Estreptococcus*, mas está ausente em fungos, plantas e insetos (Kogan *et. al.*, 2007). Ele é um dos principais constituintes da matriz extracelular e recentemente foi mostrado que também se encontra no espaço intracelular (Evanko e Wight, 2001 *apud* Kogan *et. al.*, 2007).

O AH é um dos principais constituintes do humor vítreo do olho humano, do fluido sinovial das articulações e do cordão umbilical. Entretanto, a maior quantidade de AH (7 a 8 gramas por adulto humano médio; aproximadamente 50% do total existente no corpo) reside no tecido cutâneo, estando presente tanto na derme quanto na epiderme. Curiosamente, a crista de galo, um pedaço de pele especializada, tem quantidades ainda maiores de AH, atingindo até 7,5 mg/mL (Hascall e Laurent, 1997).

Em animais e no homem a meia vida do AH em tecidos varia de um a alguns dias. Ele é catabolizado por endocitoses mediadas por receptores e é degradado por lisossomos no local ou após o transporte através de nódulos linfáticos. Os remanescentes entram na circulação geral e são removidos do sangue, principalmente pelas células endoteliais dos sinusóides hepáticos, com meia vida de 2 a 5 minutos (Fraser *et. al.*, 1997).

#### • Funções

Além de servir como matriz, onde células se alojam, o AH desempenha uma série de funções na pele. Ele pode imobilizar água no tecido e dessa forma mudar o volume e a

compressibilidade da derme. Mudanças observadas com a idade, cicatrização e doenças degenerativas, enfatizam sua importância (Juhlin, 1997 *apud* Kogan *et. al.*, 2007). Ele também pode influenciar a proliferação celular, diferenciação, reparação de tecidos e desempenha papel de sequestrador de radicais livres gerados pelos raios ultravioleta do sol. A luz ultravioleta causa estresse oxidativo nas células e pode prejudicar seu material genético, causando degeneração e morte celular (Kogan *et. al.*, 2007).

Na cartilagem, apesar de seu baixo teor, o AH funciona como elemento estrutural importante da matriz, formando um centro de agregação para o agrecan (Prehm, 2000 *apud* Kogan *et. al.*, 2007).

No fluido sinovial, a alta concentração de AH de alta massa molar proporciona a lubrificação necessária para as juntas e serve como absorvedor de impacto, reduzindo a fricção dos ossos em movimento, diminuindo o desgaste das juntas. Em condições inflamatórias devido a doenças artríticas, como a osteoartrite e a artrite reumatóide, o AH é degradado por espécies reativas de oxigênio, as quais reduzem sua viscosidade e prejudicam suas propriedades lubrificantes e de absorção de impacto, influenciando o movimento e levando à dor (Soltes *et. al.*, 2006 *apud* Kogan *et. al.*, 2007).

Apesar de inicialmente ter-se pensado que a maior importância do AH fosse servir como preenchedor molecular inerte para os tecidos conectivos, estudos e identificações subsequentes de ligações do AH com proteínas e receptores específicos (CD44, RHAMM e ICAM-1) revelaram que o mesmo mediava várias outras atividades funcionais (Tammi *et. al.*, 2002). O AH é hoje reconhecido por desempenhar importantes papéis na embriogênese, transdução de sinais, mobilidade celular e está associado ao câncer invasivo e à metástase (Kogan *et. al.*, 2007). Além disso, apesar de sua estrutura primária simples e uniforme, os polímeros de AH possuem funções biológicas amplas e geralmente opostas dependendo do tamanho da molécula. Longos polímeros são preenchedores de espaço, anti-angiogênese e imunossupressivos, enquanto os de tamanho intermediário, possuindo de 25 a 50 dissacarídeos, são anti-inflamatórios, imuno-estimulantes e altamente angiogênicos. Por fim, pequenos oligossacarídeos são anti-apoptóticos e induzem proteínas de choque térmico, aparecendo quando há sinais endógenos de perigo (Xu *et. al.*, 2002 *apud* Kogan *et. al.*, 2007).

#### • Aplicações

Devido a suas propriedades físico-químicas e a sua biocompatibilidade, o AH possui vasto campo de aplicações nas indústrias farmacêuticas, cosméticas e nas áreas médicas, como na oftalmologia, ortopedia e oncologia.

A primeira aplicação médica do AH no homem foi em um suplemento/substituição do humor vítreo durante uma cirurgia ocular no final da década de 50. O AH utilizado foi isolado inicialmente do cordão umbilical humano e, pouco tempo depois, da crista de galo em um formato altamente purificado e de alta massa molar (Hascall e Laurent, 1997).

O AH não é imunogênico (Holmström e Ricici, 1967 *apud* Kogan *et. al.*, 2007) e por isso possui diversas aplicações como biomateriais, as quais são divididas em cinco grandes grupos, assim classificados por Balazs, em 2004: viscocirurgia – para proteger tecidos delicados e fornecer espaço durante as manipulações cirúrgicas ou em cirurgias oftalmológicas; "viscoaugmentation" ou aumento de volume – para preencher e aumentar os espaços nos tecidos, como na pele, nos músculos esfíncter, nos tecidos vocais e na faringe; viscosseparação – para separar a superfície de tecidos conectivos traumatizados por processos cirúrgicos ou lesões, a fim de evitar adesões e formação excessiva de cicatrizes; viscossuplementação – para substituir ou suplementar fluidos de tecidos, como a substituição do fluido sinovial em artrites dolorosas, e para aliviar a dor; viscoproteção – para proteger superfícies de tecidos saudáveis, feridos ou lesionados, de securas ou agentes nocivos do ambiente, e para promover a cicatrização dessas superfícies (Kogan *et. al.*, 2007).

Na medicina clínica ele é usado como um marcador diagnóstico para várias doenças, como câncer, artrite reumatóide, patologias hepáticas e suplementação de fluido sinovial debilitado em pacientes com artrite. Ele também é usado em certas cirurgias oftalmológicas, na reconstrução de tecidos moles (Kogan *et. al.*, 2007) e em revestimentos hidrofílicos para dispositivos médicos (Yun *et. al.*, 2004). Além disso, o AH é utilizado em cosméticos devido à sua alta capacidade de retenção de água e em sistemas de liberação modificada de fármacos, devido à sua biodegradabilidade.

A massa molar média do AH disponível comercialmente extraído de tecidos animais encontra-se na faixa de várias centenas de milhares a aproximadamente 2,5 MDa (Kogan *et. al.*, 2007).

#### Mercado

O mercado global de AH concentra-se principalmente nos Estados Unidos, Japão e Europa, sendo o Brasil um país com consumo em grande crescimento. Estima-se que em 2005 o AH movimentou, sozinho, cerca de 1 bilhão de dólares. O AH para uso médico apresenta um preço mais elevado, entre US\$40000 e US\$60000 por quilo, enquanto o AH para fins cosméticos tem um valor entre US\$1000 e US\$2000 por quilo.

Segundo Frost e Sullivan (2004), dentro dos segmentos de aplicações do AH, o de viscossuplementação é o maior em termos de vendas mundiais e é esperado que cresça a uma taxa de 11,5% ao ano. Por outro lado, o segmento menos representativo é o de viscosseparação.

O mercado global de tecnologias de carreamento e liberação modificada de fármacos, o qual envolve micro e nanopartículas, movimenta US\$ 25 bilhões em vendas e apresenta um crescimento de 15%. Atualmente existem aproximadamente 130 medicamentos baseados em nanotecnologia no mercado e 125 em estudos clínicos. Do mercado total apontado, 15% referem-se a tecnologias injetáveis (M2 Presswire, 2006).

Apesar de carreadores de liberação modificada de fármacos serem principalmente administrados via injeções, o mercado de *drug delivery* para uso transdérmico tem crescido bastante, principalmente motivado pelo aparecimento de cosméticos baseados em nanotecnologia.

#### 3.2) Reticulação

O AH natural é solúvel em água à temperatura ambiente e é rapidamente degradado *in vivo* tanto pela via enzimática (hialuronidases) quanto por radicais livres e espécies reativas de oxigênio associadas a respostas inflamatórias (Prestwich *et. al.*, 2004). Além disso, mesmo os AH com pesos moleculares mais elevados (cerca de 6,0.10<sup>6</sup>) não apresentam propriedades reológicas ótimas exigidas para uma aplicação viscocirúrgica eficiente e as soluções de AH atualmente utilizadas para viscossuplementação, no tratamento de osteoartrite, não permanecem na articulação por tempo prolongado (Pouyani *et. al.*, 1994).

Por isso, têm sido desenvolvidos derivados do AH quimicamente modificados com melhores propriedades mecânicas e biológicas para aplicações específicas médicas, farmacêuticas e industriais (Tomihata e Ikada, 1997).

A modificação química típica do AH envolve grupos carboxílicos e/ou grupos hidroxila da cadeia principal (Figura 5). Tais grupamentos podem ser utilizados para promover a reticulação entre as cadeias empregando substâncias que possam atuar como agentes de reticulação.



Figura 5 – Fragmento de tetrassacarídeo do AH, mostrando os principais sítios para modificações químicas (Adaptação de Prestwich, 2010).

No grupo carboxílico podem ocorrer principalmente reações de esterificação e reações mediadas por carbodiimidas, como o cloridrato de carbodiimida (EDCl). Já no grupo hidroxila podem ocorrer reações de sulfonação, esterificação, ativação com brometo de cianogênio e oxidações com periodato (Prestwich, 2010).

Várias abordagens têm sido feitas para promover a reticulação nas moléculas de AH. Já foi estudado, por exemplo, o uso da divinilsulfona (DVS) em condições alcalinas, do 1,4butanodiol diglicidil éter, do cloreto de fosforila epicloridrina e do etilenoglicol diglicidil éter como agentes reticulantes (Tomihata e Ikada, 1997).

Tomihata e Ikada (1997) descreveram os resultados da reticulação do AH com carbodiimida solúvel em água (EDCl) que não se liga quimicamente às moléculas polissacarídicas, em contraste com os agentes de reticulação convencionais. Concluiu-se que o AH pode ser reticulado com EDCl, resultando em produtos com baixo teor de água (60 % em massa), se a reação de reticulação ocorrer em altas concentrações de polissacarídeos. A adição, ao meio reacional, de éster L-metil-lisina, com dois grupos amina em sua molécula, produziu filmes de polissacarídeos com maior resistência à degradação hidrolítica que aqueles reticulados apenas através de ligação éster.

Kim e colaboradores (2004) prepararam polieletrólitos complexos (PEC) com diferentes proporções de quitosana e de AH, através de uma reação com polímeros de cargas opostas. A água livre nos filmes PEC aumentou com o aumento do teor de quitosana. Devido ao seu caráter hidrofílico os filmes PEC incharam rapidamente, entraram em equilíbrio em 30 minutos e exibiram altas taxas de intumescimento (250% a 325%) à temperatura ambiente. O grau de intumescimento mostrou-se dependente do pH e da temperatura. Concluiu-se que os filmes obtidos poderiam ser úteis como componentes de órgãos artificiais e/ou aplicados na engenharia de tecidos, devido a sua boa biocompatibilidade e teor de água relativamente alto.

Noh e colaboradores (2006) avaliaram as propriedades mecânicas e morfológicas do hidrogel AH-POE (poli(óxido de etileno)), empregando-se AHs de alta e baixa massa molar na reticulação. O hidrogel com AH de baixa massa molar demonstrou melhores propriedades mecânicas, uma gelificação mais rápida e uma caracterização e manuseio mais fáceis durante o processo experimental. Essas alterações foram apoiadas pelas diferenças morfológicas em sua superfície e seção transversal, onde o hidrogel com AH de baixa massa molar induziu a formação de menores poros em sua superfície e em sua seção transversal. Além disso, o hidrogel com AH de baixa massa molar teve maior densidade de ligações cruzadas e menor absorção de água, indicando que uma estrutura apertada dificulta o deslocamento das cadeias poliméricas, minimizando sua exposição às moléculas de água.

Pitarresi e colaboradores (2007) combinaram o AH com um poliaminoácido sintético, o poliaspartil-hidrazida (PAHy), para a obtenção de nanopartículas com propriedades físicoquímicas adequadas e baixa taxa de degradação pela hialuronidase. A reação de reticulação foi realizada em uma microemulsão água/óleo, utilizando-se Span 85 como tensoativo, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) cloridrato de carbodiimida (EDCl) e sal sódico de N-hidroxi-sulfosuccinimida (NHSS) para se obter uma reticulação eficiente entre os grupos carboxílicos do AH e os grupos hidrazida do PAHy. O procedimento foi de fácil realização, forneceu produtos com elevado rendimento e não foi necessário o uso de solventes clorados tóxicos. As nanopartículas obtidas eram insolúveis em água e em solventes orgânicos comuns, sugerindo que o AH e o PAHy estavam ligados entre si através de ligações covalentes, o que foi confirmado pela análise FTIR.

Segundo Prestwich e colaboradores, a reticulação do AH pode ser realizada com diferentes agentes de reticulação que possam reagir com o AH nativo ou modificado. Dentre as diferentes possibilidades destaca-se a metodologia que emprega a modificação do AH com hidrazida adípica (ADH) originando um AH-ADH, como mostra a Figura 6:



Figura 6 – Representação esquemática da reação de reticulação de AH empregando ADH (Prestwich *et. al.*, 2001 *apud* Yun *et. al.*, 2004)

Nessa metodologia ocorre um acoplamento controlado da hidrazida aos grupos carboxílicos do AH, em pH entre 4,0 e 4,75, em reação mediada por carbodiimidas (como o EDCl). A ligação da ADH aos grupos carboxílicos, sob condições brandas, resulta na disponibilidade de grupos funcionais amino pendentes na hidrazida, dispostos ao longo da estrutura do AH. Modificações nos grupos funcionais carboxílicos disponíveis podem ser feitas para produzir hidrogéis para diversas necessidades. Além disso, o tipo de tampão e sua concentração, o pH, a concentração de AH, a razão da hidrazida pelos grupos carboxílicos do AH e a razão de hidrazida para o EDCl podem ser variados para produzir materiais com diferentes propriedades (Prestwich *et.al.*, 1998).

Pouyani e colaboradores, em 1994, descreveram uma metodologia para modificação química de AHs de alta massa molar (1,5.10<sup>6</sup>), utilizando dihidrazidas e grupos homobifuncionais, ilustrando como grupos pendentes da dihidrazida podem ser empregados para introduzir reticulações covalentes no AH e produzir novos hidrogéis (Figura 7). Hialuronato de sódio foi dissolvido em água para uma concentração final de 4 mg/mL. Um grande excesso de ADH foi adicionado e o pH da mistura foi ajustado para 4,75, que tinha sido previamente determinado como ideal para a reação de ligação AH-ADH. A adição de

EDCl causou aumento no pH, e ele foi mantido em 4,75 pela adição de HCl 0,1 N por aproximadamente 2 horas. O pH foi então aumentado para 7,0 pela adição de NaOH 1 N e a mistura reacional foi purificada por diálise para remover os reagentes e subprodutos. AH-ADH (Figura 7) foi então isolado como uma massa fibrosa branca após a liofilização. Por fim, diferentes ésteres homobifubncionais foram reticulados ao conjunto AH-ADH, formando novos hidrogéis com diferentes estruturas.



Figura 7 – Modificação do AH feita pela hidrazida (ADH)

Além de disponíveis para reações de reticulação, os grupos carboxílicos do AH são grupos de reconhecimento da hialuronidase e de ligação com receptores, como CD44 e LYVE-1. Baseado nisso, Oh e colaboradores (2007) modificaram quimicamente o AH ligando-o ao ADH, através dos grupos carboxílicos, em solução aquosa e em uma mistura água/etanol. Além disso, o AH foi modificado quimicamente com a divinilsulfona (DVS), a qual se liga nos grupamentos hidroxila. Testes de degradação *in vivo* e *in vitro* mostraram que hidrogéis AH-DVS degradaram mais rapidamente, seguidos pelos AH-ADH em água e por fim os AH-ADH na mistura água/etanol, confirmando que modificações feitas nos grupos carboxílicos contribuem para uma degradação controlada dos hidrogéis.
Com o uso de ADH, Yun e colaboradores (2004) obtiveram microesferas de AH biodegradáveis e robustas em meio aquoso. Além disso, demonstraram a utilidade das mesmas incorporando DNA antes da derivatização. Foi mostrado que as microesferas permaneceram estruturalmente intactas, que o DNA foi liberado por aproximadamente 2 meses, foi capaz de transfectar células em cultura e de atingir receptores celulares específicos para distinguir células que expressavam E-selectina e P-selectina. Além disso, Yun e colaboradores concluíram que preparar microesferas de AH utilizando ADH apresenta várias vantagens: o AH nativo pode ser utilizado, a reação química ocorre à temperatura ambiente e em meio aquoso, os subprodutos da reação de reticulação, como uréia e reagentes remanescentes, podem ser facilmente removidos pelos métodos convencionais, como diálise, precipitação e ultra-filtração, a utilização de reagentes químicos tóxicos como hexano, clorofórmio, cloreto de metileno ou glutaraldeído não é necessária, assim como o uso de equipamentos mecânicos sofisticados.

Kubo (2005) realizou um estudo exploratório da influência da velocidade de agitação nas partículas de hialuronato de sódio (HNa) produzidas por emulsificação de uma fase aquosa em óleo mineral (A/O) usando o tensoativo Span 80. Os resultados experimentais mostraram que o diâmetro médio das partículas pôde ser reduzido com o aumento da velocidade de agitação, porém o cisalhamento imposto na interface A/O produziu grande dispersão no tamanho das partículas, desde a faixa nanométrica até a micrométrica, que foi a faixa de tamanho dominante. Apesar da boa qualidade das partículas de HNa reticuladas com ADH, em termos de superfície, propriedades de mucoadesão, encapsulação e liberação de ovoalbumina, as partículas apresentaram-se muito polidispersas. Além disso, para o processo de emulsificação foi necessário o uso de tensoativo e posterior retirada do óleo através de lavagens com álcool isopropílico.

Visando a eliminação da fase oleosa, Hu e colaboradores (2006) patentearam um processo de produção de nanopartículas de AH livres de tensoativo e de óleo. O método compreende a substituição da fase oleosa por acetona, onde à fase aquosa, contendo o HNa, foi adicionado o solvente orgânico e, em seguida, HNa foi reticulado com ADH e cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDCl). Os autores separaram a acetona e o excesso de ADH e EDCl através de diálise contra água deionizada. A reação de reticulação (Figura 8) foi lenta, em torno de 44 horas, porém resultou em partículas de AH livres de óleo e de tensoativos, e com um tamanho uniforme de 200 nm.



Figura 8 – Mecanismo proposto para a reação de reticulação entre as cadeias de AH, ADH e EDCl

EDCl funcionou como catalisador da reação de reticulação entre as cadeias de AH e ADH. Carbodiimidas N-substituídas do EDCl (b) reagiram com os ácidos carboxílicos das cadeias de AH (a) para formar derivados altamente reativos de O-acilisourea (c) que apresentaram tempo de vida muito curto. As duas terminações das espécies ativas reagiram então com aminas primárias da ADH (d) resultando em cadeias de AH vizinhas sendo quimicamente reticuladas (e). As vantagens dessa invenção são que a reação pôde ocorrer à temperatura ambiente, com reagentes convencionais disponíveis, apresentou alta eficiência e obtiveram-se partículas com estreita faixa de distribuição granulométrica. Quanto maior era o tempo de duração do método menor era a variação do tamanho das partículas. Além disso, a baixa variação indicou que houve auto-agregação das partículas, em contraste com o simples empacotamento individual das moléculas que usualmente leva à agregação com uma ampla faixa de distribuição granulométrica. Nessa mistura as cadeias de AH tenderam a se autoagregar devido ao solvente empregado. Por fim, vantajosamente, o tamanho e a distribuição dessas partículas puderam ser controlados por uma variedade de parâmetros, como a concentração do polímero, a razão entre água e acetona, a temperatura de reação e o tempo de duração (Hu *et. al.*, 2006).

## 3.3) Propriedades dos solventes orgânicos

Uma forma de analisar a influência dos solventes na nanoprecipitação é através do valor de log P, o qual é definido como o logaritmo do coeficiente de partição de uma substância no padrão 1-octanol/água (Tabela 1):

Solvente	Log P		
Dimetilsulfóxido	-1,3		
1,4 - Dioxano	-1,1		
Dimetilformamida	-1		
Metanol	-0,76		
Acetonitrila	-0,33		
Etanol	-0,24		
Acetona	-0,23		
n-Propanol	0,28		
Butanona	0,29		
Acetato de etila	0,68		
n-Butanol	0,8		
Éter dietílico	0,85		
Acetato de butila	1,7		
Éter dipropílico	1,9		
Benzeno	2		
Clorofórmio	2		
Tolueno	2,5		
Éter dibutílico	2,9		
Pentano	3		
Tetraclorometano	3		
Xileno	3,1		
Ciclo-hexano	3,2		
Hexano	3,5		
Heptano	4		
Octano	4,5		
Dodecanol	5		
Decano	5,6		
Dodecano	6,6		
Dioctil ftalato	9,6		

Tabela 1 – Valores de log P para alguns solventes (Adlercreutz et. al., 2000)

A polaridade de uma molécula depende da presença de um momento de dipolo elétrico permanente ( $\mu$ ) em sua estrutura, o qual depende da separação (distância r) das cargas positivas e negativas, constituindo uma medida da tendência da molécula em se orientar em um campo elétrico. Assim define-se  $\mu = q.\bar{r}$ , uma grandeza vetorial que é descrita tanto por seu módulo, em unidades Debye (D), como pela sua direção e sentido. Moléculas que possuem  $\mu \neq 0$  são ditas polares e as que possuem  $\mu = 0$  são apolares.

A constante dielétrica de um meio uniforme (ε) é uma grandeza que mede a capacidade de interação do solvente com o soluto e é definida pela Equação 1:

$$F = q.q^* / \varepsilon.r^2$$
(Equação 1)  
onda E á a força da atração antre duas cargas a a a\* separadas por uma distância r

onde F é a força de atração entre duas cargas q e q\* separadas por uma distância r.

Quanto maior a constante dielétrica do meio, menor a força de atração entre as cargas, o que significa uma boa capacidade de solvatar íons, mantendo-os dissociados em solução. A água, por exemplo, é um dos líquidos com maior constante dielétrica ( $\epsilon \cong 80$ ).

Os valores do momento de dipolo elétrico ( $\mu$ ) e da constante dielétrica ( $\epsilon$ ) de diferentes solventes são apresentados na Tabela 2:

Solvente	Ponto de Ebulição (℃)	Constante Dielétrica	Densidade (g/cm³)	Momento Dipolo (D)
Pentano	36	1,84	0,626	0
Ciclopentano	40	1,97	0,751	0
Hexano	69	1,88	0,655	0
Ciclo-hexano	81	2,02	0,779	0
Benzeno	80	2,3	0,879	0
Tolueno	111	2,38	0,867	0,36
1,4 - Dioxano	101	2,3	1,033	0,45
Clorofórmio	61	4,81	1,498	1,04
Éter dietílico	35	4,3	0,713	1,15
Diclorometano	40	9,1	1,327	1,6
Tetra-hidrofurano	66	7,5	0,886	1,75
Acetato de etila	77	6,02	0,894	1,78
Acetona	56	21	0,786	2,88
Dimetilformamida	153	38	0,944	3,82
Acetonitrila	82	37,5	0,786	3,92
Dimetilsulfóxido	189	46,7	1,092	3,96
Ácido Fórmico	101	58	1,21	1,41
n-Butanol	118	18	0,81	1,63
Isopropanol	82	18	0,785	1,66
n-Propanol	97	20	0,803	1,68
Etanol	79	30	0,789	1,69
Metanol	65	33	0,791	1,7
Ácido Acético	118	6,2	1,049	1,74
Água	100	80	1	1,85

Tabela 2 – Tabela com algumas propriedades de alguns solventes (Adaptada de Lowery e

Richardson, 1987)

O interesse no uso de alcoóis como não-solventes na nanoprecipitação está essencialmente em suas baixas constantes dielétricas. Quanto menor a constante dielétrica, menos o não-solvente irá dissolver componentes hidrofílicos. Além disso, alcoóis não são uma preocupação em relação à toxicidade, com exceção do metanol. Entretanto, é importante mencionar que a nanoprecipitação é dificultada quando a diferença entre os valores das constantes dielétricas dos solventes e não-solventes é grande (Bilati *et. al.*, 2005).

Segundo Bilati e colaboradores (2005), quanto menor o valor da constante dielétrica do solvente, maior o tamanho final das nanopartículas. Na realidade, a constante dielétrica do solvente não é a única responsável pelo aumento do tamanho das nanopartículas, já que a nanoprecipitação resulta de vários fenômenos que governam a difusão do solvente para o não-solvente. Assim, é esperado que a escolha do solvente e do não-solvente afete a taxa de

difusão e, consequentemente, o tamanho final das partículas mais que as características individuais do solvente. Dessa forma, a afinidade do solvente pelo não solvente é importante e, por isso, o parâmetro de interação (X) deve ser levado em consideração. Essa interação é expressa pela Equação 2:

$$X_{solvente-água} = \frac{V_{solvente}}{RT} (\delta_{solvente} - \delta_{água})^2$$
(Equação 2)

Segundo Bilati e colaboradores (2005), quanto maior o parâmetro de interação, maiores serão as nanopartículas. Para obter esses parâmetros de interação é necessário calcular os parâmetros de solubilidade de Hansen dos solventes ( $\delta$ ), dados pela Equação 3, os quais se baseiam na força de dispersão de London ( $\delta_D$ ), nas forças de atração ou repulsão devido à polaridade das moléculas ( $\delta_P$ ) e nas forças de ligação de hidrogênio ( $\delta_H$ ), apresentadas na Tabela 3:

Tabela 3 – Valores dos parâmetros de solubilidade de Hansen para alguns solventes (Adaptada de Hansen, 2007)

Solvente	Força de dispersão (δ <sub>D</sub> )	Polaridade ( $\delta_P$ )	Ligação de hidrogênio (δ <sub>н</sub> )
Hexano	14,9	0	0
Benzeno	18,4	0	2
Tolueno	18	1,4	2
Clorofórmio	17,8	3,1	5,7
Éter dietílico	14,5	2,9	4,6
Acetato de etila	15,8	5,3	7,2
Diclorometano	17	7,3	7,1
1,4 - Dioxano	17,5	1,8	9
Tetra-hidrofurano	16,8	5,7	8
Acetona	15,5	10,4	7
Dimetilformamida	17,4	13,7	11,3
Acetonitrila	15,3	18	6,1
Dimetilsulfóxido	18,4	16,4	10,2
Ácido Fórmico	14,6	10	14
n-Butanol	16	5,7	15,8
Isopropanol	15,8	6,1	16,4
n-Propanol	16	6,8	17,4
Etanol	15,8	8,8	19,4
Metanol	14,7	12,3	22,3
Ácido Acético	14,5	8	13,5
Água	15,5	16	42,3

Então, utilizando a Equação 3 para obter os parâmetros de solubilidade de Hansen, substituindo os valores na Equação 2, considerando a temperatura de 21°C (294 K) e a constante dos gases perfeitos igual a 8,314 Pa.m<sup>3</sup>/mol.K, obtém-se os parâmetros de interação, os quais estão apresentados na Tabela 4.

$$\Delta \delta = \left(\delta_{solvente} - \delta_{\acute{a}gua}\right) = \left(\left(\delta_{D,solvente} - \delta_{D,\acute{a}gua}\right)^2 + \left(\delta_{P,solvente} - \delta_{P,\acute{a}gua}\right)^2 + \left(\delta_{H,solvente} - \delta_{H,\acute{a}gua}\right)^2\right)^{0.5}$$
(Equação 3)

Tabela 4 - Parâmetros de solubilidade de Hansen e de interação solvente/água para alguns

 $(\Delta \delta) (Pa^{0,5})$ Solvente Х Hexano 4,53E+04 110,06 4,35E+04 Benzeno 68,62 Tolueno 4,29E+04 80,11 Clorofórmio 3,89E+04 49,25 Éter dietílico 3,99E+04 67,75 Acetato de etila 3,67E+04 54,26 3,63E+04 Diclorometano 34,48 1,4 - Dioxano 3,62E+04 45,85 Tetra-hidrofurano 3,58E+04 42,74 Acetona 3,58E+04 38,6 Dimetilformamida 3,11E+04 30,71 Acetonitrila 3,62E+04 28,07 Dimetilsulfóxido 3,22E+04 30,4 Ácido Fórmico 2,89E+04 13,02 n-Butanol 2,84E+04 30.26 2,77E+04 Isopropanol 24,07 n-Propanol 2,66E+04 21,57 Etanol 2,40E+04 13,76 Metanol 2,03E+04 6,86 Ácido Acético 2,99E+04 20,94 Etil-lactato 3,22E+04 48,62 Água 0,00E+00 0

solventes

Em 1994 e 1996 Volpi estudou a influência dos solventes acetona, metanol, etanol e propanol na precipitação de polissacarídeos semelhantes ao AH, apresentando, dentre outros, os grupos ácido D-glucurônico e N-acetil-glicosamina. Os estudos concluíram que com o aumento da cadeia carbônica do solvente (do grupo metil para o propil) há maior capacidade de precipitar polissacarídeos dispondo-se de menores quantidades de solvente.

Thioune e colaboradores (1997) estudaram a nanoprecipitação do pseudolátex em sistemas com a acetona ou a mistura acetona/água como solventes. Os resultados obtidos sugeriram que as cadeias poliméricas estavam organizadas de forma que o seu volume hidrodinâmico estava maior na mistura acetona/água que no solvente acetona. Além disso, o polímero na mistura solvente/água estava próximo à precipitação. Assim, quando a fase orgânica foi introduzida na aquosa, a difusão de pequena quantidade de acetona para a água (e/ou vice-versa) causou a precipitação do polímero. Dessa forma, quando o polímero precipita no sistema com a mistura acetona/água como solvente, menos agregação ocorre. Além disso, como as cadeias poliméricas estão mais associadas na acetona, os polímeros tendem a precipitar como partículas maiores. Todavia, esse fenômeno não foi observado quando a concentração de polímeros na acetona foi baixa, pois nesse caso a interação entre as moléculas poliméricas era menor devido à alta diluição.

Galindo-Rodriguez e colaboradores (2004) estudaram as propriedades físico-químicas de fases aquosas e orgânicas em meios de produção de nanopartículas de poli(ácido metacrílico-co-acrilato de etila), Eudragit L 100-55, na presença do álcool polivinil como agente emulsificante, as quais foram obtidas pelos processos de "salting-out", emulsificaçãodifusão e nanoprecipitação. No processo de nanoprecipitação a concentração crítica, na qual os polímeros passaram a formar agregados amorfos, foi 32,4 mg/mL. Esse comportamento pode ser explicado pela concentração de cadeias poliméricas e pela influência dessa concentração na viscosidade. Primeiramente, como consequência da grande concentração de cadeias poliméricas, a difusão do solvente para a fase aquosa carregou mais cadeias poliméricas que se agregaram formando então nanopartículas maiores. Esse fenômeno também foi favorecido pelo fato de que o aumento da concentração polimérica aumentou as interações entre os polímeros, o que significa que um maior número de cadeias poliméricas permaneceu associado durante a difusão. Por outro lado, o aumento da concentração polimérica provocou o aumento da viscosidade da fase orgânica, aumentando a resistência à transferência de massa. Dessa forma, a difusão da fase orgânica para a aquosa é diminuída e partículas maiores são formadas.

A escolha do sistema ternário polímero/solvente/não solvente é fundamental para o sucesso do método. Apesar de ainda não existirem informações claras sobre a influência de cada um dos três componentes do sistema, em geral, os estudos apontam a importância das propriedades de solubilidade do solvente do polímero e da concentração do polímero (<2%) para o controle do processo de nanoprecipitação e das propriedades das nanopartículas (Legrand et. al., 2007).

Considerando que as interações solvente-água (não-solvente) desempenham importante papel durante a difusão, Galindo-Rodriguez e colaboradores (2004) usaram, inicialmente, os parâmetros de solubilidade dos solventes para explicar as tendências. Uma primeira exigência foi que os parâmetros de solubilidade do soluto e do solvente não diferissem muito. Quanto menor essa diferença, maior a afinidade entre eles. Uma maior afinidade entre a água (não-solvente) e o solvente, correspondendo a menores parâmetros de solubilidade de Hansen ( $\Delta\delta$ ), pôde melhorar a difusão do solvente para a fase externa aquosa, levando à obtenção de menores nanopartículas.  $\Delta\delta$  aumentou na seguinte ordem: etanol, dimetil sulfóxido, álcool isopropílico, etil-lactato, acetona, enquanto o tamanho das nanopartículas aumentou na seguinte ordem: etanol, dimetil sulfóxido, álcool isopropílico, acetona, etil-lactato. Já que o  $\Delta\delta$  não relacionou completamente o tamanho das partículas com a afinidade solvente-água (não-solvente), uma análise adicional foi feita determinando-se o parâmetro de interação solvente-água (X). A correlação, a qual seguiu a mesma ordem de aumento do tamanho das partículas, confirmou que solventes com maior afinidade pela água, evidenciados por menores valores de X, tenderam a promover a difusão do solvente e a partição das cadeias poliméricas para a fase aquosa, resultando na formação de menores partículas. Nesse estudo a interação polímero-solvente não foi considerada devido à impossibilidade de cálculo teórico do parâmetro de solubilidade total do polímero e consequentemente dos valores  $\Delta \delta_{\text{polímero-solvente}}$  e X<sub>polímero-solvente</sub>.

Choi e colaboradores (2002) estudaram a influência da interação polímero-solvente na produção de nanopartículas de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA). Eles demonstraram que quanto maior o parâmetro de interação entre o polímero e o solvente  $(X_{polímero-solvente})$ , menor a afinidade entre eles e menores as nanopartículas. Para maior afinidade entre o solvente e o polímero, maiores pontos de supersaturação foram produzidos. Dessa forma, maiores nanopartículas foram formadas. Assim, confirmou-se que a mobilidade do solvente para o não-solvente é dificultada por uma grande afinidade pelo polímero e favorecida por uma grande afinidade pelo não-solvente.

Além da influência na produção das nanopartículas de AH, o solvente influencia a conformação do polímero. Oh e colaboradores (2007) modificaram quimicamente o AH ligando-o à ADH, através dos grupos carboxílicos, em solução aquosa e em uma mistura água/etanol. O grau de modificação do ADH na mistura etanol/água foi maior que na água, o que deve ter ocorrido pela diferente estrutura conformacional do AH nos diferentes meios, como foi confirmado pela análise H-NMR. A estrutura helicoidal do AH na água pode ser

desordenada na mistura com etanol, contribuindo para um maior grau de modificação do ADH.

Do ponto de vista da formulação, a liberdade de escolha dos solventes é particularmente interessante, pois permite que se tenha vasta seleção de solventes, com os quais se pode formular grande número de polímeros e fármacos. Além disso, usando diferentes solventes para preparar as nanopartículas, é possível modificar não apenas o tamanho médio das partículas, mas também suas estruturas interna e externa, como, por exemplo, a porosidade e a rugosidade. Todas essas propriedades levam à melhoria do carreamento de fármacos, da cinética de controle e liberação e eventualmente modifica o comportamento biológico das nanopartículas (Galindo-Rodriguez *et. al.*, 2004).

#### 3.4) Nanopartículas

Nanopartículas são partículas com diâmetros na faixa de 1 a 1000 nm. Nesta faixa de tamanho, predominam as propriedades materiais, ou de conjunto, em relação às propriedades das moléculas isoladas. Neste âmbito, denominam-se esferas aqueles sistemas em que as moléculas encapsuladas encontram-se homogeneamente dispersas no interior da matriz polimérica, formando um sistema onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. Cápsulas, ao contrário, constituem os chamados sistemas do tipo reservatório, onde é possível identificar um núcleo diferenciado, que pode ser sólido ou líquido. Nesse caso, a substância encapsulada encontra-se envolvida por uma membrana, geralmente polimérica, isolando o núcleo do meio externo. A diferença morfológica entre esfera (sistema polimérico matricial) e cápsula (sistema polimérico do tipo reservatório) está ilustrada na Figura 9 (Azevedo, 2002):



Figura 9 – Diferença morfológica entre esfera (A) e cápsula (B) (Adaptado de Azevedo, 2002)

Nos últimos anos, o desenvolvimento de nanopartículas como sistemas efetivos de liberação de fármacos tem sido o interesse comum de vários pesquisadores. Estes sistemas têm vantagens exclusivas pertencentes ao seu tamanho sub-micrométrico e sub-celular, tais como a possível administração por várias rotas e a elevada capacidade de atravessar várias barreiras fisiológicas, como a mucosa intestinal e a barreira hemato-encefálica. Além disso, elas apresentam muitas vantagens em comparação com outros sistemas coloidais de liberação, como a proteção dos compostos ativos contra a degradação, a capacidade de gerar uma liberação controlada e a internalização celular, bem como a capacidade de reverter a resistência das células tumorais a múltiplos fármacos (Pitarresi *et. al.*, 2007).

Em geral, as principais vantagens desses sistemas de liberação são:

- Maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco, a partir da degradação da matriz;
- Diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação;
- Natureza e composição dos veículos variada e, ao contrário do que se poderia esperar, não há predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (bioinativação prematura);
- Administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses);
- Direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas;
- Tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas podem ser incorporadas.

Os sistemas de nanopartículas de polímeros biodegradáveis foram os que se mostraram particularmente interessantes na maioria dos trabalhos. Várias patentes relacionadas a esses sistemas foram relatadas nos últimos anos, como nanopartículas vazias compostas de proteínas com capacidade para biorreconhecimento molecular, auxiliadas por um transportador na liberação para células específicas, preparação de nano e microesferas através da polimerização em micelas reversas ou mesmo novas formulações de comprimidos com resistência gástrica, utilizando como componentes a polivinilpirrolidona reticulada, alginato de sódio, goma xantana e bicarbonato de sódio (Azevedo, 2002).

#### • Nanopartículas de AH

Formas derivatizadas e/ou reticuladas do AH têm sido utilizadas para produzir nanopartículas. Para isso usam-se estratégias como esterificação, acrilação e reticulação do AH utilizando divinil sulfona ou éter glicídico. No entanto, as estratégias de reação química utilizadas não são projetadas para reticulações do AH em condições fisiológicas (em meio aquoso, em pH de 6,5 à 8,0). Existe ainda uma necessidade de que essas partículas sejam compostas apenas de AH, ao invés da mistura de dois ou mais polímeros (Mohapatra *et. al.,* 2007).

Na patente de Fernandez e colaboradores (2006) foram obtidas nanopartículas de hialuronato de sódio (HNa) através da agitação de uma solução de HNa com soluções contendo um polímero catiônico (quitosana) e um sal polianiônico do grupo fosfato. Além disso, um ingrediente ativo estava dissolvido em uma das soluções. A incorporação de ingredientes ativos em sistemas nanométricos torna mais fácil a penetração dessas moléculas através das barreiras epiteliais e as protege de serem degradadas. Por isso, sistemas de nanopartículas capazes de interagir com essas barreiras, como é o caso dos sistemas contendo nanopartículas de AH, são apresentados como estratégia promissora para a entrada de ingredientes ativos através das mucosas.

## 3.5) Métodos de preparação de nanopartículas poliméricas

Existem vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas, os quais podem ser, de uma forma geral, classificados em métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos ou métodos baseados na precipitação de polímeros pré-formados. A Figura 10 apresenta as principais etapas de alguns dos diferentes métodos de preparação de nanopartículas:



\*\*\*Componente empregado apenas na preparação de nanocápsulas

Figura 10 – Métodos usuais empregados na preparação de nanopartículas poliméricas, baseados na utilização de monômeros dispersos (A e B) ou na precipitação de polímeros préformados (C) – (Adaptado de Schaffazick *et. al.*, 2003)

Os processos "salting-out", emulsificação-difusão e nanoprecipitação são exemplos típicos do método de precipitação de polímeros pré-formados. Essas técnicas permitem a modulação da morfologia, da estrutura interna, das características físico-químicas, da eficiência de encapsulação de fármacos e da cinética de liberação (Gallindo-Rodriguez, 2004).

A técnica de nanoprecipitação (ou método de deslocamento do solvente), para a produção de nanopartículas, foi primeiramente desenvolvida e patenteada por Fessi e colaboradores. Essa técnica apresenta inúmeras vantagens, como ser simples, rápida e fácil de ser desenvolvida. A formação das nanopartículas é instantânea e todo o procedimento é realizado em apenas uma etapa. Ela requer o uso de dois solventes miscíveis. Idealmente, o polímero e o ativo devem ser solúveis em um dos solventes, mas não no segundo (não-solvente). A nanoprecipitação ocorre por uma rápida dessolvatação do polímero quando sua solução é adicionada ao não-solvente. Assim que o solvente difunde para o não-solvente o polímero precipita, envolvendo imediata incorporação do ativo. Essa rápida formação das nanopartículas é governada pelo efeito Marangoni, o qual é devido às turbulências interfaciais

que ocorrem na interface entre solvente e não-solvente e resulta no complexo fenômeno de fluxo, difusão e variações nas tensões superficiais. A nanoprecipitação geralmente possibilita a formação de pequenas partículas (100-300 nm) com distribuição unimodal estreita, e pode ser usada com uma ampla gama de polímeros pré-formados. Esse método não requer o uso de altas taxas de agitação, cisalhamento, sonicação ou temperaturas muito altas e é caracterizado pela ausência de interfaces óleo-água, condições que poderiam danificar compostos sensíveis, como as proteínas. Além disso, tensoativos nem sempre são necessários, e solventes orgânicos tóxicos inaceitáveis são geralmente excluídos desse procedimento (Bilati *et. al.,* 2005).

A nanoprecipitação tem sido um processo promissor para a preparação de nanopartículas poliméricas, bem como para encapsulação de componentes ativos, incluindo proteínas lábeis. Este método tem as vantagens de utilização do polímero pré-formado como matéria-prima em vez de monômeros, utilização de uma grande variedade de polímeros naturais ou sintéticos e de solventes não tóxicos (Stainmesse *et. al.*, 1995).

Suspensões coloidais normalmente não possuem tendência à separação de fases até alguns meses após a preparação, pois o processo de sedimentação é lento para partículas submicrométricas, sendo minimizado pelo movimento Browniano. No entanto, com o tempo, pode ocorrer agregação das partículas e, consequentemente, sedimentação. Vários fatores influenciam a estabilidade das suspensões coloidais, como, por exemplo, a adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas e a presença de tensoativos adsorvidos (Schaffazick *et. al.*, 2003).

A aplicabilidade industrial de nanopartículas dispersas em meio aquoso pode ser limitada, devido aos problemas de baixa estabilidade físico-química, em períodos de armazenamento prolongados. As principais limitações são a agregação das partículas, a estabilidade química do polímero, do fármaco ou de outras matérias-primas e, ainda, a liberação prematura da substância ativa. Além disso, é importante enfatizar que formas farmacêuticas líquidas são propensas à proliferação microbiana, havendo necessidade de adição de conservantes (Schaffazick *et. al.*, 2003).

Uma estabilidade físico-química limitada, em função do tempo, constitui um obstáculo para a aplicabilidade industrial das suspensões aquosas de nanopartículas. Tendo em vista que problemas físico-químicos e microbiológicos podem ser retardados ou evitados através da secagem, vêm crescendo o interesse pelo desenvolvimento de formas farmacêuticas de nanopartículas sólidas, ampliando as perspectivas para a utilização clínica destes sistemas. Para promover a desidratação de sistemas coloidais, operações de sublimação (liofilização) ou de aspersão (*spray-drying* ou nebulização) têm sido utilizadas, principalmente em lipossomas e nanoesferas (Schaffazick *et. al.*, 2003).

#### 3.6) Processamento microfluídico

Processamentos em microcanais, que utilizam os princípios da microfluídica, são classificados como do tipo "bottom up", no qual nanopartículas são obtidas em uma só etapa. Este tipo de processamento é baseado nas propriedades moleculares de auto-organização sob o controle termodinâmico, no qual átomos e moléculas formam nanoestruturas através do controle das reações químicas envolvidas. A estrutura final resulta das intervenções químicas, físicas e do processo aplicadas no balanço de força intermolecular e intramolecular dos componentes do sistema (Sanguansri e Augustin, 2006).

A concepção e a produção de objetos em escala nanométrica, como pontos quânticos, partículas coloidais e vesículas, podem ser realizadas em operação descontínua, pela síntese química ou por processos de auto-agregação. Em uma célula, sínteses químicas e processos de auto-agregação são controlados pelo ambiente de forma a garantir a produção reprodutível de componentes na escala nanométrica, como proteínas e vesículas. Em métodos de produção química descontínuos, o meio local não é bem controlado, levando a flutuações químicas significativas e perturbações elétricas ou mecânicas que resultam muitas vezes em populações não homogêneas de nanopartículas. Todavia, sínteses reprodutíveis em escala nanométrica e processos de auto-agregação requerem ambientes que são controláveis em relação à dimensão das partículas em si. Sistemas microfluídicos têm várias características que permitem o controle do processo neste nível. Em primeiro lugar, nestes sistemas, as forças interfaciais dominam em relação às forças inerciais, levando ao crescimento das propriedades de transferência difusional de calor e de massa, que são naturalmente observadas em nível celular. Em segundo lugar, as condições do fluxo laminar em canais microfluídicos podem ser utilizadas para criar uma região interfacial bem-definida e previsível entre dois fluidos, o que tem sido utilizado para concentrar hidrodinamicamente correntes de fluidos a escalas submicrométricas através de rápida mistura e padronização. Estas características permitem o controle sobre a escala nanométrica em um regime que anteriormente foi de difícil acesso experimental (Jahn et. al., 2004).

Os controles do fluxo e das condições de mistura na microfluídica levaram à melhor homogeneidade de tamanho das partículas e ao seu controle de forma reprodutível. A formação contínua das partículas em um sistema microfluídico evita processos de desagregação e de agregação frequentemente existentes em tecnologias tradicionais descontínuas e permite o controle dinâmico do fluxo e de parâmetros da mistura para personalizar partículas para determinada aplicação. Sistemas microfluídicos de fluxo contínuo têm o potencial para se tornar uma tecnologia padrão que permite a formulação de partículas homogêneas e com fino controle sobre os parâmetros críticos do processo, que são difíceis de ser controlados nas técnicas descontínuas convencionais (Jahn *et. al.*, 2008).

No método utilizado por Wagner e colaboradores (2002) a corrente etanol/lipídio foi injetada obliquamente na corrente de água. Uma parte da corrente etanol/lipídio formou uma interface não-miscível com a tubulação de aço inoxidável e a outra parte formou uma interface líquida miscível ativa com o tampão. Os lipossomas foram formados na interface miscível tampão/etanol. Os diâmetros dos lipossomas produzidos com o método de injeção de fluxos cruzados variaram entre 200 e 500 nm (Jahn *et. al.*, 2008).

Schubert e Muller-Goymann (2003) propuseram um método eficiente para preparação de nanopartículas sólidas de lipídio (SLNs) realizando a injeção de solventes através de uma agulha de tamanho micro. Eles injetaram solução lipídica em uma solução aquosa agitada contendo surfactante para a formação de gotas. O solvente difundiu rapidamente dessas gotas para a solução aquosa, de forma que o lipídio residual formou SLNs devido à supersaturação local, obtendo partículas da faixa de 80 a 300 nm (Zhang *et. al.*, 2008a).

Jahn e colaboradores, em 2004, reportaram a utilização da microfluídica para obter controle sobre à auto-agregação espontânea de lipossomas de uma solução de fosfolipídios dissolvidos. Neste trabalho, focou-se hidrodinamicamente na corrente lipídica entre as duas soluções aquosas de tampão em uma junção cruzada em um microcanal, como representado na Figura 11 (a). Em um típico procedimento, álcool isopropílico (IPA), contendo os lipídios dissolvidos, acrescido de um corante fluorescente ( $DiIC_{18}$ ), fluiu através do canal central, e uma solução salina aquosa de tampão fosfato fluiu através de dois canais laterais. A formação de lipossomas foi energicamente favorável em pontos do sistema onde a concentração da mistura IPA/tampão atingiu uma condição crítica, na qual a solubilidade lipídica era baixa. Conforme mostrado no perfil de fluorescência dos microcanais na Figura 11 (b), os lipossomas foram formados inicialmente ao longo da fronteira entre o IPA e a solução tampão, onde um aumento da fluorescência é claramente visível. A intensidade da fluorescência aumenta para o seu valor máximo imediatamente à jusante da largura mínima da corrente de IPA, onde a corrente é altamente concentrada, indicando maior concentração de lipossomas. Dois efeitos levaram à alta concentração de lipossomas nesse ponto do sistema: primeiramente, os lipossomas foram formados ao longo da região interfacial seguindo as linhas da corrente e foram direcionados a se recolherem no ponto central do canal. Além

disso, neste ponto, a maior parte da corrente de IPA foi diluída para a sua concentração crítica favorecendo a formação de lipossomas mais estáveis. Os lipossomas obtidos foram menos polidispersos comparados aos preparados pelos métodos descontínuos tradicionais e estavam na faixa de 100 a 300 nm. Esse trabalho foi a primeira demonstração do fino controle que se pode obter utilizando interfaces microfluídicas para manipular agregados em escala nanométrica.



Figura 11 – (a) Esquema do processo de formação de lipossomas em canais microfluídicos;
(b) Mapa tridimensional da intensidade da coloração do corante DiIC<sub>18</sub> durante o processo de formação dos lipossomas

Zhang e colaboradores (2008a e b) apresentaram um método de produção de SLNs num sistema de microcanais em fluxo contínuo, com o sistema na horizontal (Figura 12) ou na vertical (Figura 13):



Figura 12 – Diagrama esquemático do aparato experimental desenvolvido por Zhang e colaboradores (2008a): (1) módulo de microcanais, (2) seringa para a solução orgânica, (3) seringa para a fase aquosa, (4) microscópio digital de inversão, (5) ocular digital, (6) computador, (7) recipiente coletor e (8) unidade de agitação.



Figura 13 – Diagrama esquemático do aparato experimental desenvolvido por Zhang e
colaboradores (2008b): (1) seringa para a solução orgânica, (2) seringa para a fase aquosa, (3)
microcanal, (4) microscópio digital de inversão, (5) câmera de vídeo, (6) computador, (7)
recipiente coletor e (8) unidade de agitação.

O sistema de microcanais foi montado com capilares internos e externos. Uma fase com solução lipídica foi injetada no capilar interno, enquanto uma fase aquosa com surfactante foi injetada nos capilares externos, simultaneamente. Quando essas duas fases se encontravam, o solvente da fase lipídica difundia rapidamente para a fase aquosa, resultando na supersaturação de lipídio e consequente formação das SLNs (Zhang *et. al.*, 2008b).

Thorsen e colaboradores (2001) utilizaram uma junção microfluídica em forma de T (Figura 14a) para criar gotículas micrométricas através de um fluxo de água em um canal no qual óleo estava fluindo. Neste trabalho, eles argumentaram que a formação das gotículas foi determinada pela combinação da tensão superficial com as forças de cisalhamento (Jahn *et. al.*, 2008).



Figura 14 – Esquema de uma junção microfluídica em formato T para criar (a) gotículas de água e (b) "plugs" ou gotículas maiores no óleo. As dimensões dos canais são da ordem de 50 μm a 100 μm

Link e colaboradores (2004) mostraram que gotículas de água pré-formadas em uma junção T, semelhante à mostrada na Figura 14a, podem ser divididas em menores gotículas passando por uma segunda junção em T (Figura 15) (Jahn *et. al.*, 2008).



Figura 15 – Esquema de junção microfluídica em T para transformação de gotículas para tamanhos menores. A formação das gotículas depende dos comprimentos dos canais laterais  $(L_1 e L_2)$ , da velocidade do fluido (v), do comprimento  $(l_0)$  e da largura do microcanal  $(w_0)$ 

Uma técnica diferente para a criação de emulsões depende do fluxo em um sistema microfluídico e é descrita por Anna e colaboradores (2003). A Figura 16a apresenta a estrutura utilizada para a formação das gotas. O fluxo dos dois canais de óleo aplicou pressão na corrente aquosa central e a forçou a formar uma corrente bem estreita que sofreu ruptura no canal de entrada ou após ele, indo para o grande reservatório à direita. A Figura 16b ilustra os tipos de gotículas formados em função da taxa global de fluxo de óleo e da razão da taxa de fluxo de água pela taxa de fluxo de óleo. Tal técnica mostra que podem ser formados vários diferentes tipos e tamanhos de gotículas menores que as dimensões do canal de entrada (Jahn *et. al.*, 2008).



Figura 16 – (a) Esquema utilizado por Anna e colaboradores onde a corrente de óleo pressiona a corrente aquosa para a formação de bolhas no reservatório a direita; (b) Imagens dos diferentes tipos de gotículas formadas (Adaptado de Jahn *et. al.*, 2008).

Wu e colaboradores (2006) utilizaram fluxo pulsado para criar gotas em locais prédeterminados dentro de um microcanal. Um dispositivo com uma série de reservatórios triangulares ligados por um estreito microcanal foi inicialmente preenchido com óleo. A água foi então forçada pelo canal através de uma bomba seringa, deslocando o óleo. Após um breve período o fluxo foi interrompido e o sistema foi levado de volta para a pressão atmosférica. Estes segmentos do fluxo aquoso e das gotículas de água formaram-se nas regiões triangulares do canal. Gotículas estáveis, com volumes variando de cerca de 30 nL a 20 nL foram formadas em vazões de 1 mL/min a 4 mL/min, respectivamente. Taxas de fluxo mais lentas resultaram em gotículas não uniformes entre os sítios de nucleação, enquanto que as taxas de fluxo mais elevadas produziram duas gotículas por câmara. Foi também mostrada uma forte dependência do tamanho da gotícula para o tamanho do sítio de nucleação no canal microfluídico (Figura 17) (Jahn *et. al.*, 2008).



Figura 17 – Imagens apresentando a formação das gotículas no dispositivo de microcanais. (a)
Água é forçada no reservatório de óleo; (b) O fluxo de água é interrompido e os pontos
"pinch" ou pontos de conecção são formados nas partes estreitas da corrente de água. Essas regiões instáveis são rompidas e então se formam gotículas (c)

#### 3.7) Caracterização das nanopartículas

Em função de sua natureza coloidal (tamanho reduzido das partículas), dificuldades técnicas são encontradas na caracterização físico-química das nanopartículas. A caracterização das suspensões engloba a avaliação morfológica, a distribuição de tamanhos das partículas, a distribuição de massa molar do polímero, a determinação do potencial zeta e do pH, a determinação da quantidade de fármaco associado às nanoestruturas, a cinética de liberação do fármaco e, ainda, a avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento. O conjunto de informações obtidas na caracterização das nanopartículas em nível molecular (Schaffazick *et. al.*, 2003).

#### • Diâmetro médio e polidispersidade

De uma forma geral, nanopartículas obtidas através de diferentes métodos apresentam uma distribuição unimodal, com baixo índice de polidispersidade. Os métodos usuais para determinação da distribuição de tamanho das nanopartículas consistem na espectroscopia de correlação de fótons e microscopia eletrônica de varredura (MEV) ou na microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Schaffazick *et. al.*, 2003).

Geralmente, as nanopartículas, mesmo preparadas através de diferentes métodos, apresentam diâmetros médios entre 100 e 300 nm. No entanto, partículas com diâmetros em torno de 60 a 70 nm ou mesmo inferiores a 50 nm podem ser obtidas. A composição qualiquantitativa e o método de preparação das nanopartículas são fatores determinantes do diâmetro médio e da polidispersidade das partículas. No caso das nanocápsulas, um fator importante que influencia o diâmetro das partículas é a natureza do óleo utilizado como núcleo. Os resultados são atribuídos às diferenças de viscosidade, hidrofobicidade ou tensão interfacial entre as substâncias empregadas (Schaffazick *et. al.*, 2003).

É importante mencionar que as tendências à agregação e à sedimentação das nanopartículas dispersas, em função do tempo, podem ser monitoradas pela determinação de mudanças na distribuição de tamanho das partículas.

A técnica do espalhamento dinâmico da luz (DLS ou PCS) é uma das mais efetivas e convenientes formas de se determinar o diâmetro médio e a polidispersidade das nanopartículas (Zhang *et. al.*, 2008a). Isso é feito iluminando as partículas com um laser e analisando a intensidade das flutuações da luz espalhada.

A técnica do espalhamento de luz oferece vantagens sobre algumas outras técnicas de análise de partículas, tais como microscopia óptica e eletrônica, sedimentação, centrifugação, filtração, difusão, etc, porque nesse caso os sistemas em estudo podem ser observados *in situ*, sem perturbação significativa. O método permite obtenção direta do resultado desejado, as medições são quase instantâneas, podem ser gravadas de forma contínua e o número de partículas sob observação simultânea é geralmente suficiente para que, caso haja uma distribuição de tamanhos, uma amostragem representativa seja obtida (Kerker, 1969).

O movimento Browniano é o movimento das partículas devido às colisões randômicas com as moléculas do líquido que as circundam. Partículas menores se movimentam rapidamente, enquanto as maiores são mais lentas. Tal relação entre o tamanho da partícula e sua velocidade no movimento Browniano é definida pela equação de Stokes-Eistein:

$$R_h = \frac{kT}{6.D\eta}$$
(Equação 4)

onde  $R_h$  é o raio hidrodinâmico da partícula, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, D é o coeficiente de difusão das partículas e  $\eta$  é a viscosidade do solvente.

Os resultados podem ser analisados em relação às distribuições em intensidade (I), volume (V) ou número de partículas (N). A intensidade de luz espalhada pelas partículas fornece a distribuição em intensidade, na qual a proporcionalidade à sexta potência do diâmetro da partícula (D) (I  $\alpha$  D<sup>6</sup>) subestima pequenas partículas, que são muito pouco ponderadas. A distribuição em número correspondente, convertida por meio da teoria de Mie, está em proporção equivalente à primeira potência do diâmetro (N  $\alpha$  D) e determina o

número real de partículas que geram a intensidade observada em cada classe de tamanho. Já a distribuição em volume equivale à terceira potência do diâmetro (V  $\alpha$  D<sup>3</sup>).

Além das distribuições acima citadas, os resultados podem ser avaliados através do valor do diâmetro hidrodinâmico médio cumulativo das partículas (Z-average), o qual é calculado através da Equação 5:

$$Z - average = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2}$$
(Equação 5)

Ele pode ser utilizado para comparar amostras através de uma mesma técnica, que apresentem apenas um pico, sejam esféricas, monodispersas e tenham sido preparadas no dispersante correto. Em outros casos, ele só poderá ser utilizado para comparar amostras medidas pela mesma técnica e em um mesmo dispersante.

## Potencial Zeta

A densidade de carga de uma partícula (variação da densidade de íons na interface) afeta a distribuição de íons na região interfacial circundante, resultando no aumento da concentração de contra-íons (íons com cargas opostas às da partícula) perto da superfície. Com isso, ocorre a formação de uma dupla camada elétrica ao redor de cada partícula, sendo a região interna chamada de camada Stern, na qual os íons estão fortemente ligados, e a camada externa de camada difusa, região na qual os íons estão mais fracamente ligados. Dentro da camada difusa há uma fronteira imaginária, chamada *slipping plane*, onde o potencial zeta é medido (Figura 18).



Figura 18 – Esquema da dupla camada elétrica formada ao redor de uma partícula

A magnitude do potencial zeta dá uma indicação da estabilidade do sistema coloidal. Se todas as partículas na suspensão tendem a se repelir não há tendência para floculação. Todavia, se as partículas apresentam um potencial zeta baixo então não há força que evite que as partículas se agrupem e floculem. Em geral, a linha de divisão entre as suspensões estáveis e instáveis está entre +30 mV e -30 mV. Partículas com potenciais zeta mais positivos que +30 mV ou mais negativos que -30 mV são normalmente consideradas estáveis.

#### • Morfologia

As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) ou de transmissão (MET) têm sido muito empregadas na obtenção de informações relativas à forma e ao tamanho das nanopartículas. A MET pode permitir também a diferenciação entre nanocápsulas e nanoesferas possibilitando, inclusive, a determinação da espessura da parede das nanocápsulas. A técnica de criofratura também tem sido empregada para auxiliar na análise morfológica destes sistemas. Outra técnica que tem sido empregada é a microscopia de força atômica, a qual fornece informações com alta resolução em três dimensões, em escala nanométrica, sendo capaz ainda de determinar detalhes de superfície em nível atômico (Schaffazick *et. al.*, 2003).

De forma complementar às técnicas convencionais de microscopia, a microscopia de luz polarizada permite a análise da isotropia de sistemas, possibilitando a diferenciação e a identificação de áreas com estruturas diferentes em um mesmo tecido. Todavia, a qualidade das imagens obtidas depende do método de preparo das amostras (Arends e Bosch, 1992 e Berger, 2007 *apud* Silva, 2008).

#### • Estabilidade das dispersões

Informações relevantes sobre a estabilidade de suspensões de nanopartículas podem ser obtidas mediante o monitoramento do pH, em função do tempo. Por exemplo, a alteração do pH pode ser indício de degradação do polímero. Em um trabalho realizado por Calvo e colaboradores, por exemplo, foi verificada uma diminuição da massa molar da poli(ɛ-caprolactona) em suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas, após 6 meses de armazenamento, com consequente diminuição do pH destas formulações. A diminuição dos valores de pH das suspensões coloidais poliméricas, em um curto período de tempo, pode ser atribuída tanto à ionização de grupos carboxílicos presentes no polímero quanto à hidrólise, dependendo da hidrofobicidade do poliéster. Nesse caso, ela foi atribuída à exposição de um

maior número de grupos carboxílicos terminais, em função do tempo, promovida pela relaxação das cadeias poliméricas (Schaffazick *et. al.*, 2003).

#### • Concentração de AH

A reação de ácidos urônicos com o carbazol é o método mais satisfatório para se estimar a quantidade de ácidos urônicos em frações cromatográficas, mas requer duas horas para a revelação completa da cor e, na presença de certos componentes, a coloração é parcialmente influenciada por sais. Além disso, a coloração é instável e sensível ao aquecimento, à diluição em água, e a impurezas nos reagentes ou nas amostras (Bitter e Muir, 1962).

Devido às dificuldades acima citadas, Bitter e Muir (1962) adicionaram íons borato ao ácido sulfúrico concentrado, ampliando a coloração na reação do carbazol com o ácido urônico. Dessa forma, a sensibilidade do método é ampliada, a coloração aparece imediatamente, além de apresentar maior estabilidade, há grande reprodutibilidade e redução na interferência de íons cloreto e oxidantes, tornando o método mais rápido e quantitativo.

#### • Tensão superficial

A tensão superficial é um efeito que ocorre na camada superficial de um líquido que leva sua superfície a se comportar como uma membrana elástica. As moléculas situadas no interior de um líquido, por estarem sob forças atrativas intermoleculares de curto alcance, chamadas forças de Van der Waals, são atraídas em todas as direções pelas moléculas vizinhas, e, por isso, a resultante das forças que atuam sobre cada molécula é praticamente nula. Para as moléculas da superfície do líquido, entretanto, as forças de atração exercidas pelas moléculas da camada imediatamente inferior não são contrabalançadas. Logo, estas moléculas terão uma resultante em direção ao interior do líquido, tendendo a penetrá-lo. Assim, quanto mais fortes forem as forças intermoleculares de uma substância, maior será sua tensão superficial. A água, por exemplo, possui tensão superficial relativamente alta, devido à formação de pontes de hidrogênio entre suas moléculas. Adicionando-se à água um soluto com tensão superficial inferior, este tenderá a dirigir-se para a superfície da solução, num processo espontâneo que resulta na diminuição da tensão superficial da solução em relação à água pura. Quanto maior a concentração deste soluto, menor será a tensão superficial da solução.

## • Dicroísmo circular

O dicroísmo circular (DC) é o fenômeno da diferença de absorção entre as duas rotações de luz circularmente polarizada por uma molécula assimétrica. Ele pode ser utilizado para detectar:

- Mudanças conformacionais de macromoléculas;
- Composição de misturas quirais;
- Interação de macromoléculas com outras moléculas menores, especialmente aquirais.

Podemos citar algumas vantagens na utilização desta técnica:

- Experimentos simples e rápidos;
- Recuperação total da amostra;
- As análises são feitas em solução, onde temos uma reprodução muito próxima da realidade dos sistemas biológicos *in vivo*.

Stone (1971) foi o primeiro a publicar as propriedades da dispersão óptica rotatória (ORD) e do dicroísmo celular (DC) de soluções aquosas de AH. Segundo seus estudos, uma banda negativa centrada em aproximadamente 210 nm foi atribuída primeiramente à transição n- $\pi^*$  do cromóforo amida do grupo acetoamida, com pequena contribuição da transição n- $\pi^*$  do cromóforo carboxilato. Houve apenas uma pequena banda perto de 190 nm, onde a transição n- $\pi^*$  do cromóforo amida era esperada. Utilizando o DC com radiação ultravioleta no vácuo, Cowman e colaboradores (1983) mostraram que a transição  $\pi$ - $\pi^*$  do cromóforo amida o Glc-NAc é fortemente afetada pela formação de ligações glicosídicas no C-1 (o que causa ampla contribuição positiva) e no C-3 (o que causa ampla contribuição negativa), e que a contribuição das ligações são compensadas quando ambas estão presentes (Cowman e Matsuoka, 2005).

Estudos mostraram que a banda em 210 nm apresentou-se bem menor em intensidade em oligossacarídeos de AH que no polímero, e isso foi atribuído à adoção da conformação helicoidal pelo polímero, e não por pequenos oligômeros. Todavia, estudos posteriores mostraram que a mudança de intensidade foi simplesmente resultado de discretas contribuições dos resíduos finais dos pequenos oligômeros e que não havia aparentemente contribuição da conformação helicoidal (Cowman e Matsuoka, 2005).

O AH no estado sólido apresenta um espectro DC diferente. Uma banda fortemente negativa próxima a 190 nm, atribuída ao cromóforo amida. Sua grande intensidade é devido ao meio mais rígido no sólido, onde o grupo amida pode ser ligado ao hidrogênio do grupo carboxilato através de uma ligação  $\beta$ -1,4. Outra mudança interessante nas propriedades ópticas ocorre quando soluções aquosas ácidas do AH são misturadas ao etanol, 1,4-dioxano, acetonitrila ou trifluoretanol. Nessas condições o AH pode gelificar. Park e Chakrabarti descreveram o aparecimento de uma intensa banda negativa próximo a 190 nm e de uma fraca banda positiva próximo a 225 nm. As mudanças no DC foram cooperativamente eliminadas em temperaturas próximas a 50 °C. Staskus e Johnson forneceram um elegante e detalhado exame do efeito, utilizando o DC com radiação ultravioleta no vácuo. Eles descobriram que pequenos oligômeros (menos que 9 dissacarídeos) de AH não poderiam sofrer alteração conformacional. Todavia, para oligômeros de 10 a 18 dissacarídeos as mudanças eram dependentes da concentração, enquanto essas modificações eram independentes da concentração para longas cadeias (Cowman e Matsuoka, 2005).

Nos estudos de Gorham e colaboradores (1975) uma banda principal em 210 nm foi observada. Como esse experimento não foi realizado para baixos comprimentos de onda, a banda fraca esperada entre 185 e 190 nm, reportada por Chakrabarti e Balazs, não foi detectada. Além deles, Donghui e colaboradores (2006) obtiveram bandas negativas em 182 e 210 nm.

## 4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção será apresentada na forma de capítulos, contendo os artigos submetidos a periódicos científicos, selecionados de acordo com a afinidade do periódico com o aspecto abordado.

Esse estudo compreendeu, inicialmente, a análise do processo descontínuo, na ausência de óleo e tensoativos, com diferentes solventes orgânicos (artigo 1). Além disso, em experimentos utilizando a acetona como solvente orgânico, analisou-se a influência do pH nas etapas de nanoprecipitação e reticulação (artigo 2). Devido a maior homogeneidade no tamanho das partículas, conferida pelos processos contínuos em geral, a produção de nanopartículas de AH por precipitação e reticulação, com diferentes solventes orgânicos, também foi realizada no interior de microcanais, e os resultados foram comparados aos do processo descontínuo (artigo 3). Por fim, em experimentos empregando-se IPA como solvente orgânico, outras duas variáveis do processo contínuo foram testadas: a vazão do solvente orgânico e a concentração da solução aquosa de AH (artigo 4).

4.1) EFEITOS DOS SOLVENTES ORGÂNICOS NAS NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO OBTIDAS POR PRECIPITAÇÃO E RETICULAÇÃO QUÍMICA

> ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO "JOURNAL OF NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY"

# EFFECTS OF ORGANIC SOLVENTS ON HYALURONIC ACID NANOPARTICLES OBTAINED BY PRECIPITATION AND CHEMICAL CROSSLINKING

Rafaela Costa Souza Bicudo and Maria Helena Andrade Santana\*. Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil

\*Corresponding author - Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil +55 19 35213921 mariahelena.santana@gmail.com

Keywords: hyaluronic acid, nanotechnology, oil free nanoprecipitation, acetone, isopropyl alcohol, ethanol

#### Abstract

Hyaluronic acid is a hydrophilic mucopolysaccharide composed of alternating units of D-glucuronic acid and N-acetylglucosamine. It is used in many medical, pharmaceutical, and cosmetic applications, as sponges, films, or particle formulations. Hyaluronic acid nanoparticles can be synthesized free of oil and surfactants by nanoprecipitation in organic solvents, followed by chemical crosslinking. The organic solvent plays an important role in particles size and structure. Therefore, this study aimed to investigate the influence of acetone, ethanol, and isopropyl alcohol on the synthesis and physico-chemical properties of hyaluronic acid nanoparticles. Particles were crosslinked with adipic hydrazide and chloride carbodiimide under controlled conditions. The nanoparticles obtained with all three studied solvents were moderately electrostatically stable. Experiments with acetone produced the smallest particle size (120.44 nm) and polydispersity (0.27). The size and polydispersity of hyaluronic acid nanoparticles correlated with the surface tension between water and the organic solvents, not with the thermodynamic affinity of water for the organic solvents.

#### Introduction

Hyaluronic acid (HA) is a natural, hydrophilic, linear mucopolysaccharide composed of alternating units of D-glucuronic acid and N-acetylglucosamine joined by  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -1,4 linkages (1). HA can be obtained from animal sources or by microbial fermentation; it is a major component in animal tissues, particularly in the umbilical cord, synovial fluid, and vitreous humor. HA plays important roles in animal tissue properties, including tissue structure, hydration, lubrication, cell proliferation, signal transduction, cell motility, and embryogenesis. Therefore, it is used in many applications, including ophthalmology, orthopedics, rheumatology, oncology, dermatology, and cosmetics (2).

Currently, there is increasing interest in nanostructure materials, due to their potential in various scientific and technological areas, including encapsulation and controlled delivery of drugs. The most interesting systems have comprised biodegradable, natural polymers, like HA. However, native HA is highly soluble in water and rapidly degraded *in vivo* by enzymes, free radicals, and reactive oxygen species (3). Therefore, chemically modified HA derivatives have been developed, with better mechanical and biological properties for specific medical, pharmaceutical, and cosmetic applications. Typical chemical modifications of HA involve the carboxylic groups and/or hydroxyl groups of the main chain. In the carboxylic group mainly esterification and carbodiimide-mediated reactions occur. In the hydroxyl group, sulfation, esterification, isourea coupling, and periodate oxidations may occur (4).

HA crosslinking can be performed with different agents capable of reacting with native or modified HA. Among the different agents for HA crosslinking, adipic hydrazide (ADH) is particularly useful; it can be attached to the carboxylic groups of HA in a reaction mediated by carbodiimides (5). Yun *et al.*, in 2004, studied the synthesis of sodium hyaluronate (HNa) microparticles. They produced these particles by emulsifying the aqueous phase in mineral oil with Span 80 surfactant. The particles were crosslinked with ADH at pH 4 (optimum pH for this reaction) in a reaction mediated by chloride carbodiimide (EDCl). The experimental results showed polydispersed particles that ranged from 2 to 23  $\mu$ m in size. The emulsification process required the use of surfactant, and subsequently, the removal of oil by washing with isopropyl alcohol (IPA), which caused significant loss of particles (6). Aiming to eliminate the oil phase, Hu *et al.* (2006) patented a nanoprecipitation process for the synthesis of HA nanoparticles that was free of oil and surfactant. HNa precipitated when acetone was added to the HNa aqueous solution, as HNa is not soluble in acetone (non-solvent). Then, it was crosslinked with ADH and EDCl in a process of 44 hours. The total amount of acetone was added in two steps. HA particles were recovered from the reacting medium by dialysis. These HA particles had a uniform size of 200 nm (7).

Nanoprecipitation has been a promising process for the preparation of polymer nanoparticles and for the encapsulation of active compounds, including labile proteins. This method has the advantage of flexibility; it can be performed with (a) preformed polymers as the starting material, rather than monomers, (b) a wide range of natural or synthetic polymers, and (c) non toxic solvents (8). Additionally, nanoprecipitation allows the selection of a wide range of solvents; thus, a large number of polymers and drugs can be formulated. Furthermore, when different solvents are used to prepare nanoparticles, it is possible to modify both the particle size and the internal and external structures, which can affect porosity and roughness (9). In contrast to the hydrophilic HA, most other nanoprecipitation processes use hydrophobic polymers for nanoparticle production. To our knowledge, only one previous study (7) has described HA nanoparticle synthesis by nanoprecipitation.
For successful nanoprecipitation, the choice of the ternary system of polymer/solvent/non-solvent is critical. Currently, there are no clear guidelines about the influence of each of the three components of the system. In general, most studies point out that the properties of the polymer solvent and the polymer concentration (< 2%) are important for controlling the nanoprecipitation process and the nanoparticle properties (10). Moreover, medical, pharmaceutical, and cosmetic applications require HA nanoparticles with specific physicochemical properties, like diameter, size distribution, and zeta potential. Therefore, the purpose of this work was to study the influence of the organic phase (a non-solvent for HA) on the synthesis and physicochemical properties of HA nanoparticles produced by nanoprecipitation, followed by chemical crosslinking.

#### **Materials and Methods**

### Nanoparticle Synthesis

HA nanoparticles were synthesized by nanoprecipitation, followed by chemical crosslinking with ADH (SIGMA - St. Louis, USA) and EDCl (SIGMA - St. Louis, USA), according to the protocol described by Hu et al. in 2006 (7). Briefly, the process was carried out in a jacket glass reactor of 400 mL, equipped with a mechanical stirrer (model TE-039/1, Tecnal). The temperature inside the reactor was controlled by circulating water from a thermostat bath (model TE-184, Tecnal). HA (molecular weight 2000 Da) was used in its salt form, HNa, from a 1% solution (from China and distributed by Galena Chemicals and Pharmaceuticals, Ltd). Figure 1 illustrates the synthesis of HA nanoparticles. The initial aqueous solution was composed of 80 mL of water and 8 g of HA (1%). Then, the first volume of organic solvent (109, 143, or 137 mL of ethanol, IPA, or acetone, respectively) was added. The system was maintained at 21 °C with agitation for 2 h. Next, 80 mg of EDCl and 40 mg of ADH in 2 mL of water were added to the system, and it was stirred for 24 h. Then, the second part of organic solvent (105, 137, or 132 mL of ethanol, IPA, or acetone, respectively) was added, and the system was stirred for another 20 h. Finally, we modified the recovery step of the Hu et al. protocol (7) by recovering the synthesized particles from the reacting medium by ultrafiltration with a 10 kDa Millipore membrane. All experiments were performed in duplicate.



Figure 1 – Schematic of HA nanoparticle synthesis by nanoprecipitation and ADH/EDCl crosslinking.

# Effects of Operational Conditions

Additional experiments were performed to study the operational conditions of the process. We investigated the quantity, order, and number of additions of acetone. Furthermore, we analyzed the addition of ADH and EDCl at the beginning of the process.

First, instead of the two separate additions of acetone in the original protocol (7), we tested the effect of adding only the first volume of acetone (137 mL). Second, we tested the effect of adding the total acetone volume from both additions (269 mL) in only one step (the first step). Third, we tested the effect of adding the aqueous solution to the organic solvent in the first step, the opposite of the order described by Hu *et al.* (7).

Then, we investigated the influence of the ADH and EDCl addition. For this, we added the ADH and EDCl right at the beginning of the process, instead of waiting 2 h, as described by Hu *et al.* (7).

# Nanoparticle Characterization

HA nanoparticles were characterized by measuring the mean diameter, polydispersity, and zeta potential with a Zetasizer Nano Series ZS (Malvern Instruments) at a fixed angle of 173°. Surface tension was measured at 25 °C in a Kruss tensiometer (K12 model) with the ring method. The conformation of HA polymers at the water-organic interface of the solvent was characterized by circular dichroism with a J720-Jasco ORD 306 Spectropolarimeter. Statistical analyses included a 2-sample t-test, performed with *Minitab* software.

### Results

# The choice of the organic phase

In addition to the acetone described by Hu *et al.* (7), we also tested ethanol and IPA as HA non-solvents, due to their polar properties and performance in precipitation processes for HA purification (1).

Table 1 gives the solubility parameters for the studied organic solvents and water. These were useful for constructing Bagley's two-dimensional graph (Fig. 2). The volumedependent combined parameter,  $\delta_v$ , assumes that the effects of dispersion ( $\delta_D$ ) and polarity ( $\delta_P$ ) are closely similar; in contrast, the effect of hydrogen bonding ( $\delta_H$ ) was quite different in nature (11).

Solvent	$\delta_D(\text{Pa}^{\text{0,5}})$	$\delta_P(\text{Pa}^{\text{0,5}})$	$\delta_{H}(\text{Pa}^{\text{0,5}})$	$\delta_{v}(\text{Pa}^{\text{0,5}})$
Acetone	15.5	10.4	7.0	18.7
IPA	15.8	6.1	16.4	16.9
Ethanol	15.8	8.8	19.4	18.1
Water	12.3	31.3	34.2	33.6

Table 1 – Solubility parameters for water, ethanol, IPA, and acetone (12).

 $\delta_{\rm D}$  - dispersion force,  $\delta_{\rm P}$  - polarity,  $\delta_{\rm H}$  - hydrogen bonding

 $\delta_{\rm v}$  - volume-dependent combined parameter:  $\delta_{\rm v} = (\delta_{\rm D}^2 + \delta_{\rm p}^2)^{1/2}$ 



Figure 2 – Bagley's two-dimensional, partial solubility parameters. This graph relates water (and HA, by association) to ethanol, IPA, and acetone.

Bagley's graph demonstrates the non-solvent properties of ethanol, IPA, and acetone with respect to the HA polymer. According to Bagley *et al.* (13), solvents of a polymer are generally included in a circle with a radius of five  $\delta$ -units around the polymer. Due to the lack of data on HA solubility parameters in the literature, we assumed that the position of HA was close to that of water, because it is highly soluble in water.

### **Physico-chemical properties**

Figure 3 shows the size distributions of the HA nanoparticles obtained at the end of the process.



Figure 3 – Comparison of size distribution curves of HA nanoparticles. Nanoparticles were obtained by nanoprecipitation and chemical crosslinking with the non-solvents: ethanol (A and B), IPA (C and D), and acetone (E and F). (Left; A, C, and E) Size distribution curves in terms of signal intensity. (Right; B, D and F) Size distribution curves in terms of the number of particles. The multiple curves on each graph represent individual measurements of two different samples of HA particles.

We observed that nanoprecipitation with the studied non-solvents led to dispersions of HA particles with sizes in the nanometer range. The signal intensity distributions showed populations that ranged from 100 to 1000 nm with all the non-solvents tested. Although a wide range of diameters was observed in the intensity distribution (*I*-distribution), the proportionality to the sixth power of particle diameter (*D*) ( $I \alpha D^6$ ) underestimated the smallest particles, which were very weakly weighted. The corresponding number distribution

(N-distribution), converted with the Mie theory, provided proportionality to the first power of the diameter ( $N \alpha D$ ), and it revealed the actual number of particles that generated the observed intensities in each size class (14,15). The number distributions showed that the predominant populations were around 100 nm for ethanol, 100 to 300 nm for IPA, and 30 to 100 nm for acetone. Table 2 compares the mean diameter, polydispersity, and zeta potential measurements. The mean diameter was calculated in terms of the Z-average, defined as follows:

$$Z - average = \frac{\sum n_i d_i^{3}}{\sum n_i d_i^{2}}$$
 (Equation 1)

where n is the number of particles with a given diameter, d.

Table 2 – Mean diameter, polydispersity, and zeta potential of HA nanoparticles obtained by

nanoprecipitation with three different non-solvents: ethanol, IPA, and acetone

Solvents	Mean Diameter	P-value** Polydispersity		P-value**	Zeta Potential P-value**		
borvents	(nm)*	i value	ronyanoporony	i value	(mV)		
Ethanol (1)	$239.15 \pm 46.05$	0.00 (1:2)	$0.53 \pm 0.11$	0.84 (1:2)	- 29.53 ± 5.49	0.51 (1:2)	
IPA (2)	421.98 ± 15.34	0.00 (2:3)	$0.54 \pm 0.16$	0.01 (2:3)	$-32.20 \pm 7.77$	0.03 (2:3)	
Acetone (3)	$120.44 \pm 12.14$	0.00 (3:1)	$0.27 \pm 0.11$	0.00 (3:1)	$-22.60 \pm 4.02$	0.04 (3:1)	

\* Mean diameter was determined by the Z-average (Equation 1)

\*\* P-Value > 0.05 indicates that the values compared are not significantly different.

Numbers in parentheses refer to the solvents compared in the P-value calculation

The smallest nanoparticles (120.44 nm), polydispersity (0.27) and zeta potential in module (-22.60 mV) were obtained with acetone as the organic solvent. IPA produced the largest particles (421.98 nm). However, no significant differences were observed in polydispersity and zeta potential with IPA or ethanol, as indicated by the P-values. The

electrostatic colloidal stability, indicated by zeta potentials in the range of -22 to -32 mV (Table 2), was determined for HA nanoparticles prepared with all the studied non-solvents. Particles remained stable during storage with refrigeration (4 °C) for two months, based on the mean diameter and polydispersity measured before and after storage.

In order to explain the differences in the degree of affinity between water and the organic solvents, we analyzed the conformation of HA and the surface tension at the water-organic phase interface.

### Water-organic phase affinities

The affinities between water and the organic solvents were analyzed by the Interaction (X) and Hansen Solubility ( $\Delta\delta$ ) parameters, which were calculated as follows:

$$X_{solvent-water} = \frac{V_{solvent}}{RT} \cdot (\delta_{solvent} - \delta_{water})^2 \text{ (Equation 2)}$$
$$\Delta \delta = (\delta_{solvent} - \delta_{water}) = ((\delta_{D,solvent} - \delta_{D,water})^2 + (\delta_{P,solvent} - \delta_{P,water})^2 + (\delta_{H,solvent} - \delta_{H,water})^2)^{0.5} \text{ (Equation 3)}$$

Table 3 – Hansen solubility and Interaction parameters indicate the affinities between the

studied organic solvents and water

	Hansen Solubility	Interaction	
Organic Solvents	Parameter $(\Delta \delta)^a$ (Pa <sup>0.5</sup> )	Parameter (X) <sup>b</sup>	
Acetone	3.58E+04	38.60	
Isopropyl alcohol	2.77E+04	24.07	
Ethanol	2.40E+04	13.76	

<sup>a</sup> The Hansen Solubility parameter was calculated as shown in Equation 2.

<sup>b</sup> The Interaction parameter was calculated as shown in Equation 3.

These results showed that, as the affinity between the organic and the aqueous phases increased, the interaction (X) and Hansen Solubility ( $\Delta\delta$ ) parameters decreased. Therefore, the ability of the non-solvents to dehydrate HA decreased as follows: ethanol>IPA>acetone.

## Conformation of HA in the water-organic phase system

Figure 4 shows circular dichroism (CD) spectra for HA at the water-organic solvent interface. In the range of detected HA absorption (190-300 nm), the spectra were different for ethanol and IPA, and they depended on HA concentration. Therefore, HA assumed different configurations, depending on the solvent used and on the solution concentration. Acetone absorbed in the same range of wavelengths; however, interference was observed in the spectra due to the contribution of the carbonyl chromophore (Figure 4B).



Figure 4 – Circular dichroism (CD) spectra of HA in ethanol or IPA (A) and acetone (B) at different HA concentrations

### Surface tension at the HA-water-organic phase interface

The surface tensions measured at the water-organic solvent interface in the presence of HA are presented in Table 4. As expected, the presence of the polymer decreased the surface

tension of water from 72.2 to approximately 66.6 mN/m. Moreover, the presence of an organic solvent further decreased the water surface tension. Ethanol and acetone had similar effects (28.64 mN/m and 30.33 mN/m, respectively), but IPA had a larger effect (24.64 mN/m). Thus, due to the lower surface tension in the presence of IPA, water migrates faster into the organic solvent compared to the systems with acetone or ethanol, since the diffusion barrier, in this case, is lower.

Interfaces	HA Concentration	Surface tension	
Interfaces	(g/L)	(mN/m)	
HA-water	42.1	$66.64 \pm 2.59$	
HA-water-ethanol	42.1	$28.64 \pm 0.01$	
HA-water-IPA	36.4	$24.65 \pm 0.04$	
HA-water-acetone	36.4	$30.33 \pm 0.13$	
Water		72.2	
Ethanol		22.3	
IPA		20.8	
Acetone		23.7	

Table 4 – Surface tensions at the HA-water-organic solvents

# Correlations between surface tension and mean diameter, polydispersity, and zeta potential

Figure 5 shows the correlations between the media surface tensions (Table 4) and the physico-chemical properties of HA particles (Table 2). As the surface tension increased, the HA nanoparticles became smaller. The differences in surface tensions with IPA and ethanol were not significant to alter the polydispersity and zeta potential. However, with acetone, the particles were less polydispersed, and less negative.



Figure 5 - Correlations among the surface tensions of the different media and the mean diameter, polydispersity, and zeta potential of HA nanoparticles

# Effects of operational conditions

#### Effects of acetone addition

Table 5 shows the effects of different volumes, times, and order of acetone additions. The effects were analyzed by comparing the mean diameter, polydispersity, and zeta potential among HA nanoparticles that were synthesized with the different methods. All P-values were calculated between the analyzed modifications and the Hu *et al.* procedure (7), which included two separate acetone additions (137 mL and 132 mL) to the aqueous solution.

Process	Mean diameter (nm)*	Polydispersity	Zeta potential (mV)
2 additions of acetone: 137 and 132 mL	120.44 ± 12.14	0.27 ± 0.11	- 22.60 ± 4.02
1 addition of acetone: 137 mL	447.68 ± 28.03	0.77 ± 0.16	- 28.63 ± 6.21
P-value**	0.00	0.00	0.08
269 mL of acetone added in one step	105.97 ± 1.35	$0.22 \pm 0.05$	- 28.05 ± 5.66
P-value**	0.03	0.31	0.09
aqueous solution added in acetone	205.58 ± 16.16	0.40 ± 0.09	- 28.27 ± 2.65
P-value**	0.00	0.05	0.02

Table 5 – Mean diameter, polydispersity, and zeta potential of HA nanoparticles synthesized

under different solvent conditions

\* Mean diameter determined by the Z-average (Equation 1)

\*\* P-Value > 0.05 indicates that the values compared are not significantly different

The results showed that, under the experimental conditions of these assays, only the addition of a single volume of acetone (137 mL) produced conditions that could not promote the synthesis of HA nanoparticles in the 100 nm range and with low polydispersity. Thus, large, more polydispersed HA nanoparticles were formed. On the other hand, these conditions did not alter the zeta potential, indicated by the P-value of 0.08.

When the total volume of acetone was added in one step (269 mL) or in two steps (137 mL and 132 mL) there was no significant difference in the polydispersity and zeta potential; however, when the volume was added in only one step, smaller HA nanoparticles (105.97 nm) were produced.

When the aqueous solution was added to the acetone, compared to adding the acetone to the aqueous solution, we observed larger (205.58 nm), more polydispersed (0.40), and more negative HA nanoparticles (-28.27 mV).

#### Effects of ADH and EDCl addition times

Next, we tested whether the timing of the ADH and EDCl addition affected nanoparticle synthesis. Here, we added ADH and EDCl at the beginning of the experiment, instead of the addition after 2 h, according to the Hu *et al.* protocol (7). We found that the earlier addition produced HA nanoparticles with the same mean diameter, but were less polydispersed, and more negative compared to those produced with the Hu *et al.* protocol (Table 6).

Table 6 - Comparison of different ADH and EDCl addition times for effects on HA

	Mean diameter		Zeta potential	
Process	(nm)*	Polydispersity	(mV)	
ADH and EDCI		0 / 5 / 0 00		
at the beginning	$125.00 \pm 3.02$	$0.15 \pm 0.02$	- 39.48 ± 0.82	
ADH and EDCI	120 44 + 12 14	0 27 + 0 11	- 22 60 + 4 02	
after 2 h	120.44 ± 12.14	$0.27 \pm 0.11$	- 22.00 ± 4.02	
P-value**	0.41	0.05	0.00	

nanoparticle properties

\* Mean diameter determined by Z-average (Equation 1).

\*\* P-Value > 0.05 indicates that the values compared are not significantly different.

#### Discussion

In contrast to the standard nanoprecipitation procedure for hydrophobic polymers, the procedure for hydrophilic HA molecules is to dissolve HA in an aqueous solution and then add an organic solvent. Water diffuses into the organic solvent, which causes the formation of a supersaturated HA solution, and leads to HA molecule precipitation, and the formation of unstable coil globules. Because these globules are crosslinked with ADH and EDCl, HA nanoparticles are produced. In this procedure, the mechanism of nanoparticle formation is based on water-non-solvent, water-polymer, and non-solvent-polymer interactions. HA is completely soluble in water and insoluble in the organic solvent. Therefore, the HA-water-non-solvent interactions at the interface can be analyzed to explain the mean diameter, polydispersity, and zeta potential of the nanoprecipitated, crosslinked HA particles.

In the present work, we studied the influence of ethanol, IPA, and acetone as nonsolvents on the mean diameter, size distribution, and zeta potential of HA particles prepared by nanoprecipitation and crosslinked with ADH. In order to explain the physicochemical properties of the particles, we analyzed the affinity between water and the non-solvents, the HA conformation, and the surface tension at the water-organic solvent interface.

The results showed that the mean diameter and polydispersity did not correlate with the affinity, but they did correlate with the inverse of surface tension. Thus, as the surface tension decreased, the barrier for water diffusion into the organic solvent decreased, and the water diffusion rate increased. This led to a higher nanoprecipitation rate. In addition, the aggregation of HA molecules increased; this resulted in larger and more polydispersed, unstable globules, which, in turn, led to larger, more polydispersed nanoparticles (Figure 1). Furthermore, the high nanoprecipitation rate prevented the escape of water from inside the unstable globules; this led to an increase in particle size and probably the generation of amorphous nanoparticles.

The low surface tension at the interface between IPA and water led to higher rates of HA dehydration and precipitation. This rapid formation increased the aleatory growth of the precipitated coil globules, and generated nanoparticles with larger sizes and higher polydispersity. In contrast, the controlled displacement at the water-acetone interface generated HA nanoparticles with small mean diameters and polydispersity. These results inferred that the mass transfer rate of water into the solvent controlled the mean diameter and polydispersity of HA nanoparticles.

All solutions had a pH of 6.0. At this pH, the carboxylic groups of the glucuronic acid units in HA were predominantly ionized, because the pK of these groups is between 3 and 4 (16). Therefore, the HA coil globules were large, due to the repulsive forces inside them. Moreover, a large amount of water was harbored inside these coil globules.

In addition, our results showed that both volumes of acetone were necessary for dehydration, nanoprecipitation, and synthesis of smaller HA nanoparticles (Table 5). Moreover, in the first step, the acetone should be added to the aqueous solution, because as each drop of the water solution was added to acetone, acetone dehydrated the HA molecules very rapidly. Thus, there was no time for the water to exit from inside the HA coil globules; this led to larger coil globules, and consequently, larger HA nanoparticles (Table 5). Furthermore, smaller nanoparticles were obtained when both acetone volumes were added together, because, in this case, HA dehydration proceeded more rapidly, which led to smaller HA nanoparticles.

Finally, it was shown that to obtain more stable, less polydispersed HA nanoparticles, ADH and EDCl should be added at the beginning of the procedure (Table 6). This can be explained by the fact that pH 6 is not the optimum pH for the crosslinking reaction of HA with ADH and EDCl; at pH 6, the crosslinking reaction is slower. Therefore, the earlier addition of ADH and EDCl provided more time for the crosslinking reaction, which increased the efficiency; this led to less polydispersed HA nanoparticles. In addition, when ADH and EDCl are in the system from the beginning, they can diffuse inside the HA coil globules filled with water. Then, the crosslinking reaction can occur more inside than outside the coil globules. Therefore, the external carboxylic groups on the HA chain undergo less crosslinking; this conferred a more negative zeta potential to the particle.

# Conclusions

Stable HA nanoparticles were formed by nanoprecipitation and crosslinking with ADH, mediated by EDCl. The rate of water displacing the organic solvent was determined by the surface tension, and this rate controlled the mean diameter and the polydispersity of HA nanoparticles. Moreover, irrespective of the solvent, the procedure is simple, reproducible, and offers the synthesis of HA nanoparticles in a single step, free of oil and surfactant. These features are promising for applications in drug delivery, and they extend to medical, pharmaceutical, and cosmetic applications for HA nanoparticles.

# Acknowledgments

The authors thank Prof. Dr. César Costapinto Santana and Prof. Dr. Francisco Pessine for the use of equipments. We are grateful to Gilson Barbosa Maia Júnior for his technical assistance.

This work was supported by the agency "Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)" - Brazil.

#### References

- H. Garg and C. Hales, *Chemistry and biology of hyaluronan*, Elsevier, Kidlington (2004).
- 2) G. Kogan, L. Soltés, R. Stern, Biotechnol. Lett. 29, 17-25 (2007).
- G. D. Prestwich, H. Li, Y. Liu, X. Z. Shu, S. D. Gray, Biomacromol. 5, 895-902 (2004).
- G. D. Prestwich (2001). Biomaterials from chemically-modified hyaluronan. Available at: <u>http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA18/HA18E.html</u>. Accessed 22 March 2010.
- G. D. Prestwich, D. M. Marecak, J. F. Mareck, K. P. Vercruysee, M. R. Ziebell, J. Control. Release, 53, 93-103 (1998).
- 6) Y. H. Yun, D. J. Goetz, P. Yellen, W. Chen, Biomater. 25, 147-157 (2004).
- Z. Hu, X. Xia, L. Tang (2006). Process for synthesizing oil and surfactant-free hyaluronic acid nanoparticles and microparticles. US Patent 20060040892 A1. Available at: <u>http://www.freepatentsonline.com/20060040892.pdf</u>. Accessed 13 April 2009.
- S. Stainmesse, A. M. Orecchioni, E. Nakache, F. Puisieux, H. Fessi, Colloid and Polym. Sci. 273, 505-511 (1995).
- S. Galindo-Rodriguez, E. Allemann, H. Fessi, E. Doelker, Pharm. Res. 21, 1428-1439 (2004).
- 10) P. Legrand, S. Lesieur, A. Bochot, R. Gref, W. Raatjes, G. Barratt, C. Vauthier, Int. J. Pharm. 344, 33-47 (2007).
- 11) D. W. Van Krevelen, Properties of polymers: their correlation with chemical structure; their numerical estimation and prediction from additive group contributions, Elsevier, Amsterdam (1990).

- 12) S. Abbott, C. M. Hansen, H. Yamamoto (2008). Hansen solubility parameters in practice. Available at: <u>http://www.hansen-solubility.com</u>. Accessed 22 March 2010.
- 13) E. B. Bagley, T. P. Nelson, J. M. Scigliniano, J. Paint Technol. 43, 35-42 (1971).
- 14) M. Kerker, *The scattering of light and other electromagnetic radiation*, Academic Press, New York (1969).
- 15) N. G. Stanley-Wood, R. W. Lines, *Particle size analysis*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge (1992).
- 16) V. C. Hascall, T. C. Laurent (1997). Hyaluronan: structure and physical properties. Available at: <u>http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html</u>. Acessed 22 March 2010.

4.2) A INFLUÊNCIA DO PH NA PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR PRECIPITAÇÃO

> ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO "COLLOIDS AND SURFACES B: BIOINTERFACES"

# THE INFLUENCE OF PH ON THE SYNTHESIS OF HYALURONIC ACID NANOPARTICLES BY PRECIPITATION

Rafaela Costa Souza Bicudo and Maria Helena Andrade Santana\*. Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil

\*Corresponding author - Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil +55 19 35213921 mariahelena.santana@gmail.com

Keywords: hyaluronic acid, nanoparticles, pH, nanoprecipitation, chemical crosslinking

#### Abstract

Hyaluronic acid is a hydrophilic mucopolysaccharide composed of alternating units of D-glucuronic acid and N-acetylglucosamine. It presents a myriad of applications in the medical, pharmaceutical and cosmetic areas. Currently, there is an interest in nanostructured materials given their potential regarding various scientific and technological areas, such as the field of controlled release drugs. For the production of hyaluronic acid nanoparticles, derivatized and/or crosslinked forms with better mechanical and biological properties have been used. Nanoprecipitation free of oil and surfactants is one of the methods for the production of crosslinked hyaluronic acid nanoparticles. In this method, an organic solution is added to a hyaluronic acid aqueous solution and the nanoparticles are produced by nanoprecipitation followed by chemical crosslinking with adipic hydrazide and chloride carbodiimide. Due to hyaluronic acid polyelectrolyte feature, pH influences its initial configuration in water, as well as the formation of the initial coil globules, which are precursors of hyaluronic acid particles. Besides, it influences the ionization of carboxylic groups, which is largely related to the crosslinking reaction rate. Considering pH importance in the overall process, the purpose of this work was to study the influence of pH on the production of hyaluronic acid crosslinked nanoparticles in a bulk solution. Smaller and less polydispersed coil globules were obtained in acid media. However, the low pH favored the crosslinking reaction, leading to larger final particles. Irrespective of the pH used, moderately electrostatically stable nanoparticles were always obtained, according to zeta potentials varying from - 20 to - 40 mV.

#### Introduction

Hyaluronic acid (HA) is a hydrophilic, natural and linear mucopolysaccharide (1). Its molecules are straight chains containing hundreds or thousands of sugar units, which are of only two kinds: N-acetylglucosamine and D-glucuronic acid, in alternation as disaccharides (2).

In saline solutions, the HA molecule structure is enhanced through a combination of the chemical structure of the disaccharide, internal hydrogen bonds and interactions with the solvent. It also self-aggregates, partly helped by the bonds between the hydrophobic fragments (3).

HA is also a polyelectrolyte. In non-aqueous solvents it shows the same behavior as a normal polymer. However, in aqueous solutions, HA charged groups may be surrounded by small, oppositely charged counter-ions. Therefore, the conformational properties in aqueous solutions are highly dependent on the nature and concentration of the ions present (1).

All biological functions of HA are related to its various different conformations and specific binding interactions. HA conformation can be affected by the local environment, as the ionic strength, by local dielectric constant, excluded volume effects, exposure to perturbing mechanical forces and the presence of interacting species, such as proteins and lipids (4).

Owing to the relationship between HA properties and its local environment, in 2004, it was studied the effect of ionic strength on HA solutions and it was showed the great expansion of HA hydrodynamic volume as the ionic strength of the solution was decreased (1). This reflected the polyelectrolyte effect of charge repulsion of adjacent carboxyl groups along the HA chain causing the expansion of the hydrodynamic domain (1,5).

Native HA is soluble in water at room temperature as well as it is rapidly degraded *in vivo* by enzymes, free radicals and reactive oxygen species associated with inflammatory responses (6). Therefore, crosslinked HA has been developed with better mechanical and biological properties for specific applications, being used as sponges, films or particles (7).

Currently, there is increasing interest in nanostructured materials, due to their potential in various scientific and technological areas, including the controlled release of drugs. In most studies, nanoencapsulation systems that were particularly interesting were composed of biodegradable polymers, such as HA (6).

Typical chemical modifications of HA involve carboxylic groups and/or hydroxyl groups of the main chain. In the carboxylic group mainly esterification and carbodiimide-

mediated reactions occur. In the hydroxyl group sulfation, esterification, isourea coupling and periodate oxidations may occur (8).

HA crosslinking can be performed with different agents capable of reacting with native or modified HA. Among the different possibilities stands HA crosslinking with adipic hydrazide (ADH). In this methodology, hydrazide is attached to carboxylic groups of glucuronic acid from HA at optimum pH between 4.0 and 4.75, mediated by carbodiimides (9).

Yun *et al.*, in 2004, studied the synthesis of sodium hyaluronate (HNa) particles, produced by emulsifying the aqueous phase in mineral oil (W/O), with Span 80 surfactant, and crosslinked with ADH and chloride carbodiimide (EDCl) in pH 4 (optimum pH for this reaction). Experimental results showed that the emulsifying technique produced polydispersed particles, with most particle sizes ranging from 2 to 23  $\mu$ m. The emulsification process required the use of surfactant and subsequent removal of oil by washing with isopropyl alcohol (IPA), which caused significant losses of particles in the process (10).

Aiming to eliminate the oil phase, Hu *et al.* (2006) patented a nanoprecipitation process for the production of HA nanoparticles free of surfactant and oil. The process includes the replacement of the oil phase by acetone. The aqueous phase containing HNa was initially precipitated in organic solvent and then HA was crosslinked with ADH and EDCl. Crosslinking reaction was slow, it took around 44 hours, but it resulted in HA particles free of oil and surfactant and with a uniform size of 200 nm (11).

Nanoprecipitation technique presents numerous advantages. It is a straightforward technique, rapid and easy to perform. It does not require extended shearing/stirring rates, sonication or very high temperatures, and it is characterized by the absence of oily-aqueous interfaces. Moreover, surfactants are not always needed and unacceptable toxic organic solvents are generally excluded from this procedure (12).

Most particles which have been prepared by nanoprecipitation use hydrophobic polymers. To achieve nanoprecipitation, an organic solution with the polymer is added to a non-solvent of the polymer (generally water), with which the organic solvent is miscible. Nanoparticles are formed instantaneously by precipitation of the polymer in a narrow range of composition, after which the organic solvent can be removed by evaporation (13). Studies of hydrophilic polymer particles produced by nanoprecipitation are still very scarce in the literature. As far as we know, HA nanoparticle formation by nanoprecipitation was studied only by Hu *et al.* (11). In this case, the global process is basically composed of two main steps: nanoprecipitation and chemical crosslinking of the preformed particles. In the

crosslinking reaction, N-substituted carbodiimides of EDCl react with carboxylic acids on HA chains to form highly reactive O-acylisourea derivatives that are extremely short-lived. This active species then reacts with two ends primary amines of ADH, resulting in the neighboring HA chains being chemically crosslinked (11).

Considering the importance of the pH in the steps of precipitation and ADH and EDCl crosslinking reaction, the purpose of this work is to analyze the influence of pH on the production of HA nanoparticles by a discontinuous process as well as its influence on HA nanoparticle physicochemical properties.

#### **Material and Methods**

### Preparation of HA nanoparticles

Nanoparticles production was carried out in a jacket glass reactor of 400 mL, equipped with a mechanical stirrer (model TE-039/1, Tecnal). The temperature in the reactor was controlled by circulating water from a thermostat bath (model TE-184, Tecnal). HA with molecular weight 2 000 Da was used in its salt form HNa from a 1% solution (from China and distributed by Galena Chemicals and Pharmaceuticals Ltd). Nanoparticles were obtained by nanoprecipitation, followed by chemical crosslinking, of HNa with ADH (SIGMA - St. Louis, USA) and EDCl (SIGMA - St. Louis, USA), according to the protocol proposed by Hu *et al.* in 2006 (11), described in Figure 1. Initially, 137 mL of acetone were added into an aqueous solution composed of 80 mL of water and 8 g of HA (1%). The system was maintained at 21 °C with agitation for 2 hours. Next, 80 mg of EDCl and 40 mg of ADH in 2 mL of water were added to the system, and it was stirred for 24 h. Then, the second part of acetone (132 mL) was added and the system was stirred for another 20 more hours. Finally, we modified the recovery step of the Hu *et al.* protocol (11) by recovering the synthesized particles from the reacting medium by ultrafiltration with a 10 kDa Millipore membrane. All experiments were performed in duplicate.



Figure 1 – Schematic of HA nanoparticle synthesis by nanoprecipitation and ADH/EDCl crosslinking.

# Effects of pH

The changes in pH were made by additions of hydrochloric acid 2% or sodium hydroxide 2% to the three steps of the process (Figure 1): after the first addition of the organic solvent, in the nanoprecipitation step, where coil globules were formed; after the addition of ADH and EDCl, in the first crosslinking reaction step; or after the second addition of the organic solvent, in the second crosslinking reaction step.

### Characterization of HA nanoparticles

HA nanoparticles were characterized by measuring the hydrodynamic mean diameter, polydispersity and zeta potential. Measurements were performed in triplicate with a Zetasizer Nano Series ZS (Malvern Instruments) with fixed angle of 173°. Statistical analyses included a 2-sample t-test, performed with *Minitab* software.

#### Results

### Influence of pH on the nanoprecipitated coil globules

The influence of pH on the nanoprecipitation stage, where the precipitated coil globules were formed, was analyzed in acid (pH 4) and neutral (pH 6) media. The coil globules presented smaller mean diameter (449.82 nm) and polydispersity (0.52) in pH 4 than in pH 6. Besides, the zeta potentials were similar in both cases (-30 mV), indicating a moderate electrostatic stability of the particles (Table 1).

Table 1 – Mean diameter, polydispersity and zeta potential of coil globules precursor of HA nanoparticles obtained in pH 4 and pH 6

рН	4	6	P-Value**
Mean Diameter (nm)*	449.82 ± 119.29	1178.16 ± 544.44	0.02
Polydispersity	$0.52 \pm 0.14$	$0.70 \pm 0.14$	0.05
Zeta Potential (mV)	- 30.43 ± 2.00	- 31.77 ± 21.22	0.88

\* Mean diameter determined by Z-average.

\*\* P-Value > 0.05 indicates that the values compared are not significantly different.

### Influence of pH on HA particles

In order to verify the influence of pH on both nanoprecipitation and crosslinking reaction stages, as well as its influence on size distribution and zeta potentials of HA particles, the process was conducted by varying the pH to 4 and 6 in both stages. Table 2 shows the obtained results in each type of experiment. All P-values were calculated between the analyzed modifications and the Hu *et al.* procedure (11), which occurred with nanoprecipitation and crosslinking reaction at pH 6.

		-			
рн		Mean Diameter	Polydispersity	Zeta Potential	
Nanoprecipitation	Crosslinking	(1111)		(1110)	
6	6 6		0.27 ± 0.11	- 22.60 ± 4.02	
4 4		1271.30 ± 267.15	0.67 ± 0.12	- 33.28 ± 6.58	
P-value**		0.00	0.00	0.01	
6 4		158.98 ± 78.77	$0.49 \pm 0.08$	- 22.18 ± 12.20	
P-value**		0.29	0.01	0.94	
4	6	$97.87 \pm 6.43$	$0.19 \pm 0.04$	- 40.60 ± 3.18	
P-value**		0.01	0.15	0.00	

Table 2 – Mean diameter, polydispersity and zeta potential of the particles obtained in different pH conditions

\* Mean diameter determined by Z-average.

\*\* P-Value > 0.05 indicates that the values compared are not significantly different.

In order to verify if the final HA particles obtained, when the nanoprecipitation occurred in an acid environment, were smaller than the ones obtained in a neutral environment, as it occurred with the coil globules (Table 1), the pH was decreased in the beginning of the process and maintained until the end (nanoprecipitation and crosslinking in pH 4), and the results are shown in Table 2. In this case, the final particles were larger (1271.30 nm) and more polydispersed (0.67) when produced in pH 4, but they presented a higher electrostatic stability, due to a more negative zeta potential (-33.28 mV).

When we maintained the nanoprecipitation at pH 6 and decreased the pH to 4 only soon after the addition of ADH and EDCl (first crosslinking reaction stage), the mean diameter and stability of the particles obtained did not vary significantly (P-values higher than 0.05), but they were more polydispersed when the crosslinking reaction took place at pH 4 (0.49).

As it can be observed from these results, the nanoprecipitation in an acid environment favored the formation of smaller, less polydispersed coil globules, while the crosslinking reaction in this acid environment favored the formation of bigger and more polydispersed particles. Therefore, we tried to combine the nanoprecipitation stage at pH 4 and the crosslinking reaction at pH 6, aiming to obtain smaller and less polydispersed particles. As expected, the final HA nanoparticles were smaller (97.87 nm) and also more electrostatically stable (-40.60 mV) when we combined an acid nanoprecipitation stage with a neutral

crosslinking reaction. The polydispersity, on the other hand, did not vary significantly (Table 2).

Besides the experiments conducted and presented in Table 2, the pH was also decreased from 6 to 4 in the second crosslinking reaction step (after the second addition of solvent) and, in this case, microparticles were obtained instantly, as it could be observed by the instant turbidity of the solution, instead of the formation of a bluish solution.

#### Discussion

According to the Hu *et al.* protocol (11), the discontinuous process is basically composed of 3 stages (Figure 2). The first one starts with the addition of organic solvent (acetone) to a HA aqueous solution. As it is added, water diffuses to acetone, forming a supersaturated HA solution, leading to HA molecules precipitation and formation of fluid coil globules, which are large and highly polydispersed. Two hours after the acetone addition, ADH and EDCl are added. Then, as the coil globules are dehydrated, by water diffusion to acetone, the carboxylic groups are released for the crosslinking reaction. At this stage, crosslinking occurs mostly on the outside of the coil globules, since there is a rapid superficial dehydration. With the second acetone addition (third stage) more water diffuses to the organic phase and then, crosslinking reaction also occurs inside the coil globules. However, not all the water inside the unstable coil globules is able to move out, which probably leads to generation of amorphous nanoparticles.



Figure 2 – Scheme of nanoparticle formation mechanism by a discontinuous process: (A) precipitated polymer coil globule by dehydration, (B) dehydration and external crosslinking,(C) dehydration, and external and internal crosslinking

As studied by Prestwich *et al.* (1998), the optimum pH for crosslinking reaction of HA with ADH and EDCl is between 4 and 4.75 (9). However, Hu *et al.* (2006) produced crosslinked HA nanoparticles free of oil and surfactants at pH 6, as we measured. Therefore, in this case, the crosslinking reaction occurs in a slower rate.

The processes were analyzed with the stages at pH 4 or pH 6. At pH 6, carboxylic groups of glucuronic acid units are predominantly ionized, since the pK of such groups is

between 3 and 4 (3). Therefore, at this pH, repulsive forces between carboxylic groups from HA molecules are stronger compared to the repulsive forces at pH 4.0, leading to larger coil globules (Table 1).

Water diffusion rate to the organic phase and crosslinking reaction rate are determinants for the diameter of particles and polydispersity. The higher the pH, the more ionized the carboxylic groups are, the stronger the repulsive forces between them are, the farther the HA chains are and the larger and more hydrated the fluid coil globules will be (Table 1). In both cases presented in Table 1, the high standard deviations from mean diameter measurements are generated by the fluidity of HA chains inside the coil globules.

On the other hand, in an acid environment (pH 4), the crosslinking reaction leads to larger and more polydispersed particles. That happens because pH 4 is the optimum pH for the crosslinking reaction between HA, ADH and EDCl. Therefore, the results suggest that at pH 4 crosslinking occurrs not only between HA chains, but also between the coil globules already formed, which leads to larger and more polydispersed HA particles.

When nanoprecipitation stage is at pH 6, carboxylic groups of HA are predominantly ionized, having strong repulsive forces between them. Besides, coil globules are much hydrated. Then, dehydration velocity is slow, taking more time for carboxylic groups to be available for the crosslinking reaction. Changing crosslinking reaction stage to pH 4 or 6 does not make much of a difference. As it can be seen in Table 2, in both cases HA nanoparticles mean diameters are around 120 nm. Therefore, it could be concluded that for nanoprecipitation stages with high pHs, the limiting factor is dehydration rate. On the other hand, when pH is 4 at the nanoprecipitation stage, carboxylic groups are not predominantly ionized. Then, repulsive forces between carboxylic groups are not strong, HA chains are not so distant and HA coil globules are not so hydrated. In this case, changing the crosslinking reaction stage to pH 4 or 6 makes a huge difference. Maintaining the crosslinking reaction at pH 4, the final particles are around 1200 nm. However, changing the crosslinking reaction stage to pH 6, the final particles become the smallest, around 100 nm. In this case, as dehydration velocity is not low, the crosslinking reaction rate is the limiting factor. At pH 4, the optimum pH for this crosslinking reaction, the crosslinking occurs not only between HA chains, but also between the coil globules already formed, which leads to larger and more polydispersed HA particles. On the other hand, at pH 6, the crosslinking reaction is slower, occurring only between HA chains.
## Conclusions

The study showed that pH influences the production and physicochemical properties of HA nanoparticles. An acid medium favored the formation of smaller coil globules, due to HA molecules contraction. On the other hand, an acid medium also favored inter-particles crosslinking, leading to bigger final particles. Therefore, a combination of an acid nanoprecipitation stage and a neutral crosslinking reaction modulates the size and polydispersity of HA nanoparticles.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Gilson Barbosa Maia Júnior in appreciation of his technical assistance.

This work was supported by the agency "Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)" - Brazil.

### References

- H. Garg and C. Hales, *Chemistry and biology of hyaluronan*, Elsevier, Kidlington (2004).
- A. Almond, T. E. Hardingham (2008). Hyaluronan: current macromoleculrar and micromolecular views. Available at: <u>http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA31/HA31E.html</u>. Accessed 15 June 2010.
- V. C. Hascall, T. C. Laurent (1997). Hyaluronan: structure and physical properties. Available at: <u>http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html</u>. Acessed 22 March 2010.
- M. K. Cowman and S. Matsuoka, Carbohydr. Res., 340 (2005) 791-809.
- I. Gatej, M. Popa, M. Rinaudo, Biomacromol., 6 (2005) 61-67.
- G. D. Prestwich, H. Li, Y. Liu, X. Z. Shu, S. D. Gray, Biomacromol., 5 (2004) 895-902.
- K. Tomihata and Y. Ikada, J. Biomed. Mater. Res., 37 (1997) 243-251.
- G. D. Prestwich (2001). Biomaterials from chemically-modified hyaluronan. Available at: <u>http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA18/HA18E.html</u>. Accessed 22 March 2010.
- G. D. Prestwich, D. M. Marecak, J. F. Mareck, K. P. Vercruysee, M. R. Ziebell, J. Control. Release, 53 (1998) 93-103.
- Y. H. Yun, D. J. Goetz, P. Yellen, W. Chen, Biomater., 25 (2004) 147-157.
- Z. Hu, X. Xia, L. Tang (2006). Process for synthesizing oil and surfactant-free hyaluronic acid nanoparticles and microparticles. US Patent 20060040892 A1. Available at: <u>http://www.freepatentsonline.com/20060040892.pdf</u>. Accessed 13 April 2009.
- U. Bilati, E. Allémann, E. Doelker, Eur. J. Pharm. Sci., 24 (2005) 67-75.

 P. Legrand, S. Lesieur, A. Bochot, R. Gref, W. Raatjes, G. Barratt, C. Vauthier, Int. J. Pharm., 344 (2007) 33-47. 4.3) SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR NANOPRECIPITAÇÃO CONTROLADA EM SOLUÇÃO *BULK* OU EM CANAIS MICROFLUÍDICOS

> ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO "AICHE JOURNAL"

# SYNTHESIS OF HYALURONIC ACID NANOPARTICLES BY CONTROLLED PRECIPITATION IN BULK SOLUTION OR IN MICROFLUIDIC CHANNELS

Rafaela Costa Souza Bicudo and Maria Helena Andrade Santana\*. Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil

\*Corresponding author - Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil +55 19 35213921 mariahelena.santana@gmail.com

Keywords: hyaluronic acid, nanoparticles, bulk solution, microfluidic channels, nanoprecipitation

#### Abstract

Hyaluronic acid is a hydrophilic mucopolysaccharide which presents many applications in the medical, pharmaceutical and cosmetic areas, used as sponges, films, or particle formulations. To accomplish this, nanoprecipitation free of oil and surfactants is one of the methods used for nanoparticle production. In this work, it was studied hyaluronic acid nanoprecipitation followed by chemical crosslinking with adipic hydrazide and chloride carbodiimide in discontinuous and continuous processes. The discontinuous process was carried out in bulk solution, while the continuous process occurred inside microchannels, and the particles were formed at the interface between water and the organic phase. In both processes the organic solvents used were ethanol, isopropyl alcohol and acetone. All nanoparticles obtained presented moderate electrostatic stability. In the discontinuous process, their size and polydispersity correlated with the surface tension of the system, while these physico-chemical properties correlated with the affinity between water and the organic phase in the continuous process.

#### Introduction

Hyaluronic acid (HA) is a natural, linear, hydrophilic mucopolysaccharide composed of alternating units of D-glucuronic acid and N-acetylglucosamine joined by  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -1,4 linkages. It is a great component in animal tissues, especially in the umbilical cord, synovial fluid and vitreous humor (1). Owing to its abilities to retain large volumes of water, its unique rheological properties as well as its biological functionality, HA has been used free, in sponges, films or nanoparticles, in a wide range of applications (2,3,4,5).

However, natural HA is soluble in water at room temperature and it is rapidly degraded *in vivo* by enzymes, free radicals and reactive oxygen species associated with inflammatory responses (2). Therefore, chemically modified HA derivatives have been developed, decreasing its solubility and enhancing mechanical and biological properties for specific medical, pharmaceutical and cosmetic applications (3).

Although numerous methods for the production of polymer nanoparticles are used, as far as we know, the emulsification of water in mineral oil (w/o) (4) and the nanoprecipitation free of oil and surfactants (6) have been the only ones described in the literature for HA nanoparticles production. In both cases, the carboxylic groups of glucuronic acid from HA are crosslinked with adipic hydrazide (ADH) in a reaction mediated by chloride carbodiimide (EDCl) in aqueous media.

Nanoprecipitation technique presents numerous advantages. It is a straightforward technique, rapid and easy to perform. It does not require extended shearing/stirring rates, sonication or very high temperatures, it is characterized by the absence of oily-aqueous interfaces, surfactants are not always needed and unacceptable toxic organic solvents are generally excluded from this procedure (7). From the standpoint of formulation, the freedom to choose the solvents is particularly interesting because it allows us to have a wide range of

solvents with which a large number of polymers and drugs can be formulated. Furthermore, using different solvents to prepare nanoparticles enable us to modify not only particle size, but also their internal and external structures, such as their porosity and roughness (8).

Most particles which have been prepared by nanoprecipitation use hydrophobic polymers in discontinuous process. To achieve nanoprecipitation, an organic solvent with the polymer is added to a non-solvent of the polymer (generally water), with which the organic solvent is miscible. Nanoparticles are formed instantaneously by precipitation of the polymer in a narrow window of composition and the organic solvent can be removed by evaporation (9). Studies of hydrophilic polymer particles produced by nanoprecipitation are still very scarce in the literature. As far as we know, HA nanoparticle formation by nanoprecipitation was previously studied only by Hu *et al.* (6).

Although the above mentioned benefits, concerning nanoprecipitation in discontinuous processes, the local environment is not well controlled, leading to significant chemical fluctuations, electrical or mechanical perturbations that often result in non-homogeneous nanoparticle populations. To circumvent this problem, continuous processes inside microfluidic systems have been used. In these systems, interfacial forces dominate and bulk inertial forces are often negligible, leading to enhanced heat and diffusional mass-transfer properties. Besides, the particles continuous formation in a microfluidic system prevents processes of disintegration and aggregation often required in traditional discontinuous technologies and enables the dynamic control of flow and of mixture parameters to produce particles for a specific application (10).

The continuos production of nanoparticles by precipitation in microchannels is still a novel issue, with few works described in the literature. Zhang and collaborators, in 2008, presented a method for producing solid lipid nanoparticles (SLNs) by nanoprecipitation in a microchannel system with cross-shaped junction (11). The system consisted of interconnected

100

capillaries, where a lipid phase in organic solvent and an aqueous phase with surfactant were injected simultaneously. The solvent of the lipid phase diffused rapidly to the aqueous phase, resulting in lipids supersaturation and consequent formation of SLNs in the interface between the fluids. Other studies involving the continuous formation of liposomes, which associate precipitation and self aggregation of lipids have also been described in the literature (10).

Considering the importance of HA nanoparticles, as well as drug delivery applications, this paper presents a comparative study of the production of HA nanoparticles by nanoprecipitation, followed by chemical crosslinking with ADH and EDCl in the absence of oil and surfactant, in discontinuous and continuous processes. As far as we know, there is no report in the literature describing the production of HA nanoparticles inside microchannels.

The discontinuous process followed the protocol described by Hu and collaborators in 2006 (6) and the continuous process was carried out inside a cross-flow microchannel system similar to the one used by Zhang and collaborators (2008) to produce SLNs (11). In both cases, ethanol, isopropyl alcohol or acetone were used as organic phases.

#### **Materials and Methods**

### Preparation of HA nanoparticles

The discontinuous process was carried out in a jacket glass reactor of 400 mL, equipped with a mechanical stirrer (model TE-039/1, Tecnal). The temperature in the reactor was controlled by circulating water from a thermostat bath (model TE-184, Tecnal). HA with molecular weight 2 000 Da was used in its salt form HNa from a 1% solution (from China and distributed by Galena Chemicals and Pharmaceuticals Ltd). Nanoparticles were obtained by nanoprecipitation followed by chemical crosslinking of HNa with ADH (SIGMA - St. Louis, USA) and EDCl (SIGMA - St. Louis, USA), according to the protocol proposed by Hu *et al.* (5), described in Figure 1. Initially, we had an aqueous solution composed of 80 mL of water and 8 g of HA (1%). Then, the first volume of organic solvent (109, 143 or 137 mL of ethanol, IPA or acetone, respectively) was added. The system was maintained at 21 °C with agitation for 2 hours. Next, 80 mg of EDCl and 40 mg of ADH in 2 mL of water were added to the system, and it was stirred for 24 h. Then, the second part of organic solvent (105, 137 or 132 mL of ethanol, IPA or acetone, respectively) was added, and the system was stirred for another 20 h. Different volumes of organic solvents were used to maintain the same molar ratio between HA and the organic solvents.

The experiments in continuous process were carried out inside a crossflow microchannel system, as shown in Figure 2, which was designed and constructed in the Technology Processes and Products Center of IPT-SP. It presented a width of  $140 \pm 1 \mu m$  at the extremities and of  $200 \pm 1 \mu m$  near the T junction, and  $50 \pm 2 \mu m$  in depth throughout its length. The aqueous phase with HA, ADH and EDCl was pumped into the main channel. At the same time, the organic phase (acetone, ethanol or IPA) was fed into both branch channels using two identical but separate syringes by another pump which could hold two syringes and

ensure an equal flow rate. The images of the flow field behaviors in microchannels were captured by a trinocular microscope and recorded on a personal computer. The effluent was collected and used for further analysis. The processes were performed under flow rates that provided the same water-organic solvent volume ratio of the discontinuous processes at the continuous interface.

Finally, we modified the recovery step of the Hu *et al.* protocol (7) by recovering the synthesized particles from the reacting medium by ultrafiltration with a 10 kDa Millipore membrane. All experiments were performed in duplicate.

## Discontinuous and continuous processes

Figures 1 and 2 show schemes of the discontinuous and continuous processes, conducted in a jacket reactor and inside a cross-flow microchannel, respectively.



Figure 1 – Scheme of HA nanoparticles production in the discontinuous process



Figure 2 – Scheme of the cross-flow microchannel used for the continuous production of HA nanoparticles

## Characterization of HA nanoparticles

HA nanoparticles were characterized by measuring the hydrodynamic mean diameter, polydispersity and zeta potential. The measurements were performed in triplicate, in a Zetasizer Nano Series ZS (Malvern Instruments) with fixed angle of 173°. Statistical analyses included a 2-sample t-test, performed with *Minitab* software.

### **Results and Discussion**

The discontinuous process was carried out by pouring the organic phase into HA aqueous solution under stirring. The water diffused into the organic solvent and the HA coil globules were precipitated and crosslinked. On the other hand, in the continuous process, nanoprecipitation occurred in a laminar flow inside a cross-flow microchannel, formed at the interface between the organic phase (polymer non-solvent) and water, in which HA was solubilized. In both cases, the mechanism of nanoparticle formation was based on water-non-solvent, water-polymer and non-solvent-polymer interactions.

Besides acetone, used by Hu *et al.* (6) in a bulk solution, ethanol and IPA were also chosen as HA non-solvents, according to Bagley's criterium (12,13) and their performance in precipitation processes for HA purification (1).

## Mean diameters and distribution of HA particles

Figure 3 and Table 1 show the performance of both systems in the synthesis of HA nanoparticles, in terms of HA nanoparticles size distribution, polidyspersity and zeta potential.



Figure 3 – Comparison of size distribution curves, in terms of the number of particles,
obtained in discontinuous and continuous experiments, with different solvents: ethanol (A and B), IPA (C and D) and acetone (E and F). (Left; A, C and E) Size distribution curves of particles obtained in discontinuous systems. (Right; B, D and F) Size distribution curves of particles obtained in continuous systems. The multiple curves on each graph represent individual measurements of two different samples of HA particles

Solvents	Mean Diameter (nm)*			
Solvents	Discontinuous	Continuous	P-value**	
Ethanol	$239.15 \pm 46.05$	$141.90 \pm 30.46$	0.00	
IPA	$421.98 \pm 15.34$	$216.63 \pm 20.03$	0.00	
Acetone	$120.44 \pm 12.14$	$463.17 \pm 7.17$	0.00	
Solvents	Polydispersity			
	Discontinuous	Continuous	P-value**	
Ethanol	$0.53 \pm 0.11$	$0.20 \pm 0.04$	0.00	
IPA	$0.54 \pm 0.16$	$0.04 \pm 0.03$	0.00	
Acetone	$0.27 \pm 0.11$	$0.33 \pm 0.04$	0.25	
Solvents	Zeta Potential (mV)			
	Discontinuous	Continuous	P-value**	
Ethanol	$-29.53 \pm 5.49$	$-23.02 \pm 2.02$	0.04	
IPA	$-32.20 \pm 7.77$	$-18.45 \pm 2.25$	0.01	
Acetone	$-22.60 \pm 4.02$	$-35.00 \pm 3.50$	0.00	

Table 1 – Comparison of mean diameter, polydispersity and zeta potential of HA nanoparticles produced in discontinuous and continuous processes

\* Mean diameter determined by Z-average.

\*\* P-Value > 0.05 indicates that the values compared are not significantly different.

It can be noticed in Table 1 that in the presence of IPA or ethanol smaller and less polydispersed nanoparticles were formed in the continuous process, while in the discontinuous process smaller nanoparticles were obtained with acetone. Nanoparticle polydispersity in the continuous process with IPA or ethanol was lower than the one in the discontinuous process, while it did not vary significantly from the continuous to the discontinuous process using acetone (P-value = 0.25). Finally, through zeta potential values, moderate electrostatic stabilities were obtained for nanoparticles in both types of process and for all organic solvents used.

HA is completely soluble in water and insoluble in the organic solvents. Therefore, the water-non-solvent-HA interactions at the interface were the only effects analyzed aiming to explain mean diameter, polydispersity and zeta potential of the nanoprecipitated and crosslinked HA nanoparticles.

In the discontinuous process, results show that the mean diameter and polydispersity correlate with the inverse of surface tension (Table 2). As expected, the presence of the polymer decreased the surface tension of water from 72.2 to approximately 66.6 mN/m. Moreover, the presence of an organic solvent further decreased the water surface tension. Ethanol and acetone had similar effects, but IPA had a larger effect. These differences influenced the displacement of water to the organic phase, and altered the precipitation rate of HA molecules. Thus, due to a smaller surface tension in the presence of IPA, water migrated faster into the organic phase compared to the systems with acetone or ethanol.

	HA Concentration	Surface tension
Interfaces	(g/L)	(mN/m)
HA-water	42.1	$66.64 \pm 2.59$
HA-water-ethanol	42.1	$28.64 \pm 0.01$
HA-water-IPA	36.4	$24.65 \pm 0.04$
HA-water-acetone	36.4	$30.33 \pm 0.13$
Water		72.2
Ethanol		22.3
IPA		20.8
Acetone		23.7

Table 2 – Surface tensions at the HA-water-organic solvents

The lower the surface tension, the lower the barrier to be overcome by water diffusion to organic solvent is. In this case, water diffusion rate is higher, leading to a higher nanoprecipitation rate. Then, HA molecules aggregate more, resulting in larger and more polydispersed unstable coil globules and, later, in larger and more polydispersed nanoparticles.

The discontinuous process is basically composed of 3 stages (Figure 4). The first one starts with the addition of the organic solvent to a HA aqueous solution. As it is added, water diffuses to the organic phase, forming a supersaturated HA solution, leading to HA molecules precipitation and formation of fluid coil globules, which are large and highly polydispersed. Two hours after the organic solvent addition, ADH and EDCl are added. Then, as the coil globules are dehydrated, by water diffusion to the organic phase, the carboxylic groups are released for the crosslinking reaction. In this stage, crosslinking occurs mostly on the outside of the coil globules, since there is a rapid superficial dehydration. With the second organic

solvent addition (third stage) more water diffuses to the organic phase and then, crosslinking reaction also occurs inside the coil globules. However, all the water inside the unstable coil globules is not able to move out, which leads to the generation of large and amorphous nanoparticles. And the faster the nanoprecipitation, the larger and more amorphous the HA nanoparticles are.



Figure 4 – Scheme of nanoparticle formation mechanism by a discontinuous process: (A) precipitated polymer coil globule by dehydration, (B) dehydration and external crosslinking, (C) dehydration, and external and internal crosslinking

On the other hand, in the continuous process, results show that the affinity between water and the organic solvent controls the process. The higher the affinity between the organic and the aqueous phases, the lower the interaction (X) and Hansen solubility ( $\Delta\delta$ ) parameters are (Equations 1 and 2). Therefore, the ability of the non-solvents to dehydrate HA decreases from ethanol, IPA to acetone, while the mean diameter increases from ethanol, IPA to acetone (Table 3).

$$X_{solvent-water} = \frac{V_{solvent}}{RT} \cdot (\delta_{solvent} - \delta_{water})^2 \text{ (Equation 1)}$$
  
$$\Delta \delta = (\delta_{solvent} - \delta_{water}) = ((\delta_{D,solvent} - \delta_{D,water})^2 + (\delta_{P,solvent} - \delta_{P,water})^2 + (\delta_{H,solvent} - \delta_{H,water})^2)^{0.5} \text{ (Equation 2)}$$

	Hansen Solubility	Interaction
Organic Solvents	Parameter $(\Delta \delta)^a (Pa^{0.5})$	Parameter $(X)^{b}$
Acetone	3.58E+04	38.60
Isopropyl alcohol	2.77E+04	24.07
Ethanol	2.40E+04	13.76

Table 3 – Hansen solubility and thermodynamic interaction parameters indicate the affinities

between the studied organic solvents and water

<sup>a</sup> The Hansen Solubility parameter was calculated as shown in Equation 1.

<sup>b</sup> The thermodynamic interaction parameter was calculated as shown in Equation 2.

The higher the affinity between them, the higher the water diffusion rate is, leading to a higher nanoprecipitation rate. As the particles precipitate, they move out of the interface, are transported away by the fluid flow and then other molecules go to the interface and precipitate (Figure 5). In the continuous process there is no limitation of mass transfer at the interface and the crosslinking reaction occurs along the microchannel length.



Figure 5 – Scheme of nanoparticle formation mechanism by a continuous process inside a

cross-flow microchannel

The precipitation rate is faster when ethanol is used as the organic phase, generating smaller particles. For solvents with lower affinity, the molecules stay longer at the interface, as a supersaturated solution is not obtained fast and, in this case, molecules aggregate more, forming larger particles. An evidence that crosslinking reaction occured is that the nanoparticles formed were stable and HA was no longer soluble in water.

The effects of the different types of organic solvents used can also be noted by observing the flow field inside the cross-flow microchannel. For the experiments conducted with ethanol or isopropyl alcohol (Figures 6A and 6B), the main channel is very thin, as water diffuses easily to the organic phase. However, when acetone is used (Figure 6C), the main channel is larger, because the affinity between water and acetone is smaller, and being so, water does not diffuse easily to the organic phase. Besides, when acetone is used, the accumulation of HA coil globules inside the main channel can be easily seen. As it takes more time for water to diffuse to the organic phase, HA coil globules stay longer at the interface, aggregate and form larger particles.



Figure 6 – The flow field behavior inside the cross-flow microchannels for different organic solvents used (A: ethanol, B: isopropyl alcohol and C: acetone)

Both discontinuous and continuous processes occurred at pH 6.0. At this pH, all carboxylic groups of glucuronic acid units in HA are ionized, since the pK of such groups is between 3 and 4 (Hascall and Laurent, 2010). Therefore, repulsive forces between carboxylic groups inside HA coil globules make them large. Besides, these coil globules are highly hydrated, due to a great amount of water inside them.

PH 6 is not the optimum pH for the crosslinking reaction of HA with ADH and EDCl. As studied by Prestwich *et al.* (1998), the optimum pH is between 4 and 4.75 (2). Therefore, at pH 6 the reaction occurs in a slower manner. In the continuous process ADH and EDCl are in the system since the beginning. They get inside the HA coil globules with water and then, crosslinking reaction occurs inside and outside the coil globules simultaneously. On the other

hand, in discontinuous processes, ADH and EDCl are added 2 hours after the beginning of the process. Then, HA coil globules are formed only with water inside them. So, crosslinking reactions occur preferentially on the outside of the coil globules (Figure 4).

Figure 7 shows the correlation between the media surface tensions and the organic solvent interaction parameters with HA nanoparticle mean diameter and polydispersity. In the discontinuous process, as the surface tension increased, the HA nanoparticles became smaller. The differences in surface tensions with IPA and ethanol were not significant to alter the polydispersity. However, with acetone, the particles were less polydispersed. On the other hand, in the continuous process, the lower the thermodynamic interaction parameter, the higher the affinity water-organic solvent is and the smaller the HA nanoparticles are. In this case, polydispersity did not correlate with the affinity between water and the organic solvent.



Figure 7 – Correlations among the surface tensions of the different media and interaction

parameters of the organic solvents with mean diameter and polydispersity of HA

## nanoparticles

## Conclusions

HA stable nanoparticles were formed in both continuous and discontinuous processes. The surface tension controlled the mean diameter and polydispersity in the discontinuous process, while in the continuous process these parameters were controlled by the affinity between water and the organic phase. Both processes were simple, reproducible and produced HA nanoparticles free of oil and surfactants. These features are important for the medical, pharmaceutical and cosmetic applications of HA nanoparticles.

## Acknowledgments

The authors thank Prof. Dr. César Costapinto Santana for the use of the tensiometer, and PhD Juliana Schianti and Prof. Dr. Mário Ricardo Gongora Rubio, from Centro de Tecnologia de Processos e Produtos (IPT-SP) for the confection of the microchannels system. Besides, we are grateful to Gilson Barbosa Maia Júnior in appreciation of his technical assistance.

This work was supported by the agency "Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)" - Brazil.

#### Literature Cited

- Garg H, Hales C. Chemistry and biology of hyaluronan. Kidlington:Elsevier Science, 2004.
- Prestwich, GD, Marecak DM, Mareck JF, Vercruysee KP, Ziebell MR. Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. Journal of Controlled Release.1998;53:93-103.
- Tomihata K, Ikada Y. Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. Journal of Biomedical Materials Research.1997;37:243-251.
- Yun YH, Goetz DJ, Yellen P, Chen W. Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting. Biomaterials.2004;25:147-157.
- Kogan G, Soltés L, Stern R. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. Biotechnology Letters.2007;29:17-25.
- Hu Z, Xia X, Tang L. 2006. Process for synthesizing oil and surfactant-free hyaluronic acid nanoparticles and microparticles. US Patent 20060040892 A1. Available at: <u>http://www.freepatentsonline.com/20060040892.pdf</u>. Accessed 13 April 2009.
- Bilati U, Allémann E, Doelker E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. European Journal of Pharmaceutical Sciences.2005;24:67-75.
- Galindo-Rodriguez S, Allemann E, Fessi H, Doelker E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. Pharmaceutical Research.2004;21:1428-1439.
- Legrand P, Lesieur S, Bochot A, Gref R, Raatjes W, Barratt G, Vauthier C. Influence of polymer behavior in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. International Journal of Pharmaceutics. 2007;344:33-47.

- Jahn A, Vreeland WN, Gaitan M, Locascio LE. Controlled vesicle self-assembly in microfluidic channels with hydrodynamic focusing. Journal of the American Chemical Society.2004;126:2674-2675.
- Zhang S, Yun J, Shen S, Chen Z, Yao K, Chen J, Chen B. Formation of solid lipid nanoparticles in a microchannel system with a cross-shaped junction. Chemical Engineering Science.2008;63:5600-5605.
- Bagley EB, Nelson TP, Scigliniano JM. Three-dimensional solubility parameters and their relation to internal pressure measurements in polar and hydrogen bounding solvents. Journal of Paint Technology.1971;43:35-42.
- Van Krevelen DW. Properties of polymers: their correlation with chemical structure; their numerical estimation and prediction from additive group contributions (3rd edition). Amsterdam:Elsevier Science, 1990.

4.4) PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO HIALURÔNICO POR PROCESSO CONTÍNUO NO INTERIOR DE MICROCANAIS: EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE AH E DA TAXA DE VAZÃO RELATIVA

> ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO "CHEMICAL ENGINEERING SCIENCE"

# PRODUCTION OF HYALURONIC ACID (HA) NANOPARTICLES BY CONTINUOUS PROCESS INSIDE MICROCHANNELS: EFFECTS OF HA CONCENTRATION AND RELATIVE FLOW RATE.

Rafaela Costa Souza Bicudo and Maria Helena Andrade Santana\*. Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil, Postal Code: 13083-852

\*Corresponding author - Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil +55 19 35213921 mariahelena.santana@gmail.com

Keywords: hyaluronic acid, nanoparticles, microchannels, nanoprecipitation, chemical crosslinking

#### Abstract

Currently, there is increasing interest in nanostructured materials given their potential regarding various scientific and technological areas, such as the field of controlled release drugs. In most studies, the systems that were particularly interesting were composed of biodegradable natural polymers, such as hyaluronic acid. In this work, the production of hyaluronic acid nanoparticles by nanoprecipitation and chemical crosslinking with adipic hydrazide and chloride carbodiimide inside microchannels was studied. Microfluidic systems provide more controlled processes than the conventional discontinuous ones, what leads to more homogeneous final particles. However, as far as we know, there is no report describing the production of hyaluronic acid nanoparticles by continuous process inside microchannels yet. Therefore, this study analyzed two variables of the microfluidic system: hyaluronic acid concentration and organic phase flow. The process was conducted inside a cross-flow microchannel system where hyaluronic acid solution flowed in the main channel and the organic phase (isopropyl alcohol) flowed in the two lateral channels simultaneously. Nanoprecipitation occurred in a laminar flow inside the microchannel system, formed at the interface between isopropyl alcohol and water. Hyaluronic acid nanoparticles were continuously formed. They presented sizes ranging from 170 to 450 nm, depending on operational conditions, low polydispersity and zeta potentials from -20 to -40 mV, indicating that moderately stable nanoparticles were produced in all conditions used. However, smaller particles were obtained in the systems with lower hyaluronic acid concentrations and higher organic phase flows, due to the higher dehydration rates at the interface.

#### Introduction

Hyaluronic acid (HA) is a natural linear mucopolysaccharide composed of alternating units of D-glucuronic acid and N-acetylglucosamine joined by  $\beta$ -1,3 and  $\beta$ -1,4 linkages. It is a great component in animal tissues, especially in the umbilical cord, synovial fluid and vitreous humor (Garg, 2004).

Currently, there is increasing interest in nanostructured materials given their potential regarding various scientific and technological areas, such as the field of controlled release of drugs. In most studies, the systems that were particularly interesting were composed by biodegradable natural polymers, such as HA (Prestwich et al., 2004).

However, natural HA is soluble in water at room temperature and it is rapidly degraded *in vivo* by enzymes, free radicals and reactive oxygen species associated with inflammatory responses (Prestwich et al., 1998). Therefore, chemically modified HA derivatives have been developed, decreasing its solubility and enhancing mechanical and biological properties for specific medical, pharmaceutical and cosmetic applications (Tomihata and Ikada, 1997).

In 2004, the synthesis of sodium hyaluronate (HNa) particles produced by emulsifying the aqueous phase in mineral oil (W/O), with Span 80 surfactant, and crosslinked with ADH in a reaction mediated by chloride carbodiimide (EDCl) was studied. Experimental results showed that the emulsifying technique produced polydispersed particles, with most particle sizes ranging from 2 to 23  $\mu$ m. The emulsification process required the use of surfactant and subsequent removal of oil by washing with isopropyl alcohol (IPA), which caused significant losses of particles in the process (Yun et al., 2004).

Aiming to eliminate the oil phase, Hu *et al.* (2006) patented a nanoprecipitation process for the production of HA nanoparticles free of surfactant and oil. The process included the replacement of the oil phase by acetone. The aqueous phase containing HNa was initially precipitated in organic solvent and then HA is crosslinked with ADH and EDCl. Crosslinking reaction was slow, it took around 44 hours, but it resulted in HA particles free of oil and surfactant with a uniform size of 200 nm (Hu et al., 2006).

Nanoprecipitation technique presents numerous advantages. It is a straightforward technique, rapid, easy to perform, does not require extended shearing/stirring rates, sonication or very high temperatures, it is characterized by the absence of oily-aqueous interfaces, surfactants are not always needed and unacceptable toxic organic solvents are generally excluded from this procedure (Bilati et al., 2005). However, most nanoprecipitation processes

use hydrophobic polymers for nanoparticles production. Studies of hydrophilic polymer particles produced by nanoprecipitation are still very scarce in the literature. As far as we know, HA nanoparticles formation by nanoprecipitation was studied only by Hu and collaborators (Hu et al., 2006).

Despite all benefits mentioned, nanoprecipitation is usually performed in discontinuous processes. However, in these cases, the local environment is not well controlled, leading to significant chemical fluctuations, electrical or mechanical perturbations that often result in non homogeneous nanoparticles populations. To circumvent this problem, continuous processes inside microfluidic systems have been used. In these systems, interfacial forces dominate and bulk inertial forces are often negligible, leading to enhanced heat- and diffusional mass-transfer properties. Besides, the particles continuous formation in a microfluidic system prevents processes of disintegration and aggregation often required in traditional discontinuous technologies and enables the dynamic control of flow and of mixture parameters to produce particles for a specific application (Jahn et al., 2004).

Due to all these benefits, in 2004, Jahn and collaborators reported the use of microfluidic channels to gain control over the spontaneous self-aggregation of liposomes in a solution of phospholipids (Jahn et al., 2004). In this work they focused hydrodynamically on the lipid chain between the two aqueous buffer solutions in a T junction in a cross-flow microchannel. In a typical procedure, isopropyl alcohol (IPA), containing the dissolved lipids and a fluorescent dye (DiIC18) flowed through the main channel, and a saline aqueous solution of phosphate buffer flowed through two lateral channels. The formation of liposomes was strongly favored in points of the system where the concentration of the mixture IPA/buffer reached a critical condition, in which the lipid solubility was low. The liposomes were formed at the interfacial region along the flow lines and were directed to be collected in the middle of the channel. The liposomes obtained were less polydispersed compared to the ones obtained by the traditional discontinuous methods, and were in the range of 100 to 300 nm. This work was the first demonstration of the fine control that can be achieved using microfluidic interfaces to manipulate aggregates in nanoscale.

Besides the use of microfluidic systems for liposomes production, in 2008, Zhang and collaborators presented a method for the production of solid lipid nanoparticles (SLNs) by nanoprecipitation in a microchannel system with cross-shaped junction (Zhang et al., 2008). The system consisted of interconnected capillaries, where a lipid phase in organic solvent and an aqueous phase with surfactant were injected simultaneously. The solvent of the lipid phase

diffused rapidly into the aqueous phase, resulting in lipids supersaturation and consequent formation of SLNs at the interface between the fluids.

Continuous-flow microfluidic systems have the potential to become a standard technology that allows the production of homogeneous particles and fine control over the critical process parameters that are difficult to control in conventional discontinuous processes (Jahn et al., 2004). However, as far as we know there is no report in the literature describing the production of HA nanoparticles inside microchannels.

Considering the importance of HA nanoparticles for drug delivery applications as well as all the benefits that can be provided by continuous production inside microfluidic channels, this paper presents an analysis of two variables of this process for HA nanoparticles production: HA concentration and organic phase flow.

#### **Materials and Methods**

#### Preparation of HA nanoparticles

The experiments were carried out inside a cross-flow microchannel system, as shown in Figure 1. HNa (from China and distributed by Galena Chemicals and Pharmaceuticals Ltd) aqueous solution, with ADH (SIGMA - St. Louis, USA) and EDCl (SIGMA - St. Louis, USA), was pumped into the main channel. At the same time, the organic phase (isopropyl alcohol) was fed into both branch channels using two identical but separate syringes in another pump, which could hold two syringes and ensure an equal flow rate. The images of the flow field behaviors inside the microchannel were captured by a trinocular microscope and recorded on a personal computer. The effluent was collected and used for further analysis. The synthesized particles were recovered from the reacting medium by ultrafiltration with a 10 kDa Millipore membrane.

The cross-flow microchannel was designed and constructed in the Technology Processes and Products Center of IPT-SP. It presented a width of 140  $\pm$  1  $\mu$ m at the extremities and of 200  $\pm$  1  $\mu$ m near the T junction, and 50  $\pm$  2  $\mu$ m in depth throughout its length.



Figure 1 – Scheme of the cross-flow microchannel used for the continuous production of HA nanoparticles

The influence of HA concentration and of the isopropyl alcohol (IPA) flow on mean diameter, polydispersity and zeta potential of HA nanoparticles was studied. The aqueous phase flow was maintained at 40  $\mu$ L/min, while the organic phase flow was varied from 70
$\mu$ L/min to 40 and 140  $\mu$ L/min. Besides, HA concentration was varied from 1 g/L to 0.5 g/L and 0.25 g/L. All experiments were performed in triplicate.

## Characterization of HA nanoparticles

HA nanoparticles were characterized by measuring the hydrodynamic mean diameter, polydispersity and zeta potential. Measurements were performed in triplicate, in a Zetasizer Nano Series ZS (Malvern Instruments) with fixed angle of 173°. Statistical analysis included a 2-sample t-test, performed with *Minitab* software.

#### Results

HA concentration was varied from 1 g/L to 0.5 and 0.25 g/L, maintaining IPA flow at 70  $\mu$ L/min. Besides, IPA flow rate was varied from 70  $\mu$ L/min to 40 and 140  $\mu$ L/min, maintaining HA concentration at 1 g/L. These variations and the properties of HA particles obtained are shown in Tables 1 and 2.

Table 1 – Mean diameter, polydispersity and zeta potential of nanoparticles obtained with different HA concentrations and organic phase flow of 70 μL/min

HA concentration (g/L)	Mean Diameter (nm)*	P-value**	Polydispersity	P-value**	Zeta Potential (mV)	P-value**
1.00(1)	$236.12 \pm 33.25$	0.00 (1:2)	$0.09 \pm 0.07$	0.55 (1:2)	$-20.92 \pm 4.12$	0.02 (1:2)
0.50 (2)	$188.74 \pm 16.95$	0.03 (2:3)	$0.11 \pm 0.10$	0.87 (2:3)	$-28.11 \pm 6.50$	0.00 (2:3)
0.25 (3)	$171.74 \pm 13.64$	0.00 (3:1)	$0.11 \pm 0.04$	0.49 (3:1)	$-19.48 \pm 3.14$	0.42 (3:1)

\* Mean diameter determined by Z-average.

\*\* P-Value > 0.05 indicates that the values compared are not significantly different.

Numbers in parentheses refer to HA concentrations compared in the P-value calculation

Table 2 – Mean diameter, polydispersity and zeta potential of nanoparticles obtained with different organic phase flows and HA concentration of 1 g/L

p	Organic bhase flow (µL/min)	Mean Diameter (nm)*	P-value**	Polydispersity	P-value**	Zeta Potential (mV)	P-value**
	40 (1)	$452.22 \pm 89.59$	0.00 (1:2)	$0.32\pm0.22$	0.02 (1:2)	$-42.82 \pm 0.57$	0.00 (1:2)
	70 (2)	$236.12 \pm 33.25$	0.00 (2:3)	$0.09\pm0.07$	0.46 (2:3)	$-20.92 \pm 4.12$	0.98 (2:3)
	140 (3)	$173.31 \pm 18.68$	0.00 (3:1)	$0.07\pm0.04$	0.01 (3:1)	$-20.88 \pm 2.26$	0.00 (3:1)
			-				

\* Mean diameter determined by Z-average.

\*\* P-Value > 0.05 indicates that the values compared are not significantly different.

Numbers in parentheses refer to organic phase flows compared in the P-value calculation

The results show that the higher HA concentration and the slower organic phase (IPA) flow, the larger the final particles are (Tables 1 and 2). The HA concentration did not modify significantly HA nanoparticle polydispersities, which were always low (around 0.10). However, for the slowest IPA flow, HA nanoparticle polydispersity was higher (0.32),

differing from the polydispersities obtained with the other flows. Irrespective of HA concentration or of IPA flow, moderately stable nanoparticles were obtained, what is confirmed by the negative and low zeta potential values (Tables 1 and 2).

The effects of HA concentrations and of IPA flows can also be noted at the flow field inside the cross-flow microchannel. The smaller HA concentration and the higher organic phase flow, the smaller the diameter of the central stream is (Figures 2 and 3).



Figure 2 – Flow field behavior inside the cross-flow microchannel for different HA concentrations (A: 1.0 g/L, B: 0.5 g/L and C: 0.25 g/L)



Figure 3 – Flow field behavior inside the cross-flow microchannel for different organic phase flows (A: 40 µL/min, B: 70 µL/min and C: 140 µL/min)

#### Discussion

Nanoprecipitation occurred in a laminar flow inside a cross-flow microchannel, formed at the interface between the organic phase (IPA) and water, in which HA was solubilized. As water diffused into IPA, a supersaturated HA solution was formed at the interface, leading to HA nanoprecipitation and formation of HA coil globules, which are the precursors for HA nanoparticles. Simultaneously, the coil globules were crosslinked with ADH and EDCl, obtaining HA nanoparticles at the interface between the phases. An evidence that crosslinking reaction occured is that the formed nanoparticles were stable and HA was no longer soluble in water.

Water diffused into organic phase leading to a supersaturated HA solution. At the interface water-IPA, there were no diffusive limitations. Then, HA molecules went to the interface, precipitated, crosslinked and formed HA nanoparticles. As particles were formed, they moved out of the interface, were loaded by the fluid flow and then other molecules went to the interface and precipitated (Figure 4).



Figure 4 – Scheme of nanoparticle formation mechanism by a continuous process inside a cross-flow microchannel

The higher the HA concentration, the greater the amount of HA and water inside the coil globules is. Then, as HA molecules precipitate, larger coil globules are formed. Moreover, the more concentrated HA solution, the greater the entanglement between HA chains in coil globules is, leading to larger final particles (Table 1). On the other hand, when the organic phase flow rate is higher, the replacement of the organic solvent at the interface is faster, benefiting dehydration, precipitation and crosslinking of HA nanoparticles. Thus, the

coil globules do not stay for a long time at the interface, avoiding aggregation (Table 2). Therefore, in this case, the particles size depends on the dehydration rate at the interface, which could be controlled by the relative flow rates between the phases.

The process occurred at pH 6.0. At this pH, all carboxylic groups of glucuronic acid units in HA are ionized, since the pK of such groups is between 3 and 4 (Hascall and Laurent, 2010). Therefore, repulsive forces between carboxylic groups inside HA coil globules make them larger. Besides, the coil globules were highly hydrated, due to a great amount of water inside them.

PH 6 is not the optimum pH for the crosslinking reaction of HA with ADH and EDCl. As studied by Prestwich *et al.* (1998), the optimum pH is between 4 and 4.75. Therefore, at pH 6 the reaction occurred in a slower manner. In this process, ADH and EDCl have been in the system since the beginning. So, they got inside the HA coil globules with water and then, crosslinking reaction occurred inside and outside the coil globules simultaneously.

The effects of HA concentrations and IPA flows could also be noted by observing the flow field inside the cross-flow microchannel (Figures 2 and 3). For experiments done with lower HA concentration or with higher IPA flow, the main chain was thinner, as water diffused faster to the organic phase.

#### Conclusions

In this work, the influence of HA concentration and of IPA flow on HA nanoparticles properties were analysed. Water diffusion rate controlled nanoprecipitation rate and, consequently, HA nanoparticles diameters. The higher the HA concentration and the lower the organic phase flow, the larger the particles are, due to a lower water diffusion rate. Moderately stable nanoparticles were obtained irrespectively of HA concentration and of IPA flow used. The process was simple, reproducible and produced HA nanoparticles free of oil and surfactants, features that are important for medical, pharmaceutical and cosmetic applications.

## Acknowledgments

The authors thank PhD Juliana Schianti and Prof. Dr. Mário Ricardo Gongora Rubio, from Centro de Tecnologia de Processos e Produtos (IPT-SP) for the confection of the microchannels system. Besides, we are grateful to Gilson Barbosa Maia Júnior in appreciation of his technical assistance.

This work was supported by the agency "Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)" - Brazil.

## References

- Bilati U, Allémann E, Doelker E (2005) Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. Eur J Pharm Sci 24:67-75.
- Garg H, Hales C (2004) Chemistry and biology of hyaluronan. Elsevier, Kidlington.
- Hu Z, Xia X, Tang L (2006) Process for synthesizing oil and surfactant-free hyaluronic acid nanoparticles and microparticles. US Patent 20060040892 A1. Available at: <u>http://www.freepatentsonline.com/20060040892.pdf</u>. Accessed 13 April 2009.
- Jahn A, Vreeland WN, Gaitan M, Locascio LE (2004) Controlled vesicle selfassembly in microfluidic channels with hydrodynamic focusing. J Am Chem Soc 126:2674-2675.
- Prestwich GD, Li H, Liu Y, Shu XZ, Gray SD (2004) Synthesis and biological evaluation of a cross-linked hyaluronan-mitomycin C hydrogel. Biomacromol 5:895-902.
- Prestwich, GD, Marecak DM, Mareck JF, Vercruysee KP, Ziebell MR (1998) Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. J Control Release 53:93-103.
- Tomihata K, Ikada Y (1997) Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. J Biomed Mater Res 37:243-251.
- Yun YH, Goetz DJ, Yellen P, Chen W (2004) Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting. Biomater 25:147-157.
- Zhang S, Yun J, Shen S, Chen Z, Yao K, Chen J, Chen B (2008) Formation of solid lipid nanoparticles in a microchannel system with a cross-shaped junction. Chem Eng Sci 63:5600-5605.

## 5) CONCLUSÕES

Após os estudos realizados nesse trabalho conclui-se, de modo geral, que as condições operacionais influenciam a produção e as propriedades físico-químicas das nanopartículas de AH obtidas por nanoprecipitação. A caracterização das partículas, das propriedades do polímero e dos solventes, e a análise conjunta com as variáveis operacionais permitem o entendimento dos mecanismos envolvidos nos processos contínuo e descontínuo. Dessa forma, a produção de nanopartículas de AH homogêneas e estáveis poderá ser otimizada para aplicações específicas.

As conclusões abaixo se referem aos aspectos específicos abordados nesse trabalho:

 1 – No processo descontínuo, menores e menos polidispersas nanopartículas de AH são produzidas empregando-se acetona como solvente orgânico, devido a sua menor tensão superficial;

2 – No processo descontínuo, a nanoprecipitação em meio ácido permitiu a formação de núcleos de precipitação menores e menos polidispersos. No entanto, o meio ácido também favoreceu a reação de reticulação entre partículas, levando a maiores partículas finais;

3 – O mecanismo de formação de nanopartículas de AH no processo descontínuo é controlado pela tensão superficial da solução *bulk*, enquanto no processo contínuo ele é controlado pela afinidade água-solvente orgânico;

 4 – No processo contínuo, menores nanopartículas de AH são produzidas com menores concentrações de AH ou com maiores vazões da solução orgânica.

# 6) SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1 – Estudo de outras variáveis operacionais, como temperatura, quantidade de ADH e
 EDCl e diferentes dispositivos microfluídicos.

2 – Estudo e escolha de melhor processo de recuperação das partículas de AH.

 3 – Estudo da combinação do uso de menor volume de solvente com a modificação do pH nas etapas de nanoprecipitação e reticulação.

## 7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLERCREUTZ, P.; STRAATHOF, A. J. J.; Biocatalysis in non-conventional media. *Applied Biocatalysis*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 2000, p.295-316.
- AZEVEDO, M. M. M.; Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. Campinas: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002. Monografia do curso Tópicos Especiais em Química Inorgânica IV - Introdução à nanotecnologia: um enfoque químico, ministrado pelo Prof. Oswaldo Luiz Alves.
- BILATI, U.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal* of Pharmaceutical Sciences, v. 24, p. 67-75, 2005.
- BITTER, T.; MUIR, H. M.; A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 4, p. 330-334, 1962.
- CHOI, S-W.; KWON, H-Y.; KIM, W-S.; KIM, J-H.; Thermodynamic parameters on poly(D,L-lactide-*co*-glycolide) particle size in emulsification-diffusion process. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 201, p. 283-289, 2002.
- COWMAN, M.K.; MATSUOKA, S.; Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research*, v. 340, p. 791-809, 2005.
- DONGHUI, F.; BEIBEI, W.; ZHENG, X.; QISHENG, G.; Determination of hyaluronan by spectroscopic methods. *Journal of Wuhan University of Technology*, v. 21, N° 3, p. 32-34, 2006.
- FERNANDEZ, M. J. A.; FREIRE, M. L. F.; REY, M. B. S.; Hyaluronic acid nanoparticles. US Patent 20060188578 A1.
- FRASER, J. R. E.; LAURENT, T. C.; LAURENT, U. B. G.; Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, v. 242, p. 27-33, 1997.

FROST; SULLIVAN; Total hyaluronic acid-based biomaterials markets, 2004.

- GALINDO-RODRIGUEZ, S.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H; DOELKER, E.; Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical Research*, v. 21, p. 1428-1439, 2004.
- GARG, H.; HALES, C;. Chemistry and biology of hyaluronan. Kidlington: Elsevier Science, 2004.

- GATEJ I, POPA M, RINAUDO M. Role of the pH on hyaluronan behavior in aqueous solution. *Biomacromolecules*, v. 6, p. 61-67, 2005.
- GORHAM, S. D.; OLAVESEN, A. H.; DODGSON, K. S.; Effect of ionic strength and pH on the properties of purified bovine testicular hyaluronidase. *Connective Tissue Research*, v. 3, p. 17-25, 1975.
- HANSEN, C. M.; Hansen solubility parameters: A user's handbook, 2ª edição, 2007.
- HASCALL, V. C.; LAURENT, T. C.; Hyaluronan: structure and physical properties. Disponível em: <<u>http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html</u>>. Acesso em: 20/03/2010.
- HU, Z.; XIA, X.; TANG, L.; Process for synthesizing oil and surfactant-free hyaluronic acid nanoparticles and microparticles. *US Patent 20060040892 A1. (mudar td q é Hu pra Hu e mudar ordem na bibliografia).*
- JAHN, A.; REINER, J.; VREEELAND, W. N.; DEVOE, D. L.; LOCASCIO, L. E.; GAITAN, M.; Preparation of nanoparticles by continuous-flow microfluidics. *Journal* of Nanoparticle Research, v. 10, p. 925-934, 2008.
- JAHN, A.; VREELAND, W. N.; DEVOE, D. L.; GAITAN, M.; LOCASCIO, L. E.; Microfluidic directed formation of liposomes of controlled size. *Langmuir*, v. 23, p. 6289-6293, 2007.
- JAHN, A.; VREELAND, W. N.; GAITAN, M.; LOCASCIO, L. E.; Controlled vesicle selfassembly in microfluidic channels with hydrodynamic focusing. *Journal of the American Chemical Society*, v. 126, p. 2674-2675, 2004.
- KERKER, M.; The scattering of light and other electromagnetic radiation. New York, USA: Academic Press, 1969.
- KIRKER, K. R.; PRESTWICH, G. D.; Physical properties of glycosaminoglycan hydrogels. *Journal of Polymer Science*, v. 42, p. 4344-4356, 2004.
- KIM, S. J.; SHIN, S. R.; LEE, K. B.; PARK, Y. D.; KIM, S. I.; Synthesis and characteristics of polyelectrolyte complexes composed of chitosan and hyaluronic acid. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 91, p. 2908-2913, 2004.
- KOGAN, G.; SOLTÉS, L.; STERN, R.; Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, v. 29, p. 17-25, 2007.
- KUBO, T. M. O.; Preparação e caracterização de micropartículas de hialuronato de sódio para encapsulação e liberação controlada de proteínas para aplicação nasal.

Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005. Dissertação (Mestrado)

- LEGRAND P, LESIEUR S, BOCHOT A, GREF R, RAATJES W, BARRATT G, VAUTHIER C. Influence of polymer behavior in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 344, p. 33-47, 2007.
- LOWERY, T. H.; RICHARDSON, K.S.; *Mechanism and Theory in Organic Chemistry*, Harper Collins Publishers, Ed. 3, 1987, p.181-183.
- M2 PRESSWIRE; The world's market for drug delivery technology is worth in excess of US\$25 billion, 2006.
- MOHAPATRA, S. S.; SAHOO, B.; KUMAR, A.; BEHERA, S.; A method of transdermal drug delivery using hyaluronic acid nanoparticles. *US Patent 20070036728 A1*.
- NOH, I.; KIM, G-W.; CHOI, Y-J.; KIM, M-S.; PARK, Y.; LEE, K-B.; KIM, I-S.; HWANG, S-J.; TAE, G.; Effects of cross-linking molecular weights in a hyaluronic acidpoly(ethylene oxide) hydrogel network on its properties. *Biomedical Materials*, v. 1, p. 116-123, 2006.
- OH, E. J.; KANG, S-W.; KIM, B-S.; JIANG, G.; CHO, I. H.; HAHN, S. K.; Control of the molecular degradation of hyaluronic acid hydrogels for tissue augmentation. *Journal of Biomedical Materials Research*, Part A, v. 86A, p. 685-693, 2007.
- PITARRESI, G.; CRAPARO, E.F.; PALUMBO, F.S.; CARLISI, B.; GIAMMONA, G.; Composite nanoparticles based on hyaluronic acid chemically cross-linked with α,βpolyaspartylhydrazide. *Biomacromolecules*, v. 8, p. 1890-1898, 2007.
- POUYANI, T.; HARBISON, G. S.; PRESTWICH, G. D.; Novel hydrogels of hyaluronicc acid: synthesis, surface morphology, and solid-state NMR. *Journal of the American Chemical Society*, v. 116, p. 7515-7522, 1994.
- PRESTWICH, G. D.; Biomaterials from chemically-modified hyaluronan. Disponível em: <<u>http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA18/HA18E.html</u>>. Acesso em: 22/03/2010.
- PRESTWICH, G. D.; LI, H.; LIU, Y.; SHU, X.Z.; GRAY, S.D.; Synthesis and biological evaluation of a cross-linked hyaluronan-mitomycin C hydrogel. *Biomacromolecules*, v. 5, p. 895-902, 2004.
- PRESTWICH, G.D.; MARECAK, D.M.; MARECEK, J.F.; VERCRUYSEE, K.P.; ZIEBELL, M.R.; Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis,

applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *Journal of Controlled Release*, v. 53, p. 93-103, 1998.

- SANGUANSRI, P.; AUGUSTIN, M. A.; Nanoscale materials development a food industry perspective. *Trends in Food Science and Technology*, v.17, p. 547-556, 2006.
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.; Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, p. 726-737, 2003.
- SILVA, A. R. S.; Análise morfológica e conteúdo mineral da cárie de radiação. Estudo por microscopia de luz polarizada e microscopia eletrônica de varredura. Piracicaba:
  Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 2008. Dissertação (Mestrado).
- STAINMESSE S, ORECCHIONI AM, NAKACHE E, PUISIEUX F, FESSI H. Formation and stabilization of a biodegradable polymeric colloidal suspension of nanoparticles. *Colloid and Polymer Science*, v. 273, p. 505-511, 1995.
- THIOUNE, O.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F.; Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation : influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 146, p. 233-238, 1997.
- TOMIHATA, K.; IKADA, Y.; Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 37, p. 243-251, 1997.
- VAN KREVELEN, D.W. Properties of polymers: their correlation with chemical structure; their numerical estimation and prediction from additive group contributions. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science Publisher and Distributor, 1990.
- VOLPI, N.; Fractionation of heparin, dermatan sulfate, and chondroitin sulfate by sequential precipitation: a method to purify a single glycosaminoglycan species from a mixture. *Analytical Biochemistry*, v. 218, p. 382-391, 1994.
- VOLPI, N.; Purification of heparin, dermatan sulfate and chondroitin sulfate from mixtures by sequential precipitation with various organic solvents. *Journal of Chromatography*, v. 685, p. 27-34, 1996.
- YUN, Y. H.; GOETZ, D. J.; YELLEN, P.; CHEN, W.; Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting. *Biomaterials*, v. 25, p. 147-157, 2004.
- ZHANG, S.; YUN, J.; SHEN, S.; CHEN, Z.; YAO, K.; CHEN, J.; CHEN, B.; Formation of solid lipid nanoparticles in a microchannel system with a cross-shaped junction. *Chemical Engineering Science*, v. 63, p. 5600-5605, 2008a.

ZHANG, S-H.; SHEN, S-C.; CHEN, Z.; YUN, J-X.; YAO, K-J.; CHEN, B-B.; CHEN, J-Z.; Preparation of solid lipid nanoparticles in co-flowing microchannels. *Chemical Engineering Journal*, v. 144, p. 324-328, 2008b.

# 8) APÊNDICE

Aqui são apresentados materiais, métodos e resultados que não foram apresentados nos artigos, mas que acrescentam importantes informações ao trabalho.

## Materiais e métodos

#### 1) Morfologia

#### Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi empregada a fim de se visualizar e analisar a morfologia das nanopartículas. As amostras foram recobertas com ouro utilizandose o equipamento Sputter Coater POLARON, SC7620, e visualizadas no microscópio LEO Electron Microscopy, Leo 440i, equipado com detector de energia dispersiva de raios-X.

#### Microscopia eletrônica de transmissão

Para uma maior ampliação das nanopartículas, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi empregada. Foram utilizadas telas de cobre de 200 mesh como suporte. Sobre o suporte foi aplicada uma gota de cada preparação e incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente, sendo posteriormente retirado o excesso de solução. Uma gota de acetato de uranila 1% p/v (em solução salina 0,9%) foi, então, adicionada, mantendo a incubação durante 1 minuto à temperatura ambiente, sendo também o excesso eliminado e a tela seca ao ar. As estruturas foram visualizadas em microscópio Carl Zeiss, CEM 902, equipado com filtro de energia Castaing-Henry-Ottensmeyer, sendo as imagens adquiridas através de câmera CCD (Proscan).

#### Microscopia de luz polarizada

A microscopia de luz polarizada foi empregada a fim de se diferenciar regiões amorfas e cristalinas. Para isso, utilizou-se o microscópio Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena.

#### 2) Rendimento

#### Método do carbazol modificado

A análise do rendimento do processo de produção das partículas foi feita determinando-se a concentração de nanopartículas de AH através do método modificado do carbazol, proposto por Bitter e Muir em 1962, o qual quebra as ligações entre as cadeias de AH das partículas e, ao se ligar com os grupos de ácidos urônicos liberados, fornece a concentração da solução. A Figura A.1 apresenta esquematicamente as etapas deste método:



Figura A.1 – Representação esquemática do método modificado do carbazol (Adaptado de Bitter e Muir, 1962)

Inicialmente, volumes de 3 mL da solução 0,025 M de tetraborato de sódio decahidratado (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O) em ácido sulfúrico são colocados em tubos dispostos em uma grade e resfriados a 4 °C. Em seguida, 0,5 mL da amostra com concentração desconhecida é adicionado. A adição ocorre em banho gelado, por ser uma reação muito exotérmica. Os tubos são mantidos fechados com papel alumínio e colocados sob agitação constante, para ocorrer a completa mistura do sistema. Então, cada mistura é colocada em um banho a 100 °C por 10 minutos e, após isso, espera-se o resfriamento da mesma à temperatura ambiente. Então, adiciona-se 0,1 mL da solução de carbazol (0,125% em etanol) com subseqüente agitação. A solução é posteriormente colocada em um banho a 100 °C por 15 minutos e, novamente, espera-se a mesma resfriar a temperatura ambiente. Por fim, faz-se a leitura da amostra no espectrofotômetro à 530 nm. Com os valores obtidos no espectrofotômetro, para as amostras desconhecidas, e a curva de calibração do carbazol obtêm-se os valores das concentrações amostrais.

#### 3) Grau de reticulação

## • Método do TNBS

A análise do grau de reticualção das partículas foi feita baseada na quantidade de ADH que não reagiu durante o processo. Para isso, utilizou-se o método do TNBS, seguindo o protocolo proposto por Kirker e Prestwich, em 2004. Nesse método, foram adicionados 10 mL de uma solução de TNBS (0,01 M) à amostra previamente liofilizada. A solução foi mantida a 37 °C por 24 horas sob suave agitação. À 1 mL dessa solução foram adicionados 1 mL de glicina (0,03 M) e 5 mL de K<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> (0,1 M), e o sistema foi mantido sob suave agitação, a temperatura ambiente, por 25 minutos. Por fim, 0,1 mL dessa solução final foi adicionado à 0,9 mL de metanol frio, e a absorbância foi medida à 340 nm.

## **Resultados**

# 1) Morfologia

As imagens obtidas pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) indicam a formação de nanopartículas esféricas e com tendência à agregação, independente do solvente orgânico utilizado e do processo ter sido feito em modo contínuo ou descontínuo (Figuras A.2 à A.5):



Figura A.2 – Imagens, obtidas pela MEV, das partículas produzidas em modo descontínuo utilizando-se diferentes solventes orgânicos: etanol (A), IPA (B) e acetona (C)



Figura A.3 – Imagens, obtidas pela MET, das partículas produzidas em modo descontínuo utilizando-se os solventes acetona (A) e IPA (B)



Figura A.4 – Imagem, obtida pela MEV, das partículas produzidas em modo contínuo empregando-se o solvente orgânico IPA



Figura A.5 – Imagem, obtida pela MET, das partículas produzidas em modo contínuo empregando-se o solvente orgânico IPA

As microscopias de luz polarizada com melhor resolução foram as das partículas obtidas em acetona (Figura A.6). Observa-se que as partículas formadas nos microcanais (Figura A.6-B) são muito mais esféricas que as obtidas no modo descontínuo (Figura A.6-A). Além disso, nota-se que em ambos os casos existem dois diferentes domínios, mas não é possível distinguir se as partículas obtidas em um processo são mais cristalinas ou amorfas que as outras.



Figura A.6 – Imagens, obtidas pela microscopia de luz polarizada, das partículas produzidas empregando-se o solvente orgânico acetona, em modo descontínuo (A) e contínuo (B)

### 2) Rendimento

As análises de carbazol foram feitas nos filtrados obtidos após as ultrafiltrações, devido às quantidades significativas de AH que ficavam acumuladas nas membranas de ultrafiltração, mesmo após a sonicação, indicando que o processo de ultrafiltração não foi um bom método de separação das partículas. Dessa forma, o rendimento (Y) do processo de formação das nanopartículas foi calculado pela Equação A.1:

$$Y(\%) = \frac{m_a - m_F}{m_a} * 100$$
 (Equação A.1)

onde a massa total de AH que foi liofilizada (m<sub>a</sub>) foi calculada através do produto da concentração de AH experimental e o volume de amostra retirada para análise (Equação A.2):  $m_a = C_a V_a$  (Equação A.2) Exceto para experimentos com etanol, no modo descontínuo, e com acetona, no modo contínuo, os demais rendimentos foram altos, estando acima de 90% (Tabela A.1).

Processos	Solventes	Rendimento (%)
	Etanol	41,28 ± 3,37
Descontínuo	IPA	93,17 ± 0,73
	Acetona	90,42 ± 5,85
	Etanol	90,00 ± 1,32
Contínuo	IPA	98,99 ± 0,55
	Acetona	57,16 ± 5,36

Tabela A.1 – Rendimento dos processos de produção de nanopartículas de AH, nos modos descontínuo e contínuo, com diferentes solventes orgânicos

#### 3) Grau de reticulação

A maior quantidade de ADH remanescente ocorreu no processo descontínuo com acetona (Tabela A.2). Para o processo descontínuo com IPA ou etanol, e para o processo contínuo com acetona foram obtidas as mesmas absorbâncias e, consequentemente, as mesmas quantidades de ADH remanescente. As menores quantidades obtidas foram com IPA e etanol no processo contínuo. Todavia, como a análise por TNBS é um sistema pouco sensível, como mostrado pela curva padrão (Figura A.7), onde para uma grande variação de massa (de 0 a 8 mg) a absorbância variou apenas de 0,24 a 0,3, só obtivemos uma quantidade remanescente de ADH diferente de zero para o processo descontínuo com acetona.

Tabela A.2 – Grau de reticulação do AH nos processos de produção de nanopartículas de AH, nos modos descontínuo e contínuo, com diferentes solventes orgânicos

Amostra	Absorbância	Massa de ADH (mg)	ADH livre (%)
Acetona - Descontínuo	0,25	0,16	9,32
IPA - Descontínuo	0,24	0,00	0,00
Etanol - Descontínuo	0,24	0,00	0,00
Acetona - Contínuo	0,24	0,00	0,00
IPA - Contínuo	0,05	0,00	0,00
Etanol - Contínuo	0,12	0,00	0,00



Figura A.7 – Curva padrão para a análise de TNBS

De modo geral, observando os valores de absorbância, podemos dizer que no processo contínuo a reticulação é mais eficiente, pelo maior contato da ADH com o AH, já que a ADH já se encontra na corrente do AH, além da ausência de resistência à transferência de massa no processo contínuo. Já no processo descontínuo, a diferença entre as absorbâncias é pequena, variando entre 0,24 e 0,25. Como se coloca o agente reticulante no sistema após duas horas, quando os núcleos de precipitação já foram formados, independentemente do solvente orgânico utilizado, o grau de reticulação é o mesmo, e é maior que nos processos contínuos devido às limitações de transferência de massa existentes em processos descontínuos.