

Producción de nanopartículas de PLGA por el método de emulsión y evaporación para encapsular N-Acetilcisteína (NAC)

Ruth J. Lancheros¹✉, José Ángel Beleño¹, Carlos Arturo Guerrero², Rubén Darío Godoy-Silva¹

PLGA nanoparticles production by emulsion and evaporation to encapsulate N-acetylcysteine (NAC)

Abstract

Lactic and glycolic acid (PLGA) copolymer nanoparticles of less than 200 nm were produced to trap and transport N acetylcysteine (NAC) to be used in future applications, in the field of drug delivery systems. To do this, we selected the simple emulsion and evaporation method, using ethyl acetate as a solvent, Pluronic F127® as a surfactant, water and used ultrasound to generate the emulsion. The effect of the parameters during the organic to the aqueous phase was assessed as well as the amplitude and sonication. We found nanoparticles of 114 nm that trapped colloiddally stable 15% NAC; the ratio of organic to the aqueous phase was 1 to 5, the amplitude 60% and the ultrasound period was 60 s.

Keywords: Nanoparticles; PLGA emulsion; N-acetylcysteine; sonication.

Edited by Beynor Paez[✉] & Alberto Acosta

1 Grupo de Investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

2 Grupo de Investigación en Biología Molecular de Virus, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Received: 22-11-2013 Accepted: 15-04-2014

Published on line: 08-05-2014

Citation: Lancheros RJ, Beleño JA, Guerrero CA, Godoy-Silva RD (2014) Producción de nanopartículas de PLGA por el método de emulsión y evaporación para encapsular N-Acetilcisteína (NAC). *Universitas Scientiarum* 19(2): 161-168 doi: 10.11144/Javeriana.SC19-2.mpre

Funding: Dirección de Investigación de la sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia y COLCIENCIAS.

Electronic supplementary material: NA

Introducción

La N acetilcisteína (NAC), es un tiol reducido precursor de la L-cisteína, empleada como agente mucolítico y antioxidante que elimina radicales libres (Zafarullah et al. 2003, Suzuki 2009). Aunque es un compuesto activo con muchas aplicaciones terapéuticas, su biodisponibilidad por administración oral es baja (6 a 10%), una vez ingresa al torrente sanguíneo se une a las proteínas plasmáticas por medio de puentes disulfuro, lo que lo hace altamente inestable (Navath et al. 2008). Adicionalmente su carácter hidrófilo hace que se elimine fácilmente en la orina. Por otra parte, concentraciones altas en la sangre pueden incrementar la presión sanguínea (Navath et al. 2008, Wang et al.



2009). Es por ello que se ve la necesidad de explorar el desarrollo de vehículos que transporten el compuesto y lo estabilicen dentro del organismo.

Se han desarrollado varias estrategias para incrementar la biodisponibilidad de la NAC. Una de ellas fue adicionar una cadena de 6 a 8 unidades de polietilenglicol (PEG) que se unía a la NAC; obteniendo tamaños de partícula entre 21 y 43 nm. Este estudio buscó obtener conjugados para ser empleados en el tratamiento de neuroinflamaciones a nivel fetal (Navath et al. 2010). También se han desarrollado liposomas de 200 nm contra las lesiones pulmonares agudas (Mitsopoulos et al. 2008). Wang et al. (2009) desarrollaron dendrímeros conjugados con NAC para tratamiento en neuroinflamaciones (Navath et al. 2008, Wang et al. 2009). Desai et al. (2008), desarrollaron cilindros de PLGA para implante cuyo objetivo fue colocarlo de manera local sobre el cuello del paciente con el fin de liberarlo, ya que el efecto terapéutico buscado era ayudar a las personas que padecen cáncer en la cabeza o cuello (Desai et al. 2008). Ondricek (2010), fabricó nanopartículas de PLGA que encapsulaban NAC, para el tratamiento de glaucoma en los ojos. Emplearon el método de doble emulsión y reportan tamaños entre 192 y 217 nm (Ondricek 2010).

Las nanopartículas son vehículos que se han venido empleando para el transporte y liberación controlada de fármacos (Hans & Lowman 2002, Mundargi et al. 2008, Kumari et al. 2010). Entre los diferentes polímeros que se pueden emplear en su fabricación está el copolímero de los ácidos láctico y glicólico (PLGA). Este es un material biodegradable, que se puede sintetizar variando la relación entre sus monómeros y produciéndose con diferentes masas molares. Su biodegradación y carácter hidrófobo puede cambiar de acuerdo a la relación entre sus monómeros (Kim & Rhee 2010). Se encuentran comercialmente con diferentes pesos moleculares. Adicionalmente está aprobado por la FDA, para uso en la industria farmacéutica (Jain 2000, Ng et al. 2011, Danhier et al. 2012). Es por esto que se seleccionó como material para la fabricación de nanopartículas que puedan atrapar N acetilcisteína.

Existen varios métodos para la fabricación de nanopartículas de PLGA. Uno de estos es el método de emulsión y evaporación, donde se forma una solución

del polímero y del compuesto activo en un solvente orgánico volátil inmiscible o parcialmente miscible en agua, como el diclorometano o el acetato de etilo. Posteriormente, la fase orgánica es emulsificada en agua mediante una agitación intensa, que se puede realizar por medio de un homogeneizador, por microfluidización o por ultrasonido; en algunas ocasiones se emplea la presencia de un tensoactivo para estabilizar la emulsión. Finalmente, el solvente orgánico se evapora (algunas veces a presiones reducidas, de acuerdo a la estabilidad del principio activo que se esté atrapando), lo que causa que el polímero insoluble en agua, precipite, formando nanopartículas con el compuesto activo incluido. Estas se recuperan por centrifugación o filtración y se resuspenden en agua para una posterior liofilización con el objetivo de almacenarlas (Avgoustakis 2004, Ravi et al. 2004, Gomes et al. 2011). En esta metodología la cantidad de compuesto activo que se puede atrapar se ve limitada tanto por la cantidad que se puede solubilizar en el solvente a emplear, como por la afinidad del compuesto activo por el agua, ya que los compuestos que son altamente hidrófilos pueden migrar hacia el agua, disminuyendo la cantidad que se atrapa dentro de las nanopartículas (Astete & Sabliov 2006). Para el presente estudio se eligió este método con el fin de determinar las condiciones para obtener nanopartículas de PLGA de tamaños inferior a 250 nm, que pudieran atrapar NAC, teniendo en cuenta que ésta última es soluble en el acetato de etilo a concentraciones inferiores a 20 mg/mL.

Materiales y métodos

Se utilizó, PLGA 50/50 Resomer RG 502 (masa molar 7 – 17 kDa), N-acetilcisteína marca Sigma Aldrich, Pluronic F127 marca Bioreagent, agua destilada y desionizada, acetato de etilo grado analítico marca Panreac, acetato de metilo grado analítico marca Merck.

Producción de nanopartículas: La formación de nanopartículas se realizó empleando el método de emulsión y evaporación: la fase orgánica estaba compuesta por acetato de etilo como solvente, PLGA (10 mg/mL) y NAC (1mg/mL). Se dejó un tiempo de disolución de mínimo 2 horas a temperatura ambiente. La fase acuosa se formó con agua y Pluronic®

F127 1% p/v como tensoactivo. A continuación se formó la emulsión adicionando lentamente la fase orgánica a la acuosa mientras se realizaba ultrasonido (Branson digital sonifier 450). Finalizado el tiempo del ultrasonido, se evaporó el solvente a presión reducida (74,5 kPa) y se realizó la determinación del tamaño de partícula e índice de polidispersidad.

Se empleó un diseño experimental al azar univariante mutinivel, donde se establecieron como factores la relación entre las fases orgánica y acuosa (relación O/A), el tiempo de duración del ultrasonido y el porcentaje de amplitud del mismo. Los niveles que se emplearon tanto para la relación O/A (1 a 2, 1 a 5, 1 a 10 y 1 a 20) como para el tiempo de ultrasonido (15, 30, 60, 180 y 300 s) se escogieron con base a información de protocolos ya desarrollados (Mainardes & Evangelista 2005, Cheng et al. 2007, Gaumet et al. 2007, Ng et al. 2011). Los valores de los porcentajes de amplitud se establecieron de acuerdo a la disponibilidad que tenía el ultrasonido (permite trabajar porcentajes de amplitud hasta el 70%). Como variables respuesta se establecieron el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad.

Una vez se establecieron los niveles de las variables observadas que permitieron obtener nanopartículas de menor tamaño, se realizó un ensayo final al cual se le determinó: a) tamaño de partícula, b) índice de polidispersidad, c) eficiencia de encapsulación (%) de NAC, d) relación entre la cantidad de NAC atrapada con respecto a la cantidad de polímero adicionada (% NAC/PLGA p/p) y e) potencial zeta y estabilidad coloidal a pH ácido.

Estos ensayos se realizaron solo en la parte final, ya que el objetivo fue determinar un protocolo para obtener nanopartículas de PLGA de tamaños inferiores a 250 nm y que puedan atrapar NAC. En trabajos posteriores se espera comparar la cantidad de NAC atrapada por el método de emulsión y evaporación empleando acetato de etilo como solvente con otras metodologías como nanoprecipitación o emulsión doble. Las pruebas fueron realizadas por duplicado.

Determinación de NAC: Se realizó por espectrofotometría empleando el método de Raggi et al. (1982). Se tomó 1 mL de las nanopartículas y se centrifugaron a 20000 g durante 20 minutos y

se determinó la cantidad de NAC que quedó en el sobrenadante. La eficiencia de encapsulación de NAC se determinó dividiendo la cantidad atrapada (diferencia entre la cantidad adicionada y la encontrada en el sobrenadante) sobre la cantidad adicionada y se multiplicó por 100. La relación entre NAC atrapada y la cantidad de polímero empleado se determinó dividiendo la cantidad de NAC atrapada entre la cantidad de polímero adicionada y se multiplicó por 100. La concentración de NAC se determinó por espectrofotometría en la región del espectro visible. Para esto se tomaron 80 μ L de muestra y se le adicionaron 100 μ L de fenantrolina (0,25 % p/v), 240 μ L de Fe^{3+} (4 mM), 140 μ L de acetato de sodio (0,2 M), 180 μ L de buffer acetato pH 4,0 (0,1 M) y 260 μ L de agua. La mezcla se agitó y pasados 20 minutos se determinó el valor de la absorbancia a 515 nm. Las pruebas fueron realizadas por duplicado. La determinación se realiza a partir de una curva de calibración, cuyos límites de detección fueron entre 5 y 140 μ g/mL.

Determinación del tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta: La distribución del tamaño de partícula fue determinada por dispersión dinámica de luz empleando un equipo Malvern Zetasizer ZS a 25 °C y empleando una concentración de nanopartículas de aproximadamente 1 mg/mL. El índice de polidispersidad es un parámetro obtenido de manera simultánea con el tamaño de partícula. Este índice provee información sobre la muestra: valores cercanos a 0 indican que la muestra es monodispersa así como valores cercanos a la unidad indican que la muestra presenta gran variedad de tamaños. El potencial zeta se determinó con el mismo equipo usando electroforesis Doppler con láser.

Estabilidad coloidal: Se determinó de acuerdo con la metodología sugerida por Mora et al. (2012) que consistió en adicionar 0,05 mL de una suspensión de las nanopartículas a 2,5 mL de una solución 10 mM de NaCl y pH 3 (se ajustó el pH por medio de la adición de HCl). Se determinó el tamaño de partícula tan pronto se realizó la suspensión y se dejó a temperatura ambiente durante 24 h; pasado este tiempo se volvió a determinar el tamaño de partícula. Las partículas que sean inestables coloidalmente, sufrirán agregación, por lo tanto el tamaño de partícula después de las 24 h del ensayo, debería aumentar.

Análisis estadístico: Se verificó que los datos tuvieran distribución normal, empleando la prueba de Kolmogorov Smirnov ($\alpha = 0,05$) y homogeneidad de varianzas empleando la prueba de Levene ($\alpha = 0,05$). Los datos fueron analizados empleando análisis de varianza en una vía y la comparación entre medias fue evaluada por medio de la prueba de diferencia media significativa (DLS) con un nivel de significancia de 0.05.

Resultados

Efecto de la amplitud de onda del ultrasonido: Se buscó observar si existía alguna influencia sobre el tamaño de partícula e índice de polidispersidad al cambiar el porcentaje de la amplitud entregada por el ultrasonido a la emulsión. El análisis estadístico (ANOVA $p < 0.05$) mostró que ambos factores cambiaron con el porcentaje de amplitud. Los resultados encontrados para tamaño de partícula al realizar la comparación de medias (comparación de medias usando LSD $p < 0.05$) reportaron que no existía diferencia significativa entre las amplitudes de 20 y 60 y entre 40 y 60% (**Figura 1**). En cuanto al índice de polidispersidad existe diferencia entre la amplitud del 10 y 20% y entre los valores de 10 y 60%.

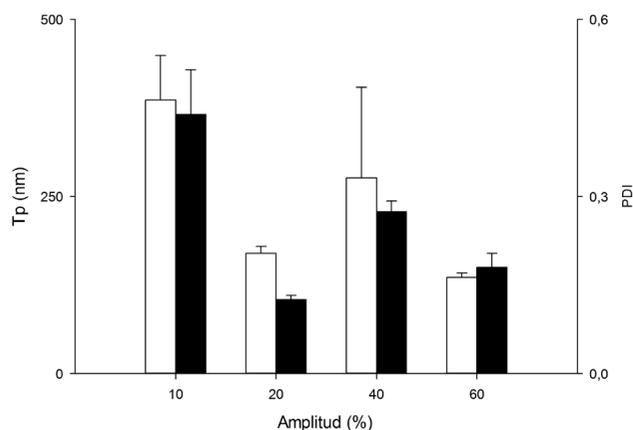


Fig. 1. Efecto de la variación del porcentaje de amplitud del ultrasonido sobre el tamaño de partícula (Tp) ■ y el índice de polidispersidad (PDI) □ manteniendo constante una relación O/A de 1 a 10 y tiempo de ultrasonido de 30 s. Las barras indican la desviación estándar.

Tiempo de ultrasonido: Se realizaron ensayos variando el tiempo de ultrasonido, y se emplearon valores entre

15 y 300 s. De acuerdo al análisis estadístico (ANOVA $p < 0.05$), se encontró que este factor solo tenía efecto sobre el tamaño de partícula pero no sobre el índice de polidispersidad, aunque los valores más bajos se obtuvieron para 60 y 180 s. En cuanto al tamaño de partícula, se encontraron tamaños inferiores a partir de los 60 s (105,16 nm) y no se encontró diferencia (comparación de medias usando LSD $p < 0.05$) para el tamaño de partícula para tiempos superiores a los 60 s. Al tiempo de 300 s aunque el tamaño de partícula sigue siendo bajo (104,7 nm) el índice de polidispersidad se incrementó con respecto a los valores obtenidos a 60 y 180 s (**Figura 2**).

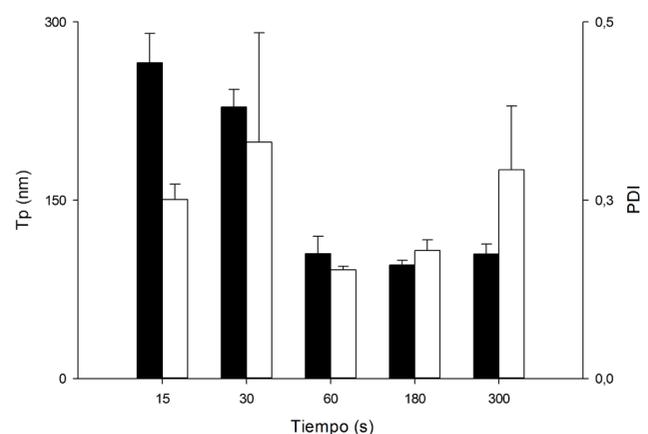


Fig. 2. Efecto de la variación del tiempo de ultrasonido sobre el tamaño de partícula (Tp) ■ y el índice de polidispersidad (PDI) □ manteniendo constante una relación O/A de 1 a 10 y un porcentaje de amplitud de 40%. Las barras indican la desviación estándar.

Relación entre la fase orgánica y la acuosa (O/A):

El análisis estadístico (ANOVA $p < 0.05$) mostró que el tamaño de partícula cambia con la relación O/A, pero el índice de polidispersidad no (**Figura 3**). El menor tamaño de partícula e índice de polidispersidad se encuentra con la relación 1 a 5. Esto se corrobora con la comparación de medias realizada para el tamaño de partícula (comparación de medias usando LSD $p < 0.05$), donde se encontró diferencia entre los valores para una relación O/A de 1 a 5 con los niveles de 1 a 10 y de 1 a 20. Cuando se incrementó la fase acuosa (valores O/A superiores a 1/10) también lo hace el tamaño de partícula, obteniéndose el máximo valor (337 nm) con una relación de 1/20.

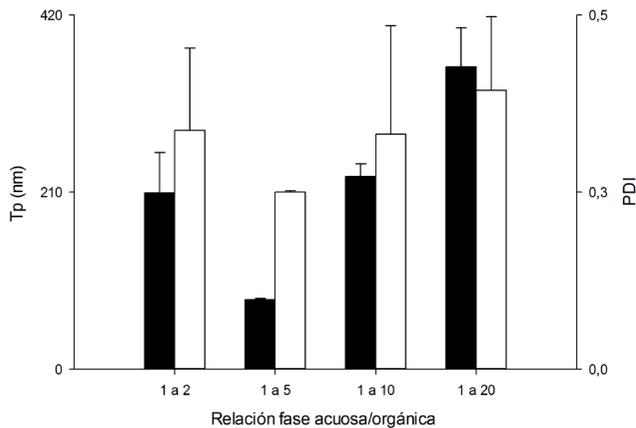


Fig. 3. Efecto de la variación de la relación entre la fase orgánica y acuosa (O/A) sobre el tamaño de partícula (T_p) ■ y el índice de polidispersidad (PDI) □ manteniendo constante un tiempo de ultrasonido de 30 s y un porcentaje de amplitud de 40%. Las barras indican la desviación estándar.

Resultados de ensayos empleando valores óptimos de las variables analizadas:

Con el fin de corroborar los resultados encontrados se realizó un ensayo final con los mejores valores de cada una de las variables observadas. Para esto, se realizó un ensayo con un tiempo de sonicación de 60 segundos, ya que como estableció el análisis estadístico, tiempos superiores no disminuían considerablemente el tamaño de partícula y si representaban mayores tiempos de agitación, lo que incrementaría los costos energéticos asociados a este proceso. Se eligió una relación entre la fase orgánica y acuosa (O/A) de 1 a 5 y se realizaron pruebas con porcentajes de amplitud de 20 y 60% ya que habían reportado menores tamaños de partículas y de acuerdo con el análisis estadístico no existía diferencia significativa entre las dos amplitudes. Para una amplitud del 20% se obtuvieron partículas de tamaños de $99,27 \pm 5,12$ con un índice de polidispersidad de $0,28 \pm 0,041$; y para un porcentaje de amplitud del 60% se hallaron partículas de $114,8 \pm 20,5$ con un índice de polidispersidad de $0,2 \pm 0,004$. Ya que el índice de polidispersidad fue menor para una amplitud del 60% y los tamaños de partícula siguen siendo bajos (por debajo de 150 nm) y si se tiene en cuenta la desviación estándar son similares, se elige la amplitud del 60% como el valor que representa la mejor condición para la amplitud entregada por el ultrasonido.

Finalmente se determinó la eficiencia de encapsulado, el potencial zeta, la relación entre la cantidad de NAC encapsulada con respecto a la cantidad de polímero adicionado y se realizó una prueba de estabilidad coloidal a pH ácido a las nanopartículas obtenidas con una relación O/A de 1 a 5, 60 s como tiempo de ultrasonido y un porcentaje de amplitud del 60%. Como resultados se obtuvieron nanopartículas de 82,25 nm con un índice de polidispersidad de 0,2 que encapsularon NAC en un porcentaje de 15,7%, con una relación de NAC atrapada sobre polímero adicionado (%NAC/PLGA) de 1,97% y un potencial zeta de -6,07 mV. Los resultados de estabilidad coloidal a pH ácido en presencia de NaCl, muestran nanopartículas de 82,24 nm a tiempo cero y 85,4 pasadas 24h.

Discusión

Las tres variables observadas afectan el tamaño de partícula; estadísticamente, el índice de polidispersidad solo se ve afectado por el porcentaje de amplitud del ultrasonido.

Los resultados para el porcentaje de amplitud (Figura 1), muestran que al comparar los resultados para una amplitud del 10% con los restantes se observa un incremento en el tamaño de partícula e índice de polidispersidad que se corrobora con el análisis estadístico. Aunque el tamaño de partícula e índice de polidispersidad para una amplitud de 40% se incrementó un poco comparados con los valores encontrados para porcentajes del 20 y 60%, este incremento se puede explicar si se tiene en cuenta que el valor del índice de polidispersidad es alto, lo que indica que existen partículas de tamaños diversos y por esto, el equipo muestra los picos en los valores donde se encuentra la mayor cantidad. Esto incrementa el error que pueda tener el equipo al entregar la medida. Vale la pena aclarar que el valor que se tuvo en cuenta para realizar el análisis fue el que reportó mayor porcentaje, ya que para los ensayos con porcentajes de 10 y 40% se encontraron presencia de micropartículas en porcentajes inferiores al 7%. Teniendo en cuenta que el punto obtenido para una amplitud del 40% puede tener implícito algún error, y al observar los restantes se puede afirmar que a medida que se incrementa el porcentaje de amplitud se obtienen tamaños de partícula e índices de polidispersidad

bajos. Una posible explicación surge al analizar la manera como el ultrasonido forma la emulsión, ya que, al ser sumergido la punta del sonicador dentro del líquido éste empieza a vibrar y esto genera cavitación, provocando burbujas que colapsan de manera violenta y liberan gran cantidad de energía que hace que la fase orgánica se disgregue en gotas microscópicas que al hacer contacto con el líquido permiten que parte del solvente migre al agua y genere la formación del coloide que posteriormente al ser evaporado al resto del solvente da lugar a las nanopartículas. Si la amplitud se incrementa, también lo hace la energía que se libera al líquido, de tal manera que se generan microgotas de tamaños menores.

El tiempo de ultrasonido afecta al tamaño de partícula (Figura 2), ya que al incrementarse el tiempo de sonicación, el tamaño de partícula disminuye, aunque a partir de los 60 s, la variación es mucho menor. Es probable que cuando el tiempo de sonicación es superior a un minuto la cantidad de energía que se libera al sistema, no puede disgregar de la misma forma en la fase orgánica, generando que no exista una diferencia apreciable en los tamaños de partícula e índice de polidispersidad. Estos resultados contrastan con los de Song et al. (2008 a,b) quienes realizaron ensayos con tiempos más cortos, y encuentran que a partir de 30 s no hay disminución en el tamaño de partícula, aunque ellos emplean como solvente una mezcla de acetona - diclorometano y esto podría explicar que el tiempo puede variar con el tipo de solvente empleado (Mainardes & Evangelista 2005, Song et al. 2008 a,b).

En cuanto a la relación entre las fases orgánica y acuosa (Figura 3), el valor que más favorece un tamaño de partícula bajo es la relación O/A de 1 a 5, ya que aunque la polidispersidad es de 0,25 es importante anotar que el tiempo de ultrasonido que se empleó para realizar estos experimentos fue de 30 s de acuerdo a los resultados obtenidos, este tiempo es insuficiente para obtener nanopartículas monodispersas y de tamaños pequeños. Song et al. (2008) encontraron que también en esta relación O/A de 1 a 5, correspondía al menor tamaño de partícula en sus ensayos (Song et al. 2008a,b). Relaciones mayores (1 a 10) muestran tamaños de partículas superiores con una polidispersidad alta, resultados similares fueron reportados (Budhian et al. 2007). Esto se podría explicar si se tiene en cuenta que la viscosidad del sistema cambia de acuerdo a la

relación entre la fase orgánica y acuosa. La viscosidad del acetato de etilo es de 0,41 cp y la del agua es de 1 cp. Al encontrarse en mayor proporción el agua, la viscosidad sube y como la energía entregada por parte del ultrasonido es la misma, da como resultado que exista una disgregación de manera no uniforme, que se ve reflejada en partículas de diversidad de tamaños, incrementando el valor del índice de polidispersidad y obteniéndose partículas de tamaños superiores.

Adicionalmente, los resultados de las pruebas empleando los mejores valores de las variables estudiadas (amplitud del 60%, relación O/A de 1 a 5 y tiempo de ultrasonido de 60 s), mostraron que las partículas podían atrapar NAC. Aunque la eficiencia de encapsulado y cantidad atrapada con respecto al polímero adicionada son bajas (15,7% y 1,97% respectivamente) valores similares han sido reportados para el atrapamiento de compuestos activos de carácter hidrófilo (Govender et al. 1999, Peltonen et al. 2004, Dalwadi & Sunderland 2009); principalmente debido a que la NAC tiende a migrar hacia el agua, lo que hace que la eficiencia sea baja. En estudios posteriores se podrían examinar estrategias como cambiar el pH o saturar la fase acuosa con el fin de incrementar dicha eficiencia. Los resultados que tienen que ver con la estabilidad coloidal a pH ácido, fueron positivos ya que el tamaño de partícula permaneció casi constante. Finalmente, el valor del potencial zeta mostró que las partículas poseen carga negativa, aunque su valor es bajo no se presentó agregación.

Conclusión

La relación entre la fase orgánica y acuosa (relación O/A) de 1 a 5 fue la que generó partículas de menor tamaño y polidispersidad. En cuanto al porcentaje de amplitud empleado, se encontró que a mayor valor menor tamaño de partícula y polidispersidad. El tiempo mínimo para obtener nanopartículas de tamaños pequeño fue de 1 minuto. En la mayoría de las condiciones evaluadas se obtuvieron partículas de PLGA de tamaños menores a 300 nm lo que valida el método de emulsión y evaporación para la obtención de nanopartículas de PLGA. En cuanto a las características de las nanopartículas obtenidas, se encontró que pueden atrapar NAC con una eficiencia de 15,7%, son estables coloidalmente a pH ácido y tienen un potencial zeta de -6,07 mV.

Agradecimientos:

Esta investigación fue financiada gracias al apoyo de la Dirección de Investigación de la sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia proyecto 202010018338 del 2012 y del Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – COLCIENCIAS proyecto número 110156935147.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses con relación a los resultados de esta investigación.

Referencias

- Astete CE, Sabliov CM (2006) Synthesis of Poly(DL-Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles with Entrapped Magnetite by Emulsion Evaporation Method. *Particulate Science and Technology* 24(3):321-328 doi:10.1080/02726350600840696
- Avgoustakis K (2004) Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. *Current Drug Delivery* 1(4):321-33 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16305394>
- Budhian A, Siegel SJ, Winey KI (2007) Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug content. *International Journal of Pharmaceutics* 336(2):367-75 doi:10.1016/j.ijpharm.2006.11.061
- Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Sung J, Luther G, Gu FX, Farokhzad OC (2007) Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials* 28(5):869-76 doi:10.1016/j.biomaterials.2006.09.047
- Dalwadi G, Sunderland B (2009) An ion pairing approach to increase the loading of hydrophilic and lipophilic drugs into PEGylated PLGA nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics:official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.* 71(2):231-42 doi:10.1016/j.ejpb.2008.08.004
- Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Pr at V (2012) PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release:Official Journal of the Controlled Release Society* 161(2):505-22 doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.043
- Desai K, Mallery S, Schwendeman S (2008) Formulation and Characterization of Injectable Poly(-lactide-co-glycolide) Implants Loaded with N-Acetylcysteine, a MMP Inhibitor. *Pharmaceutical Research* 25(3):586-597
- Gaumet M, Gurny R, Delie F (2007) Fluorescent biodegradable PLGA particles with narrow size distributions: preparation by means of selective centrifugation. *International Journal of Pharmaceutics* 342(1-2):222-30 doi:10.1016/j.ijpharm.2007.05.001
- Gomes C, Moreira RG, Castell-Perez E (2011) Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles with entrapped trans-cinnamaldehyde and eugenol for antimicrobial delivery applications. *Journal of Food Science* 76(2):16-24 doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01985.x
- Govender T, Stolnik S, Garnett MC, Illum L, Davis SS (1999) PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 57(2):171-85 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9971898>
- Hans ML, Lowman AM (2002) Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 6:319-327
- Jain R (2000) The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 21(23):2475-90 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11055295>
- Kim IA, Rhee SH (2010) Effects of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) degradability on the apatite-forming capacity of electrospun PLGA/SiO(2)-CaO nonwoven composite fabrics. *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials* 93(1):218-26 doi:10.1002/jbm.b.31578
- Kumari A, Yadav SK, Yadav SC (2010) Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces* 75(1):1-18 doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.001
- Mainardes RM, Evangelista RC (2005) PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. *International Journal of Pharmaceutics* 290(1-2):137-44 doi:10.1016/j.ijpharm.2004.11.027
- Mitsopoulos P, Omri A, Alipour M, Vermeulen N, Smith MG, Suntries ZE (2008) Effectiveness of liposomal-N-acetylcysteine against LPS-induced lung injuries in rodents. *International Journal of Pharmaceutics* 363(1-2):106-11 doi:10.1016/j.ijpharm.2008.07.015
- Mora-Huertas CE, Garrigues O, Fessi H, Elaissari A (2012) Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification-diffusion methods: comparative study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.* 80(1):235-9 doi:10.1016/j.ejpb.2011.09.013
- Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM (2008) Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 125(3):193-209 doi:10.1016/j.jconrel.2007.09.013

- Navath RS, Kurtoglu YE, Wang B, Kannan S, Romero R, Kannan RM (2008) Dendrimer-Drug Conjugates for Tailored Intracellular Drug Release Based on Glutathione Levels. *Bioconjugate Chemistry* 19(12):2446-2455 doi:10.1021/bc800342d
- Navath RS, Wang B, Kannan S, Romero R, Kannan RM (2010) Stimuli-responsive star poly(ethylene glycol) drug conjugates for improved intracellular delivery of the drug in neuroinflammation. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 142(3):447-56 doi:10.1016/j.jconrel.2009.10.035
- Ng SH, Ooi IH, Iskandar F, Abdullah M (2011) Effects of Microemulsion Preparation Conditions on Drug Encapsulation Efficiency of PLGA Nanoparticles. In: AIP Conference proceedings Nanoscience and nanotechnology, Symposium;4th, Nanoscience and nanotechnology, pp 47-50 doi:10.1063/1.3667217
- Ondricek AJ (2010) The Neuroprotective Efficacy of Antioxidants Against In Vitro Models of Oxidative Stress and Their Theoretical Application Via Intravitreal Injection Encapsulated in Nanoparticles. University of North Texas Health Science Center at Fort Worth. Retrieved from <http://gradworks.umi.com/34/02/3402967.html>
- Peltonen L, Aitta J, Hyvönen S, Karjalainen M, Hirvonen J (2004). Improved entrapment efficiency of hydrophilic drug substance during nanoprecipitation of poly(l) lactide nanoparticles. *AAPS PharmSciTech* 5(1):16 doi:10.1208/pt050116
- Raggi M, Cavrini V, Di Pietra M (1982). Colorimetric determination of acetylcysteine, penicillamine, and mercaptopropionylglycine in pharmaceutical dosage forms. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 71(12): 1384-6 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7153888>
- Ravi Kumar MNV, Bakowsky U, Lehr CM (2004) Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials* 25(10):1771-1777 doi:10.1016/j.biomaterials.2003.08.069
- Song X, Zhao Y, Hou S, Xu F, Zhao R et al. (2008a) Dual agents loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.* 69(2):445-53 doi:10.1016/j.ejpb.2008.01.013
- Song X, Zhao Y, Wu W, Bi Y, Cai Z, Chen Q, Hou S (2008b) PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate and verapamil hydrochloride: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *International Journal of Pharmaceutics* 350(1-2):320-9 doi:10.1016/j.ijpharm.2007.08.034
- Suzuki K (2009) Anti-oxidants for therapeutic use: why are only a few drugs in clinical use? *Advanced Drug Delivery Reviews* 61(4):28-79 doi:10.1016/j.addr.2009.03.002
- Wang B, Navath RS, Romero R, Kannan S, Kannan R (2009) Anti-inflammatory and anti-oxidant activity of anionic dendrimer-N-acetyl cysteine conjugates in activated microglial cells. *International Journal of Pharmaceutics* 377(1-2):159-68 doi:10.1016/j.ijpharm.2009.04.050
- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M (2003) Cellular and Molecular Life Sciences Molecular mechanisms of N -acetylcysteine actions. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60:6-20

Producción de nanopartículas de PLGA por el método de emulsión y evaporación para encapsular N-Acetilcisteína (NAC)

Resumen. Se fabricaron nanopartículas de copolímero de ácido láctico y glicólico (PLGA) de tamaños inferiores a 200 nm que atraparán y transportarán N acetilcisteína (NAC) en futuras aplicaciones como sistema de liberación de fármacos. Para esto se eligió el método de emulsión sencilla con evaporación, empleándose acetato de etilo como solvente, Pluronic F127® como tensioactivo, ultrasonido como medio para generar la emulsión y agua. Se estudió el efecto de parámetros entre la fase orgánica y acuosa, amplitud y tiempo de sonicación. Se encontraron nanopartículas de 114 nm, estables coloidalmente y que atraparán un 15% de NAC. Las condiciones encontradas fueron: relación de fase orgánica a acuosa de 1 a 5, amplitud del 60% y 60 s como tiempo de ultrasonido.

Palabras clave: Nanopartículas; PLGA, emulsión; N-acetilcisteína; sonicación.

Produção de nanopartículas de PLGA pelo método de emulsão e evaporação para encapsular N-Acetilcisteína (NAC)

Resumo. Fabricaram-se nanopartículas e copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA) de tamanhos inferiores a 200 nm que capturaram e transportaram N acetilcisteína (NAC) em futuras aplicações como sistema de liberação de fármacos. Para isto se selecionou o método de emulsão simples com evaporação, empregando-se acetato de etilo como solvente, Pluronic F127® como tensoativos, ultrasons como meio para produzir a emulsão de água. Estudou-se o efeito de parâmetros entre a fase orgânica e aquosa, amplitude e tempo de sonicção. Encontraram-se nanopartículas de 114nm, estáveis coloidamente e que capturaram cerca de 15% de NAC. As condições encontradas foram: relação da fase orgânica a aquosa de 1 a 5, amplitude de 60% e 60s como tempo de ultrasons.

Palavras-chave: Nanopartículas; PLGA, emulsão; N-acetilcisteína; sonicção.