



Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Instituto de Química

Laboratório de Química Biológica

Zaine Teixeira Camargo

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOCÁPSULAS DE POLY(D,L-LACTÍDEO)
NO ENCAPSULAMENTO DE PALMITATO
DE RETINILA**

**Tese apresentada no Instituto de Química da
Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do
título de Doutor em Ciências**

**Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero
Co-Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres**

**Campinas, SP
setembro/2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

C14p Camargo, Zaine Teixeira.
Preparação e caracterização de nanocápsulas de poly(D,L-lactídeo) no encapsulamento de palmitato de retinila / Zaine Teixeira Camargo. -- Campinas, SP: [s.n], 2009.

Orientador: Nelson Eduardo Durán Caballero.
Co-orientadora: Sílvia Stanisçuaski Guterres.

Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Nanopartículas poliméricas. 2. Liberação sustentada. 3. Encapsulamento. 4. Nanocápsulas. I. Duran Caballero, Nelson Eduardo. II. Guterres, Sílvia Stanisçuaski. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Título em inglês: Preparation and characterization of poly(D,L-lactide) nanocapsules encapsulating retinyl palmitate

Palavras-chaves em inglês: Polymeric nanoparticles, Sustained release, Encapsulation, Nanocapsules

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Nelson Eduardo Durán Caballero (orientador), Bartira Rossi Bergmann (IBCCF-UFRJ), Antonio Claudio Tedesco (DQ-USP-RP), Edvaldo Sabadini (IQ-UNICAMP), Renato Atílio Jorge (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 29/09/2009

Eu dedico esta Tese...

... A Deus pela vida, saúde e força;

*Aos meus pais, Etelvina e João, que me doaram
os melhores ensinamentos baseados no amor e trabalho;*

*Ao meu esposo, Enilton, que está ao meu lado em
todos os momentos da minha vida;*

*A toda família “Teixeira” e família “Camargo”
que sempre me deram muito carinho e incentivo;*

A vocês meu eterno amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao *Professor Nelson Durán*, pela oportunidade e orientação.

À Professora Sílvia Guterres pela co-orientação, ensinamentos e oportunidade.

Aos amigos dos laboratórios de Química Biológica e Bioquímica: Ana Paula, Ana Maria, Alessandra, Adriana, Profa. Buba, Bruna, Carla, Chico, Daniela, Fábio, Isabela, Juliana, Jeanifer, Lilica, Márcia, Marcela, Nati, Patrícia, Priscyla, Roseli, Sandra, Stephani e Thiago, pelas discussões tanto científicas quanto de descontração.

Aos amigos 'novos' e 'velhos' do LQES pelo grande encorajamento e amizade: Larissa, Natália, Carolina, Carla, Diego, Prof. Italo, Ricardo, Célia, Iara, Luciana, Odair e Prof. Oswaldo.

Aos amigos: Giselle, Edgar, Daisy e Rodrigo que muito colaboraram na parte biológica.

À profa. Maria Helena, Beatriz e Luciana no auxílio dos experimentos de extrusão.

Ao *Molecular Biophysics Group*, King's College London, pelo auxílio no trabalho com SANS e FFEM, além do grande companheirismo e amizade: Profa. Cécile Dreiss, Profa. Jayne Lawrence, Aleksandra, Fabiana, Fabrizia, Franziska, Gianluca, Hala, Hisham, Jamie, Jenny, Laila, Lucy, Barbara, Marco, Nesrine, Renata e Sadaf.

A todos os funcionários do IQ que com muita dedicação me ajudaram durante este trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida e a Rede de Nanocosméticos (CNPq/MCT) pelo apoio financeiro.

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais:

Nome: Zaine Teixeira Camargo

Nome em publicações: Z. Teixeira

Nascimento: 24/06/1979

Naturalidade: Campinas – SP

Nacionalidade: Brasileira

Estado Civil: Casada

e-mail: zaine@iqm.unicamp.br ou zanteira@yahoo.com

Formação acadêmica:

- **Doutorado em Química com período de estágio no exterior**

Período: março/2005-setembro/2009

Local: Laboratório de Química Biológica, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – Campinas – SP. Estágio: King's College London (Profa. Cécile A. Dreiss)

Título: "Preparação e Caracterização de Nanocápsulas de Poly(D,L-Lactídeo) no Encapsulamento de Palmitato de Retinila"

Área: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Nelson Durán

Co-Orientadora: Profa. Sílvia S. Guterres

Apoio: CAPES

- **Mestrado em Química**

Período: março/2003-fevereiro/2005

Local: Laboratório de Química do Estado Sólido, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – Campinas – SP

Título: "Preparação e Caracterização de pós e filmes finos de óxidos mistos $\text{Bi}_2\text{MnNbO}_7$ ($\text{M} = \text{In}, \text{Al}, \text{Mn}$ e $\text{Mn}_{0,5}\text{Fe}_{0,5}$) pela técnica de decomposição de precursores metalorgânicos (MOD)"

Área: Química Inorgânica

Orientador: Prof. Oswaldo Luiz Alves

Apoio: FAPESP

- **Bacharelado em Química Tecnológica**

Período: março/1998-dezembro/2002

Local: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – Campinas – SP

Publicações:

- Curr. Nanosci. 5 (2009) *in press*. State of the Art of Nanobiotechnology Applications in Neglected Diseases. Durán, N; Marcato, P.D.; Teixeira, Z.; Durán, M.; Costa, F.T.M.; Brocchi, M.

- J. Chem. Edu., 85 (2008), 946-947. Annatto Polymeric Microparticles: Natural Product Encapsulation by Emulsion-Solvent Evaporation Method. Teixeira, Z.; Guterres, S.S.; Durán, N.
- J. Am. Cer. Soc., 90 (2007), 256-263. Structural, thermal behavior, chemical durability and optical properties of the Na₂O-Al₂O₃-TiO₂-Nb₂O₅-P₂O₅ glass system. Teixeira, Z.; Mazali, I. O.; Alves, O. L.
- Quím. Nova. 30 (2007), 494-496. Practical in Organometallic Chemistry: Preparation of Dicarboxylcyclopentadienyliron (II) chloride. Teixeira, Z.; Vasconcelos, S. P.; Koike, L.; Dias, G. H. M.

Apresentação de Trabalhos em Congressos (2006-2009):

- Melo, B. A. G.; Teixeira, Z.; Durán, N. Polymeric Nanocapsules of Retinyl Palmitate Containing Benzophenone-3 Prepared by Emulsion Method: Skin Permeation Studies, Ribeirão Preto; 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), 2009.
- Araujo, T. M. F.; Falco, L. F. G.; Teixeira, Z.; Barbosa, H. C.; Boschero, A. C.; Durán, N.; Höehr, N. F. Insulin-loaded polymeric nanoparticles: Cell viability and cytotoxicity studies, Rio de Janeiro; 11th International Conference on Advanced Materials (ICAM), 2009.
- Durán, N.; Justo, G. Z.; Ferreira, C. V.; Silva, R. A.; Machado, D.; Shishido, S. M.; Teixeira, Z.; Hertog, J. D.; Denhertog, J. Cellular and Molecular Approaches to in vitro and in vivo Assessment of Preliminary Toxicological and Biological Activities of Nanomaterials, Lucknow (Índia); International Conference on Nanomaterial Toxicology (ICONTOX), 2008.
- Teixeira, Z.; Paredes-Gamero, E. J.; Justo, G. Z.; Nader, H. B.; Guterres, S. S.; Durán, N. Skin Permeation Profile of Nile Blue-Labeled Poly(D,L-lactide) Nanocapsules Encapsulating Retinyl Palmitate, Barcelona; 3rd International Conference on Surfaces, Coatings and Nanostructured Materials (NanoSMat), 2008. **Apresentação Oral.**
- Teixeira, Z.; Durán, N. Obtenção de Micropartículas de PHBV no Encapsulamento de Urucum: Uma Abordagem Atual em Laboratório de Química Aplicada, Águas de Lindóia; 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (RASBQ), 2007.
- Marques M. C.; Teixeira, Z.; Durán, N. Polymeric Nanoparticles in the Encapsulation of (+)-Catechin: Preparation, Characterization and Permeation Studies, Ribeirão Preto; 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), 2007.

Prêmio de Melhor Pôster

- Marques M. C.; Teixeira, Z.; Durán, N. Preparação e Caracterização de Nanopartículas Poliméricas no Encapsulamento de Catequina com Aplicações Cosmecêuticas, Águas de Lindóia; 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (RASBQ), 2007. **Apresentação Oral.**
- Madalossi N. V.; Teixeira, Z.; Durán, N. Preparation and Characterization of PHBV Microparticles in the Encapsulation of Urucum: Natural Products for Cosmeceutic Purposes, Ribeirão Preto; 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), 2007.
- Teixeira, Z.; Melo B. A. G.; Durán, N.; Guterres S. S. Preparation and Characterization of Poly(D,L-lactide) Nanocapsules Containing Benzophenone-3, Ribeirão Preto; 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), 2007.
- Teixeira, Z.; Guterres, S. S.; Durán, N. Polymeric Nanocapsules Containing Retinyl Palmitate for Topical Application, Florianópolis; V Encontro da SBPMat (5th Brazilian MRS Meeting), 2006.

RESUMO

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE POLI(D,L-LACTÍDEO) NO ENCAPSULAMENTO DE PALMITATO DE RETINILA

Nesse trabalho, foram preparadas nanocápsulas (NC) que consistem em um núcleo oleoso (sistema reservatório) e uma parede polimérica, nas quais se empregou o óleo palmitato de retinila (PR) e o polímero biodegradável poli(D,L-lactídeo) (PLA). Além desse sistema, nanoemulsões (NE, sem a parede polimérica) e nanoesferas (NS, matriz polimérica) foram preparadas para efeito de comparação. Utilizou-se ainda, moléculas modelos solubilizadas no núcleo oleoso do PR, a benzofenona-3 (BZ3) e a baicaleína (BAI). As NC foram caracterizadas quanto à eficiência de encapsulamento, estabilidade física e química, distribuição de tamanhos e potencial zeta. As NC e NE apresentaram tamanhos médios de 200 nm (P.D.I=0,1), potencial zeta de aproximadamente -10 mV (emprego de surfactante não-iônico), sendo estáveis físico-quimicamente por 4 meses a aproximadamente 4 °C e 28 °C. Realizou-se ensaios de citotoxicidade e fototoxicidade das nanoestruturas em queratinócitos (HaCat) e fibroblastos (BALB/c 3T3), observando-se que as NC apresentam citotoxicidade apenas a elevadas concentrações, sendo assim, apresentam-se viáveis para aplicação dérmica. Medidas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) evidenciaram que as nanoestruturas apresentam abaixamento de picos de fusão em comparação às misturas físicas e que devido à baixa proporção, a BZ3 não influencia os eventos térmicos das nanoestruturas, enquanto que o surfactante Span 60 aumenta a largura do pico de fusão do PR, o que sugere sua solubilização no núcleo das NC. A análise morfológica das partículas pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) mostrou que as NC apresentam capacidade de deformação. Para melhor investigação desta propriedade, utilizou-se experimento de extrusão em membranas de poros de menores tamanhos. No ensaio, observou-se que as NC permeiam as membranas de policarbonato quando adicionado PEG-8L, um surfactante empregado para aumentar a permeação de

lipossomas elásticos devido ao aumento da molhabilidade dos poros da membrana. Preparou-se o derivativo polimérico com o cromóforo azul do Nilo (AN) através da formação de ligação covalente dos ácidos carboxílicos terminais e amina do AN. Tal polímero foi empregado em ensaio de permeação cutânea por célula de difusão vertical de Franz e sua avaliação por microscopia de varredura a laser confocal (CLSM). Os ensaios revelaram que a fluorescência da parede polimérica e a do PR apresentam-se em mesma profundidade na pele, o que evidencia a permeação do carreador ao invés de uma liberação do ativo. Em quantificação das NC na pele, observou-se que, o PR atinge a célula receptora e é encontrado em camadas da epiderme/derme e camada córnea. Desta forma, esse trabalho contribuiu através da obtenção de um sistema de NC bastante promissor para o armazenamento da vitamina A, bem como no carregamento de bioativos a camadas mais profundas da pele.

ABSTRACT

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF POLY(D,L-LACTIDE) NANOCAPSULES ENCAPSULATING RETINYL PALMITATE

In this work, we have prepared nanocapsules (NC) that are drug-reservoir vesicular systems, in which the shell is polymeric. Retinyl palmitate (RP) was encapsulated for the first time as an oil core with poly(D,L-lactide) (PLA) shell. Nanospheres (NS, without oil core), nanoemulsions (NE, without polymer shell) and niosomes (NI, without oil and polymer) were prepared for comparison. Further, NC were used to encapsulate two model molecules, benzophenone-3 (BZ3) and baicalein (BAI). These systems were characterized and tested by a range of techniques, including encapsulation efficiency and stability by HPLC dosage, pH, size distribution and zeta potential measurements. Dynamic Light Scattering (DLS) measurements on the nanocapsules showed a monomodal peak at 200 nm (polydispersity = 0.10). The zeta potential was -10 mV (by using non-ionic surfactant). The NC system was stable for at least 4 months around 4 °C and 28 °C. Cytotoxicity and phototoxicity assays were performed in keratinocytes (HaCat) and fibroblasts (BALB/c 3T3), showing that the NC are cytotoxic only at high concentrations. Differential scanning calorimetry (DSC) showed a decrease in the fusion temperatures of the nanostructures in comparison to mixed raw materials. BZ3 incorporation did not change thermal events, and also larger fusion peak of RP was observed by incorporating liposoluble surfactant Span 60. In addition, TEM images suggested that the PLA nanocapsules display some elastic characteristic. For a better investigation, permeation through 50 nm pores of two crossed membranes at transepidermal pressure were evaluated and showed that NC are able to cross the membranes when PEG-8L is used, which is a surfactant commonly used in order to increase the pore wettability in assays with elastic liposomes. The PLA were additionally functionalized with Nile blue dye (NB) by a covalent bond formation. This PLA-NB labeled material was used in the nanostructures

preparations before permeation studies by Franz diffusion cells. Both fluorescence from the RP and functionalized polymer, were found in the same depth in the skin, showing that the nanocarrier is able to permeate the skin, instead of a release of the active. The quantification by HPLC showed that after 24 h permeation studies the RP is found in the receptor chamber. Overall, these novel and versatile polymeric NC show a huge potential for pharmaceutical applications due to their excellent permeation through the skin which makes this system particularly attractive for drug delivery applications, such as in transcutaneous applications.

ÍNDICE

Lista de Figuras.....	xix
Lista de Tabelas.....	xxiii
Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....	xxv

I INTRODUÇÃO..... 1

I.1	PRELIMINARES: SISTEMAS NANOESTRUTURADOS NO CARREAMENTO DE BIOATIVOS	1
I.2	NANOCOSMÉTICOS	3
I.3	PELE	6
I.3.1	Anatomia e Fisiologia da Pele.....	6
I.3.2	Rotas de Absorção Percutânea e Nanopartículas.....	9
I.4	QUÍMICA COLOIDAL.....	15
I.4.1	Considerações Gerais.....	15
I.4.2	Tensão Superficial	17
I.4.3	Estabilidade Coloidal	19
I.5	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS: CARACTERÍSTICAS E OBTENÇÃO.....	22
I.5.1	Nanoprecipitação e Deposição Interfacial.....	23
I.6	PROPRIEDADES E CARACTERÍSTICAS DOS BIOATIVOS.....	27

II OBJETIVOS 31

III PARTE EXPERIMENTAL..... 33

III.1	REAGENTES UTILIZADOS	33
III.2	METODOLOGIA.....	35
III.2.1	Teste de Inchamento e Dissolução dos Polímeros	35
III.2.2	Estudo de Algumas Variáveis de Preparação no Método de Nanoprecipitação	35
III.2.3	Obtenção do Derivativo Polimérico Fluorescente: Poli(D,L-Lactídeo)-Azul do Nilo (PLA-AN).....	37
III.2.4	Preparação das Nanopartículas.....	38
III.3	CARACTERIZAÇÃO	39
III.3.1	Eficiência de Encapsulamento	39

III.3.2	Distribuição de Diâmetros e Potencial Zeta	39
III.3.3	Morfologia	39
III.3.4	Avaliação da Estabilidade Físico-Química	40
III.3.5	Medidas de Densidade	41
III.3.6	Estudos de Citotoxicidade/Fototoxicidade	41
III.3.7	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	42
III.3.8	Estudos de Liberação <i>in Vitro</i>	43
III.3.9	Preparação e Caracterização de Formulações Semi-Sólidas.....	43
III.3.10	Estudos de Permeação Cutânea em Célula de Difusão de Franz....	44
III.3.11	Microscopia de Varredura a Laser Confocal (CLSM)	45
III.3.12	Estudos de Permeação em Membranas de Policarbonato	46
III.3.13	Análise dos Resultados.....	46
IV	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
IV.1	ESCOLHA DO POLÍMERO BIODEGRADÁVEL	47
IV.2	ESTUDO DAS VARIÁVEIS NA PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PLA.....	48
IV.3	OBTENÇÃO DO DERIVATIVO POLIMÉRICO FLUORESCENTE POLY(D,L-LACTÍDEO)-AZUL DO NILO (PLA-AN)	53
IV.4	PREPARAÇÃO DAS NANOESTRUTURAS	56
IV.5	MEDIDAS DE DENSIDADE EM GRADIENTE DE PERCOLL.....	65
IV.6	ENSAIOS DE CITOOTOXICIDADE E FOTOTOXICIDADE.....	66
IV.7	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA	72
IV.8	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS NANOCÁPSULAS POR FFEM E TEM	77
IV.9	ESTUDO DE PERMEAÇÃO EM MEMBRANA SINTÉTICA	81
IV.10	CARACTERIZAÇÃO DA FORMULAÇÃO SEMI-SÓLIDA	85
IV.11	OBTENÇÃO DAS NANOCÁPSULAS DE PALMITATO DE RETINILA NO ENCAPSULAMENTO DA BENZOFENONA-3 E BAICALEÍNA	89
IV.12	ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL DAS NANOCÁPSULAS	90
IV.13	ESTUDOS DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	92
IV.14	ESTUDO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA EM CÉLULA DE DIFUSÃO VERTICAL DE FRANZ DA NANOCÁPSULAS	94
IV.14.1	Análise por HPLC.....	94
IV.14.2	Avaliação por Microscopia de Varredura a Laser Confocal	97
V	CONCLUSÕES	103

VI TRABALHOS FUTUROS	105
VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
VIII ANEXO	117

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1: Representação simplificada de um sistema de (a) nanoesferas e (b) nanocápsulas poliméricas.	2
Figura I.2: Esquema representativo da pele humana (adaptado de Encarta, 2005).	6
Figura I.3: Representação da expansão, dx , de um filme através da força F aplicada em um fio metálico de comprimento l	17
Figura I.4: Ilustração da estabilidade coloidal de um sistema a partir da teoria DLVO (adaptado de Myers, 1999).....	20
Figura I.5: Representação esquemática da obtenção de partículas pela técnica de nanoprecipitação.	24
Figura III.1: Célula de difusão de Franz utilizada no experimento de permeação em pele humana abdominal.....	44
Figura III.2: Extrusora utilizada na permeação em membranas de policarbonato.....	46
Figura IV.1: Testes de inchamento dos filmes poliméricos PCL e PLA em PR.....	48
Figura IV.2: Imagens SEM representativas dos ensaios 1-8 anteriores à liofilização. .	49
Figura IV.3: Imagens SEM representativas dos ensaios 1-8 após a liofilização.....	50
Figura IV.4: Mecanismo proposto para obtenção do derivativo fluorescente (CARRY, 2005). R_1 = cadeia polimérica; RNH_2 = corante azul do Nilo.....	54
Figura IV.5: Possíveis intermediários na reação, onde R = cadeia carbodiimida, R^1 = cadeia polimérica, R^2 = grupos laterais das cadeias poliméricas, R^3 = NH . (a) O-acilouréia, (b) N-acilouréia e (c) = S(4H-)oxazolonas.....	54
Figura IV.6: Espectros de (1) absorbância no UV/VIS e (2) emissão de: (a) azul do Nilo e (b) PLA-azul do Nilo.	55
Figura IV.7: Espectros de excitação e emissão para (a) palmitato de retinila e (b) PLA-azul do Nilo em fase aquosa.	56
Figura IV.8: Imagens SEM representativas das preparações NS (branco) e NC_A.	58
Figura IV.9: Imagens das preparações de NS, NC1, NC2 e NC3 (da esquerda para a direita).....	59
Figura IV.10: Imagens das preparações de NS, NC1, NC2 e NC3 (da esquerda para a direita) após etapa de ultracentrifugação.....	60

Figura IV.11: Imagens SEM representativas das preparações de NC1 NC2 e NC3 (da direita para a esquerda).....	62
Figura IV.12: Distribuição de diâmetros por número das nanocápsulas (NC), nanoesferas (NS), nanoemulsões (NE), e niossomas (NI).	63
Figura IV.13: Comparação de sistema de nanoesferas (NS), nanoemulsões (NE) e nanocápsulas (NC), sendo que a preparação NC foi realizada sem adição de surfactante hidrofílico.....	64
Figura IV.14: Esquema representativo dos tubos após formação de gradiente de Percoll por centrifugação: nanoemulsões (NE), nanocápsulas (NC), nanocápsulas sem Span 60 (NC(-)Span60) e <i>beads</i>	66
Figura IV.15: Avaliação dos efeitos de surfactantes sobre a proliferação celular em culturas de (a) fibroblastos (linhagem BALB/c 3T3) e (b) queratinócitos (linhagem HaCaT).	67
Figura IV.16: Avaliação da citotoxicidade e fototoxicidade das diferentes formulações em células BALB/c 3T3 e HaCaT. (NE= nanoemulsões, NC= nanocápsulas, NS= nanoesferas; Tiouréia = controle negativo; Hematoporfirina = controle positivo).	70
Figura IV.17: Percentagens de palmitato de retinila nas nanocápsulas em relação à quantidade inicial em função do tempo (dosagem por HPLC). NC = nanocápsulas sem estabilizantes; NCEST = nanocápsulas com BHT e Tinogard Q.....	72
Figura IV.18: Medidas de pH das NC em função do tempo: NC = nanocápsulas sem estabilizantes; NCEST = nanocápsulas com BHT e Tinogard Q.....	73
Figura IV.19: Potencial zeta das NC em função do tempo. NC = nanocápsulas sem estabilizantes; NCEST = nanocápsulas com BHT e Tinogard Q.....	74
Figura IV.20: Distribuição de diâmetros de nanocápsulas de palmitato de retinila em relação ao tempo. NC = nanocápsulas sem estabilizantes; NCEST = nanocápsulas com BHT e Tinogard Q.	75
Figura IV.21: Esquema operacional do equipamento Turbiscan.....	76
Figura IV.22: (a) Variações de retroespalhamento (eixo Y) ao longo da cubeta (eixo X de 0 a 50 mm). (b) Observação da cinética de <i>creaming</i> (altura da cubeta <i>versus</i> tempo). (# variações devidas ao menisco)	76
Figura IV.23: Análise morfológica das nanocápsulas por FFEM.....	78

Figura IV.24: Imagens TEM de (a) branco , (b) Niossomas, (c) Nanoesferas, (d) Nanoemulsões e (e) Nanocápsulas.....	79
Figura IV.25: Mecanismo proposto para a secagem de partículas: (1) adesão capilar segundo a equação I.7 de Young-Laplace; (2) comprovação do mecanismo através da comparação entre (a) amostras secas com vizinhança e (b) amostras secas isoladas.....	80
Figura IV.26: Distribuição de diâmetros (a) por intensidade e (b) por número das nanocápsulas anterior a permeação (NC PEG40), após a permeação (NCPEG40 permeado) e partículas retidas no filtro (NCPEG não-permeado) (2,5 atm).	83
Figura IV.27: Imagens TEM das nanocápsulas após o experimento de permeação: (a) permeado; (b) retido no filtro.	84
Figura IV.28: Curvas de histerese do comportamento reológico das nanocápsulas incorporadas ao gel (NC) em comparação com o branco (gel sem a adição das nanocápsulas).....	86
Figura IV.29: Gráficos de DSC para as matérias primas utilizadas, misturas físicas e nanoestruturas. Mist(-span)= mistura física de palmitato de retinila (PR), PLA e Pluronic F68 (sem Span 60); Mist= mistura física; Mist(+BZ3)= adição de benzofenona-3.; NC(-span)= nanocápsulas sem Span60; NC = Nanocápsulas; NCBZ3= nanocápsulas encapsulando BZ3; NS = nanoesferas; NE= nanoemulsões.	91
Figura IV.30: Perfil de liberação da benzofenona (BZ3) livre, incorporada em nanoemulsões (NEBZ3), nanocápsulas (NCBZ3) e nanoesferas (NSBZ3).	93
Figura IV.31: Ilustração de cromatogramas após os ensaios de permeação: <i>tape</i> , receptor e pele sem palmitato de retinila (Branco), e utilizando nanocápsulas de palmitato de retinila (NC_Pele).....	94
Figura IV.32: Permeação das nanocápsulas em pele humana abdominal após 24 h de permeação em célula de difusão vertical de Franz.	95
Figura IV.33: Permeação da BZ3 encapsulada em nanoesferas (NS) e nanocápsulas (NC) em pele humana abdominal após 24 h de permeação em célula de difusão vertical de Franz.....	96
Figura IV.34: Corte transversal na pele indicando a integridade da epiderme e da derme. A seta indica a divisão entre derme (esquerda) e epiderme (direita).	98
Figura IV.35: Permeação de uma amostra de Nanoesferas PLA-azul do Nilo encapsulando FITC após 2 h de permeação em célula de difusão vertical de Franz:	

(□Y)= superfície. As imagens mostram a marcação do FITC, azul do Nilo (AN) e a sobreposição das imagens (FITC-AN).	98
Figura IV.36: Pele após 4h de permeação com a suspensão de nanocápsulas com polímero funcionalizado, analisada em sentido horizontal (□Y) e seccionamento óptico do microscópio no eixo de profundidade Z (□Z).	99
Figura IV.37: Pele após 2 h de experimento de permeação com a suspensão de (a) nanoesferas NS com polímero funcionalizado e (b) e nanoemulsões NE.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela III.1: Procedência dos reagentes utilizados.....	34
Tabela III.2: Variáveis empregadas no planejamento 2^{5-2}	35
Tabela III.3: Planejamento Fatorial 2^{5-2} empregado na obtenção de partículas pelo método de nanoprecipitação.	36
Tabela III.4: Formulações de NC, NS, NE e NI.....	38
Tabela IV.1: Diâmetros médios de partículas e (d) e índices de polidispersidades (P.D.I).	51
Tabela IV.2: Efeitos calculados para os diâmetros médios de partículas no planejamento fatorial 2^{5-2}	52
Tabela IV.3: Diâmetros médios de partículas (d) e polidispersidades (P.D.I.) das preparações NS, NC1, NC2 e NC3.....	61
Tabela IV.4: Valores de potencial zeta para as preparações NS, NC1, NC2 e NC3.	62
Tabela IV.5: Valores de diâmetros e potencial zeta para as preparações NS, NI, NE e NC com tween 80 (Tw) e Pluronic F68 (PI) a 1% (m/v).	64
Tabela IV.6: Dados de diâmetros em estudo de permeação em membranas sintéticas.	82
Tabela IV.7: Modelagem do comportamento reológico do gel de carbopol contendo as nanocápsulas (NC) e gel contendo surfactante (Branco).	87
Tabela IV.8: Valores de diâmetros e potencial zeta para as preparações nanoesferas (NS) e nanocápsulas (NC) no encapsulamento dos ativos BAI e BZ3.....	89

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

λ = comprimentos de onda (nm)

γ = tensão superficial

AN = azul do Nilo

Bai = baicaleína

BALB/c 3T3 = linhagem de fibroblastos de embrião de camundongo

BHT = 3,5-di-terc-butil-4-hidroxi-tolueno

BZ3 = benzofenona-3

CLSM = microscopia de varredura a laser confocal

cmc= concentração micelar crítica

col. = colaboradores

CTAB = brometo de cetiltrimetilamônio

d= diâmetro

DCC= dicicloexilcarbodiimida

DLS = espalhamento de luz dinâmico

DSC = calorimetria diferencial de varredura

Em = emissão

EtOH = etanol

Ex = excitação

FFEM = microscopia eletrônica após fratura criogênica

FITC = isotiocianato de fluoresceína

GPC = cromatografia de permeação em gel

HaCat = linhagem de queratinócitos humano

HPLC = cromatografia líquida de alta eficiência

K = constante de Boltzmann

MeOH= metanol

MTT= brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico

NC = nanocápsulas

NE = nanoemulsões

NHS = N-hidroxi(succinimida)

NI = niossomas

NLC = carreadores lipídicos nanoestruturados

NP = nanopartículas

NS = nanoesferas

P.D.I. = índice de polidispersidade

PBS = tampão fosfato de sódio

PCL = poli(ϵ -caprolactona)

PEG-8L= polioxietilenoglicol 8-lauril

PHBV = poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)

PLA = poli(D,L-lactídeo)

PLGA = poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo)

PR = palmitato de retinila

PVA = álcool polivinílico

rpm = rotações por minutos

SANS = espalhamento de nêutrons em pequenos ângulos

SDS = dodecilsulfato de sódio

SEM = microscopia eletrônica de varredura

SFB = soro fetal bovino

SLN = nanopartículas lipídicas sólidas

T = temperatura

t = tempo

TEM = microscopia eletrônica de transmissão

u.a. = unidades arbitrárias

UV/VIS = (espectroscopia de absorção na região) ultravioleta e visível

VN = cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina

wt% = percentagem em massa

I INTRODUÇÃO

I.1 Preliminares: Sistemas Nanoestruturados no Carreamento de Bioativos

Nanopartículas tem se destacado muito nos últimos anos como carreadoras de fármacos, sendo conhecidas comumente como *drug delivery systems*. Além do bioativo, o nanocarreador é reconhecido atualmente como crucial para se obter a resposta farmacológica desejada. De fato, a administração de muitos medicamentos é fortemente limitada devido ao perfil biofarmacêutico, tais como permeabilidade inadequada ou degradação no compartimento biológico de ação. Nesse contexto, os nanocarreadores podem viabilizar o uso de diversos medicamentos, tendo em vista que atuam na redução de degradação e toxicidade de drogas; liberação sustentada; aumento da eficácia do medicamento, diminuindo as quantidades terapêuticas necessárias; além da possibilidade de passagem por barreiras biológicas (GREEF e COUVREUR, 2006; COUVREUR e VAUTHIER, 2006; PANYAN e LABHASETWAR, 2003; ALONSO, 2003; SOPPIMATH e col. 2001). No contexto de permeação cutânea, os nanocarreadores têm se destacado pela possibilidade de modulação da permeação e distribuição do bioativo (GUTERRES e col. 2007; HOET e col., 2004).

Na tecnologia farmacêutica, as nanopartículas são definidas como sistemas coloidais submicrométricos, geralmente na faixa de 10 a 1000 nm (SOPPIMATH e col., 2001). Entretanto, segundo alguns autores,

micropartículas menores que 10 μm freqüentemente podem ser incluídas na categoria de partículas 'nanométricas' pela passagem de barreiras celulares por endocitose ou fagocitose em leucócitos, monócitos, macrófagos e outras células (ANDERSON e SHIVE, 1997).

A nanotecnologia farmacêutica teve início em 1968 com os lipossomas como carreador de fármacos hidro ou lipofílicos (SESSA e WEISSMAN, 1968). No final dos anos 70, surgiram as nanopartículas poliméricas carreadoras de fármacos lipofílicos (COUVREUR e col., 1979) e na década de 1990, as nanopartículas lipídicas sólidas, SLN (SCHWARZ e col., 1994). As SLN, no entanto, apresentaram limitações quanto à expulsão prematura da droga. Este problema foi resolvido através do uso de uma mistura de lipídios, incluindo lipídios líquidos no sistema, sendo que este sistema foi denominado carreadores lipídicos nanoestruturados, NLC (MÜLLER e col. 2002). Quando comparadas aos lipossomas, as nanopartículas poliméricas apresentam maior estabilidade em fluidos biológicos e no armazenamento, além de sua preparação apresentar maior facilidade de produção em larga escala (QUINTANAR-GUERRERO, 1998; TEIXEIRA e col., 2008).

Nas nanopartículas poliméricas, o bioativo pode ficar encapsulado em um núcleo oleoso ou aquoso (nanocápsulas, NC); disperso na matriz (nanoesferas, NS); além de poder estar adsorvido ou ligado quimicamente na superfície de nanopartículas (SCHAFFAZICK, e col., 2003; GUTERRES E COL., 2007; VAUTHIER E BOUCHEMAL, 2009). A Figura I.1 descreve as principais estruturas (NS e NC).

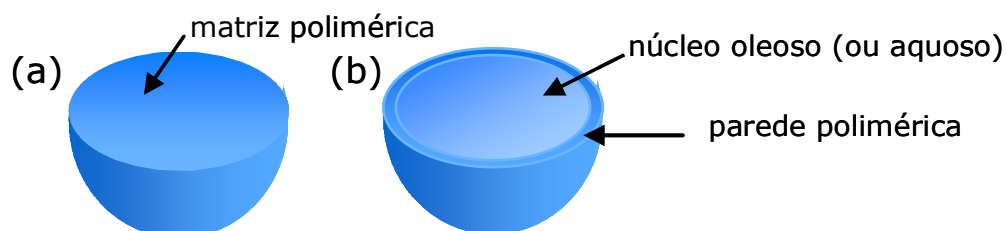


Figura I.1: Representação simplificada de um sistema de (a) nanoesferas e (b) nanocápsulas poliméricas.

Nesta introdução, informações sobre os nanocosméticos com foco no setor econômico brasileiro e nos produtos de cuidado para a pele serão fornecidas. A seguir, aspectos relacionados à anatomia e fisiologia da pele, objeto de interesse neste trabalho, serão descritos. As principais rotas de permeação em pele serão apresentadas e contextualizadas quanto ao emprego de nanopartículas. Alguns conceitos importantes em química coloidal serão descritos. Finalmente, a técnica de preparação de partículas empregada e as principais características dos bioativos de interesse serão apresentadas.

As fórmulas estruturais dos compostos de interesse deste trabalho, bem como das moléculas mencionadas no decorrer do texto são apresentadas no Anexo.

I.2 Nanocosméticos

As publicações de micro e nanopartículas em uso cosmético são relacionados a: i) proteção de ativos quanto à degradação, bem como liberação controlada, por exemplo, microcápsulas de vitamina A encapsuladas em microesferas poliméricas de poli(metil-metacrilato)-co-polietilenoimina (LEE e col, 2004) e nanocápsulas de polímeros e co-polímeros de poliuretano como carregadores de α -tocoferol (vitamina E) (BOCHEMAL e col, 2004); ii) liberação controlada de ativos que são irritantes em altas concentrações (MÜLLER-GOYMANN, 2004); iii) prolongamento do tempo de residência de protetores solares na camada córnea como microesferas de TiO_2 /poli(metil-metacrilato) (KIM e col., 2002).

Com relação à literatura de patentes, observam-se aplicações mais amplas, como exemplos: micropartículas inorgânicas recobertas com nanopartículas fractais para disfarce de rugas em produtos cosméticos (BRAHNS e col., 2009); nanopartículas e íons de prata em formulações de xampus, hidratantes etc. como bactericidas (NAKAJIMA e OGAWA, 2008); polímeros para encapsulamento de ativos cosméticos (ALONSO e col., 2005); nanopartículas de óxido de silício porosos com o ativo incorporado

(DUMOSSEAU e GOTO., 2005); partículas lipídicas sólidas na incorporação de aromas e perfumes para liberação controlada em produtos cosméticos, fármacos ou alimentos (DAHMS e col., 2005); nanopartículas de prata e ouro como “corantes” em formulações cosméticas, por exemplo, em batons (JUNG e col., 2007); nanopartículas metálicas para aumento do ‘brilho’ em cabelo e maquiagens (GIROUD, 2005); incorporação nanopartículas de óxido de zinco em cosméticos para controle do bronzamento (VERMA e col., 2005).

A pesquisa empregando as palavras-chave *cosmetic and nanoparticles* resulta em apenas 62 artigos na *Web of Science* (1945-agosto/2009) enquanto que na busca por patentes (Derwent Innovation Index - 1966-agosto/2009) observam-se 408 patentes depositadas. Isso mostra que a maior parte do conhecimento de nanotecnologia em cosméticos está protegida na literatura de patentes, o que é devido à elevada competitividade, acompanhada por crescimento econômico e inovação tecnológica neste setor.

O setor de cosméticos tem apresentado uma trajetória de vendas ascendente nos últimos anos, independente de turbulências econômicas como o desaquecimento das maiores economias e intensificação de barreiras não-tarifárias. No caso brasileiro, há uma infinidade de pequenas e médias empresas convivendo com empresas de atuação mundial em equilíbrio, pois cada uma atua em mercados específicos e utilizam estratégias diferenciadas. Nos últimos 13 anos, a indústria brasileira de higiene pessoal, cosméticos e perfumaria passou de um faturamento líquido de imposto sobre vendas de R\$ 4,9 bilhões em 1996 para R\$ 21,7 bilhões em 2008. Em relação ao mercado mundial de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, conforme dados do Euromonitor de 2008, o Brasil ocupa a terceira posição (ABIHPEC, 2009).

Dentre os obstáculos, frente ao desenvolvimento, enfrentados pelo setor de cosméticos destaca-se a escassez de mão-de-obra qualificada, tendo em vista que há poucas instituições na formação de trabalhadores especializados. A formação dos profissionais da área se faz principalmente através de cursos de qualificação e treinamentos oferecidos pelas empresas. As empresas nacionais que realizam atividades no sentido de aperfeiçoar seus profissionais, no entanto, são poucas e investem volumes reduzidos quando comparadas às

multinacionais, segundo informações fornecidas pelo presidente da Associação Brasileira de Cosmetologia (ABC). Um outro obstáculo é a necessidade de importação da maioria dos insumos, o que acaba por afetar negativamente a balança comercial brasileira e deixa de gerar uma considerável demanda para os fornecedores nacionais que compõem a cadeia produtiva, assim como, um significativo volume de emprego no mercado doméstico. A maioria das empresas produtoras de bens intermediários importa grande parte de seus insumos. Dessa forma, observa-se que há muitos segmentos a serem explorados ao longo da cadeia produtiva do setor, que vai desde atividades extrativistas até atividades de desenvolvimento de novos produtos e processos de produção (ABIHPEC, 2009).

Um fator que não foi observado nas referências consultadas, mas que julgamos ser de extrema relevância como justificativa para o crescimento econômico do setor de cosméticos é que os produtos cosméticos, no geral, são disponibilizados comercialmente com seu valor agregado relacionado a conceitos. “Mulheres e homens investem suas economias, sem o menor peso na consciência em todo tipo de promessa de cremes antirrugas” (REVISTA ÉPOCA, 2005). Muitos dos ativos que vêm sendo utilizados não têm sua ação comprovada em estudos acadêmicos (REVISTA VEJA, 2005), mas no geral, os produtos para cuidado da pele se diferenciam de diversas outras categorias de cosméticos devido à natureza funcional de suas formulações, ou seja, por possuírem, em princípio, efeitos farmacológicos consideráveis (WILLIAMS e SCHMITT, 1996). Apesar da evidência científica de que muitos dos ativos empregados têm possibilidade *in vitro* de atuar benéficamente sobre a pele, os efeitos das formulações somente ocorrem se os ingredientes ativos alcançarem os sítios alvos em concentração e tempo adequados (CHIU e KIMBALL, 2003). Para atingir estas finalidades, nos últimos anos vêm ocorrendo aumento no emprego de micro e nanopartículas como veículos de ativos.

Apesar de já existirem ‘nanocremes’ disponíveis comercialmente, ainda não se conhece os efeitos e a eficácia em longo prazo, além do mecanismo de penetração das nanopartículas na pele não ser totalmente elucidado.

Uma das estratégias atuais do governo brasileiro na área cosmética foi a criação da Rede de Nanocosméticos (CNPq / MCT) em 2006, coordenado pela profa. Sílvia S. Guterres, da qual o Laboratório de Química Biológica é integrante.

I.3 Pele

I.3.1 Anatomia e Fisiologia da Pele

A pele forma uma barreira de proteção contra o ambiente externo, auxilia na regulação da temperatura e balanço fluido, protegendo contra microorganismos e produtos químicos, além de oferecer alguma proteção contra a radiação solar (ABURJAI e NATSHET, 2003). A pele é estruturada em três partes: a epiderme, a derme (córon) e a hipoderme (camada subcutânea ou panículo adiposo), conforme é apresentado na Figura I.2. A espessura varia entre 1,4 mm e 4,0 mm dependentemente da parte do corpo.

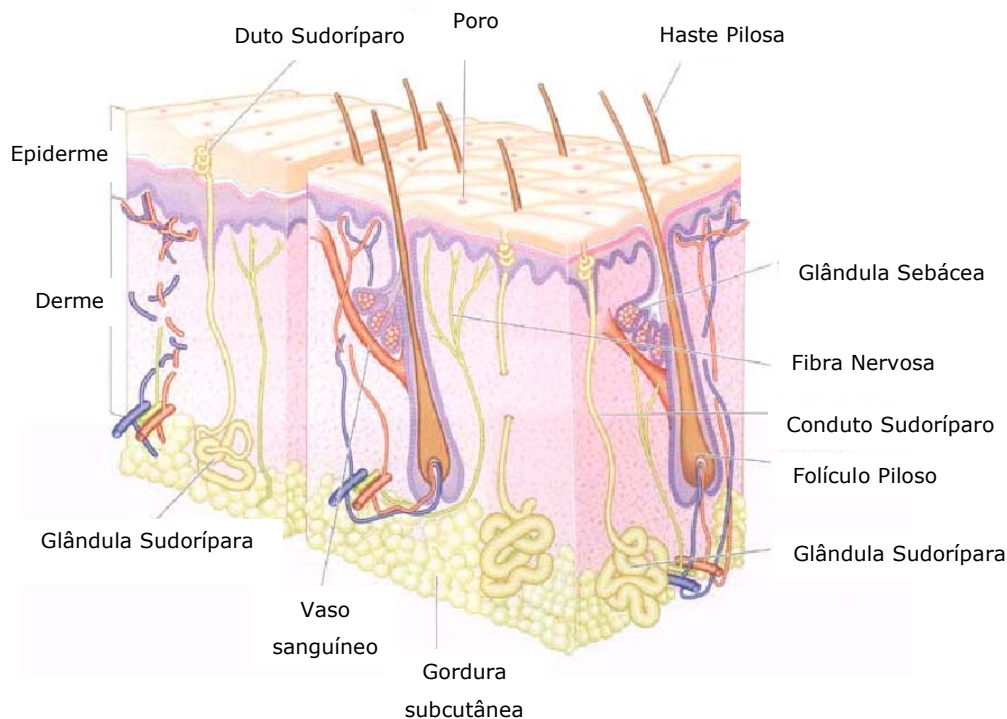


Figura I.2: Esquema representativo da pele humana (adaptado de Encarta, 2005).

A epiderme é constituída de células epiteliais dispostas em camadas, as quais recebem, a partir da camada mais interna em direção à superfície, o nome de germinativa ou basal, malpighiana ou corpo mucoso, granulosa e córnea. As células epidérmicas (queratinócitos) têm origem na camada basal e sofrem modificações graduais na forma e composição química em direção à superfície até se tornarem anucleadas na camada córnea. Na camada basal, também são encontradas células de Langerhans e melanócitos, as quais apresentam funções de defesa e de produção de pigmento melânico, respectivamente. As células da camada basal unem-se entre si e com a camada malpighiana por tonofibrilas intercelulares. A camada malpighiana ou camada de células espinhosas tem como principal característica pontes intercelulares ou desmossomos, finos e numerosos, com uma dilatação interna, os quais garantem a coesão entre células adjacentes. Nesta região, também é formado o lipídeo intercelular que é expelido em direção às células da superfície, as quais podem ser imaginadas como 'tijolos', tendo o lipídio epidermal com uma função de 'cimento', auxiliando na união entre as células. A camada granulosa é caracterizada por células em formato granular anterior à camada córnea. A camada córnea ou *horny layer* está em contato direto com o meio ambiente, sendo constituída por células anucleadas e desidratadas, as quais não são simplesmente uma coleção de células mortas, mas um organismo complexo que faz parte do sistema homeostático, tendo função e organização bem definidas. Tal camada possui ainda uma substância gordurosa, de consistência comparada à cera de abelha. A camada córnea é a mais espessa da epiderme e a ela é creditada a resistência e impermeabilidade da pele.

A derme é formada de estroma conjuntivo, no qual se encontram vasos sangüíneos e linfáticos, nervos e suas terminações, glândulas sebáceas e sudoríparas, e elementos celulares. O tecido conjuntivo, produzido nos fibroblastos, é constituído quase totalmente de fibras colágenas, elásticas e reticulares. Tais fibras formam uma estrutura entrelaçada que fornece suporte, flexibilidade e elasticidade à pele. Os fibroblastos são o tipo de célula mais numerosos na derme, onde também são encontradas células endoteliais. A

derme pode ser dividida em duas zonas distintas: a derme papilar, porção superior, apresentando saliências cônicas que se encaixam em depressões da epiderme, e a derme subpapilar que se estende até a hipoderme. Os feixes colágenos são mais delicados na derme papilar, dispõem-se de modo irregular sem entrelaçamento, enquanto que na derme subpapilar os mesmos apresentam-se mais grosseiros, dispondo-se entrecruzados paralelamente à superfície cutânea. Entre os feixes colágenos há células fusiformes (fibroblastos) e raros linfócitos ou células arredondadas. Nos fibroblastos também se origina a substância fundamental, na qual os principais constituintes são mucopolissacarídeos ácidos, especialmente ácido hialurônico, sulfato de condroitina e sulfato de dermatan. Outros componentes da substância fundamental são mucopolissacarídeos neutros, proteínas e eletrólitos. Além das células de fibroblastos, são encontrados os histiócitos, originados na medula óssea, tendo a função de 'varredores' de hemosiderina, melatonina, lipídeos e fragmentos. Na derme são encontrados artérias, capilares, vasos linfáticos e veias. O propósito deste sistema não é somente de nutrição, pois auxilia no controle de temperatura. Os nervos cutâneos acompanham os vasos sanguíneos alcançando a hipoderme, derme e epiderme (camada malpighiana). Todas as estruturas contidas na pele recebem fibras nervosas, com exceção das glândulas sebáceas, que apresentam dependência de estímulo endócrino.

Os pêlos estão contidos nos folículos pilossebáceos, que resultam da invaginação da epiderme. Compõem-se de três camadas concêntricas: medula, córtex e epidermícula. As glândulas sebáceas, em geral, têm suas terminações nos folículos pilosos. As glândulas sebáceas formam e excretam sebo que consiste em uma blenda de materiais lipídicos única do corpo. A camada de sebo na pele tem a função de impermeabilização, protegendo a camada córnea.

As glândulas sudoríparas colaboram na regulação térmica, e podem ser observadas em toda a superfície cutânea em forma de poros. A glândula sudorípara compõe-se de um novelo excretor, glomérulo, localizado na derme profunda ou hipoderme, do qual sai o conduto excretor que se dirige

perpendicularmente em direção à epiderme em um trajeto descrevendo espiras.

A hipoderme (tecido celular subcutâneo ou panículo adiposo) é constituída de células adiposas entre feixes conjuntivos de fibras elásticas, tendo a função de proteção contra traumatismo dos vasos e nervos que devem alcançar a derme, além das funções de isolante térmico e reservatório de energia (BECELLI e CURBAN, 1975; MOSCHELLA e col., 1975).

I.3.2 Rotas de Absorção Percutânea e Nanopartículas

A pele humana é uma barreira efetiva e seletiva a produtos químicos, onde a epiderme, especificamente a camada córnea é o maior elemento de controle. Três caminhos possíveis como rotas de penetração podem ser definidas: através do folículo pilosebáceo, via ductos sudoríparos ou através da camada córnea. Alguns autores consideram que os folículos pilosebáceos e as glândulas sudoríparas possuem um papel secundário quanto à rota de penetração, pois somente por um curto período logo após a aplicação a absorção através dos anexos é mais efetiva do que a absorção através da camada córnea. A absorção através dos anexos ocorre por difusão e envolve, primariamente, substâncias solúveis em água. A maior parte da absorção percutânea ocorre através da camada córnea, a qual possui uma área superficial expressivamente maior do que a dos folículos pilosebáceos e os ductos sudoríparos.

Um gradiente de concentração é provavelmente a força motora responsável pela absorção percutânea através da camada córnea. Além disso, o mecanismo transcorneal pode ser diretamente através das paredes celulares da camada córnea ou via rota intercelular. A maioria das moléculas atravessa a camada córnea pela rota intercelular, de maneira que muitas técnicas de aumento na penetração visam desorganizar ou estabelecer passagem na elegante arquitetura molecular da camada córnea, a qual consiste em 'tijolos' (os queratinócitos) e 'cimento' (os lipídios) que formam 'paredes'. A hidratação da camada córnea aumenta sua permeabilidade, possivelmente pela expansão

de canais que são preenchidos com água. Estes canais não podem ser considerados como poros verdadeiros, mas podem simplesmente representar filamentos protéicos que atuam como caminho para compostos polares. Os lipídios da camada córnea provêem uma rota para moléculas apolares. Substâncias lipossolúveis, no entanto, que não danificam a camada córnea, são absorvidas em uma menor extensão através dos folículos pilosebáceos (MOSCHELLA e col., 1975, HOET e col., 2004).

Uma das maneiras de aumentar a absorção percutânea consiste no emprego de nanopartículas. As técnicas clássicas experimentais empregadas para avaliar o mecanismo de interação das partículas com a pele incluem experimentos de difusão e visualização, empregando microscopia eletrônica, microscopia óptica e fluoromicrografia. Uma desvantagem destas técnicas consiste na necessidade de congelamento dos tecidos, o que pode alterar a organização dos lipídeos na pele ou pode resultar em uma redistribuição da droga. Atualmente, diversos trabalhos têm relatado a utilização da microscopia de varredura a laser confocal (CLSM), cuja principal vantagem consiste na possibilidade de seccionamento óptico do tecido, permitindo a visualização da distribuição da sonda fluorescente em função da penetração no tecido (ALVAREZ-ROMÁN e col., 2004a; ALVAREZ-ROMÁN e col., 2004b).

As características físico-químicas das partículas como tamanho, carga superficial e hidrofobicidade influenciam na deposição e penetração no tecido biológico. Os principais tipos de materiais empregados na obtenção de partículas são: nanopartículas inorgânicas como TiO_2 , lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas e nanopartículas poliméricas (HOET e col., 2004).

Às partículas de TiO_2 , empregadas na proteção solar, na faixa de tamanhos de partículas próximo a 15 nm, foram atribuídas penetração na pele e interação com o sistema imunológico (MENZEL e col., 2004). Em tal trabalho, os autores sugerem que o TiO_2 atravessa a pele através das camadas bilipídicas da camada córnea, rota intercelular, além de possivelmente serem fagocitadas pelas células de Langerhans. Em outros trabalhos, o emprego de partículas de TiO_2 na faixa de 3 a 8 μm evidenciou somente uma limitada

absorção na pele através do folículo pilossebáceo (LADEMANN e col., 1999; LADEMANN e col., 2001).

Em trabalho de LARESEA e col. (2009), nanopartículas de prata menores do que 25 nm foram utilizadas em estudo de permeação cutânea por célula de difusão de Franz, utilizando pele integra e danificada. Após 24 h de permeação, a quantificação na célula receptora indicou que as nanopartículas permearam até a célula receptora, sendo que na pele danificada, apresentou a maior permeação. Nanopartículas de ferro menores do que 10 nm também foram relatadas apresentando permeação através de folículos e camada córnea alcançando ocasionalmente a epiderme viável (BAROLI e col. 2007). Partículas de ouro de 15, 102 e 198 nm apresentaram permeação em pele de ratos em camadas da epiderme e derme, sendo que as partículas menores alcançaram camadas mais profundas da derme (SONAVANEA e col. 2008).

HOET e col. (2004) sugeriram que no caso de lipossomas, os micrométricos não atingem toda epiderme enquanto que aqueles com diâmetro médio de 272 nm podem alcançar a epiderme e uma pequena parte da derme. Os lipossomas na ordem de 116 e 71 nm podem ser encontrados em alta concentração na derme. Além disso, vesículas lipossômicas carregadas negativamente apresentam maior penetração do que as carregadas positivamente (REDZINIAK, 2003).

Partículas de Emzaloid®, um tipo de partícula submicrométrica como lipossomas e vesículas surfactantes não-iônicas (niossomas), com diâmetro de 50 nm a 1 µm, foram detectadas na epiderme em associação com membranas celulares após a aplicação em pele humana. Os autores sugeriram que as nanopartículas podem penetrar no espaço intracelular, e agir em certas regiões na camada córnea, sendo capazes de se acumularem e reformarem em microesferas. Em um experimento subsequente, foi observado que o uso de tal formulação permitia a penetração de esferas no núcleo de células de melanoma (JAMES e col., 1999).

No caso de nanopartículas lipídicas sólidas como carreadores de podofilotoxina, partículas com diâmetro médio de 73 nm e potencial zeta -48 mV apresentaram dois caminhos de penetração cutânea: através da camada

córnea e via folículos pilossebáceos (CHEN e col., 2006). Em um estudo comparativo entre SLN e estruturas dendríticas *core-multishell* (CMS), o corante hidrofílico rodamina B apresentou maior permeação quando encapsulado na CMS. Além disso, o uso de diferentes tamanhos de partículas (50 e 200 nm) não causou variação significativa na permeação, mostrando que, nesse caso, a permeação do corante é dependente apenas do tipo de nanoestrutura empregada (KÜCHLER e col., 2009).

A penetração de nanopartículas de poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) contendo rodamina, de 1 a 10 μm , foram estudadas pela aplicação em pele suína. A localização do corante foi dependente da profundidade, sendo que até 120 μm (epiderme) foi observada a maior concentração, em 400 μm (derme) apenas alguns pontos ainda puderam ser visualizadas por CLSM (DE JALON e col., 2001).

O encapsulamento de moléculas lipofílicas (como modelo vermelho do Nilo) em nanopartículas do polímero biodegradável poli-(ϵ -caprolactona) (PCL) aumentou significativamente a penetração da molécula através da camada córnea, visualizada também por CLSM (ALVAREZ-ROMÁN e col., 2007c). Os mesmos autores utilizaram nanopartículas fluorescentes de poliestireno com diâmetros de 20 e 200 nm para investigação da forma de permeação (ALVAREZ-ROMÁN e col., 2004a). As imagens de superfície revelaram que as partículas de poliestireno, principalmente as de menores tamanhos, acumulam-se preferencialmente na região folicular, sendo que esta distribuição no folículo aumenta com o tempo. No entanto, a distribuição das nanopartículas com relação à camada córnea limitou-se à superfície. Devido a esse trabalho, os autores sugeriram que no trabalho anterior, de liberação de partículas lipofílicas por PCL, o mecanismo mais provável foi uma maior eficiência na liberação da droga na camada córnea e não a maior penetração da nanopartículas como anteriormente sugerido (ALVAREZ-ROMÁN e col., 2004c). Partículas de PLGA aumentaram a permeação de ácido flufenâmico. Entretanto, somente a droga apresentou maior permeação, sendo que as partículas ficaram retidas na camada mais externa da pele. Além disso, o pH influenciou no gradiente de concentração desta droga a partir das camadas

mais externas (camada córnea) em direção a derme (LUENGO e col., 2006). WU e col. (2009) verificaram que em partículas de PCL, a liberação em pele do corante vermelho do Nilo ocorre em maior profundidade na pele conforme o tamanho das partículas aumenta. Os autores sugeriram que as partículas maiores apresentam maior área de contato com a pele, propiciando maior coeficiente de difusão do ativo encapsulado.

Partículas de minoxidil em copolímero poli-(ϵ -caprolactona)-bloco-poli(etilenoglicol) de tamanhos de 40 e 130 nm foram aplicadas em pele de cobaias e de cobaias sem pêlos, em celas de difusão de Franz. As partículas de 40 nm tiveram uma maior permeação do que as de 130 nm somente na linhagem de cobaias com pêlos, indicando que o mecanismo de permeação cutânea neste caso é, provavelmente, folicular (SHIM e col., 2004).

GU e ROY (2004) sugeriram o emprego de partículas de PLGA em formulações de vacinas tópicas, sendo que a penetração percutânea aumenta com a diminuição do tamanho de partículas, podendo-se direcionar os antígenos atenuados em nanopartículas para células de Langerhans presentes na epiderme.

A carga das nanopartículas também apresenta um papel importante na penetração percutânea, porém o mecanismo pelo qual isto ocorre ainda não é comprovado. Um estudo de permeação de nanopartículas através da pele mostrou que dentre partículas de látex na faixa de 50, 100, 200 e 500 nm carregadas positivamente, negativamente e neutras, apenas as partículas negativamente carregadas de 50 e 500 nm permearam na pele (KOHLI e ALPAR, 2004). Os autores sugerem que esta permeabilidade de partículas negativas é devida à força repulsiva entre os lipídios aniônicos na pele e as partículas com carga negativa. Tais forças podem resultar na formação de canais temporários na pele permitindo a permeação das nanopartículas. Com base nisso, propôs-se que deve existir uma carga limiar que deve ser alcançada para permitir repulsão adequada dos lipídios da pele para permitir a permeação das partículas, que nesse caso ocorreu somente com tamanhos de partículas de 50 e 500 nm. Este favorecimento à permeação por nanopartículas carregadas negativamente também foi observado por CUI e MUMPER (2002),

os quais verificaram que quitosanas carregadas negativamente foram capazes de provocar uma resposta imune na proliferação de citocinas maiores do que partículas carregadas positivamente quando aplicadas na pele. No caso de vesículas de surfactantes encapsulando ampicilina, observou-se uma maior atividade antimicrobiana da droga aplicada topicamente na ordem: vesículas negativas > vesículas positivas e neutras > droga livre. Neste caso, uma vez que a eficiência de encapsulamento foi similar para as formulações estudadas, as vesículas carregadas negativamente apresentaram permeação através de membranas lipofílicas em pele de porco maior do que utilizando as demais formulações (CARAFA e col., 2004).

O estudo comparativo de nanoesferas (NS), nanocápsulas (NC), e nanoemulsões (NE) no encapsulamento de nimesulida como fármaco modelo, mostrou que o polímero PCL apresentou maior afinidade pela camada córnea, uma vez que os resultados indicaram maior quantidade de nimesulida retida na camada córnea para as NS e NC do que para a NE. A penetração do fármaco, no entanto, foi maior no sistema empregando NC (ALVES e col., 2007).

STRACKE e col. (2008) utilizaram a técnica de microscopia multifóton para investigação do carreador (PLGA-fluoresceína) e de um modelo de droga encapsulada (*Texas red*), partículas de 290 nm, em pele humana. Os resultados indicaram que ocorre uma liberação do *Texas red* já nos tempos iniciais permeando uniformemente na pele, sendo que as partículas permanecem na superfície. Em trabalho empregando cápsulas de látex com diferentes espessuras de parede polimérica e diâmetros entre 320 e 460 nm, o corante encapsulado (vermelho do Nilo) não apresentou permeação, mas apenas uma acumulação nos folículos pilosos (YOW e col., 2009).

Outros nanocarreadores, no entanto, como os lipossomas elásticos, são conhecidos por permearem a pele uniformemente permitindo uma aplicação transdérmica (TROTТА e col., 2002; BOUWSTRA e HONEYWELL-NGUYEN, 2002; CEVC e BLUME, 1992). Recentemente, polimerossomas (vesículas de copolímero em bloco policaprolactona-polietilenoglicol-policaprolactona) foram relatadas para aumento de permeação cutânea, devido à capacidade de

deformação das partículas observadas por TEM, possibilitando a passagem do carreador através de poros da pele (RASTOGI e col. 2009).

Cabe destacar que as nanopartículas nem sempre são empregadas para aumento de permeação cutânea, mas em alguns casos, são utilizadas para diminuir a permeação e absorção sistêmica de alguns ativos. Para aumentar o tempo de residência da benzofenona-3 na camada córnea, LUPPI e col. (2004) sugeriram o uso de nanopartículas do álcool polivinílico ligado a ácidos graxos com diferentes graus de substituição no encapsulamento da benzofenona-3, sendo que a distribuição e permeação do ativo foram dependentes do sistema empregado. JIMÉNEZ e col. (2004a) empregaram NE e NC no encapsulamento de metoxinamato de octila (OMC) e verificaram que ocorre uma diminuição significativa da permeação utilizando as NC.

Os mecanismos de penetração de nanopartículas na literatura ainda não são totalmente elucidados. Em alguns casos, como o de partículas inorgânicas, a permeação de partículas geralmente é dependente do tamanho, sendo que quanto menor o tamanho maior é a penetração na pele. Tal afirmação, no entanto, deve ser vista com cautela, uma vez que outros fatores, além de tamanho, como características de superfície são cruciais no mecanismo de permeação de partículas. No caso das partículas poliméricas, em sua maioria, possivelmente, apresentam apenas uma limitada permeação folicular, sendo que o principal mecanismo seria através da formação de um filme uniforme na superfície diminuindo a perda de água transepidérmica (efeito oclusivo) e favorecendo a liberação uniforme da droga por difusão.

I.4 Química Coloidal

I.4.1 Considerações Gerais

As evidências do emprego de colóides datam de tempos anteriores às primeiras escritas da civilização, sendo que as primeiras pinturas em cavernas em Lascaux (França) na idade da pedra e os primeiros relatos dos faraós já utilizavam pigmentos com partículas coloidais. Na metade do século □□,

Francesco Selmi descreveu os primeiros exemplos de partículas coloidais. A propriedade comum relatada por ele foi a de pseudosolução clara ou levemente turva de cloreto de prata, enxofre ou azul da Prússia. No final do século XIX, Michael Faraday, estudando partículas coloidais de ouro, verificou que o sistema era termodinamicamente instável, classificando-o por esta razão como liofóbico ("aversão" pelo solvente). No entanto, percebeu que estes sistemas poderiam ser estabilizados cineticamente, permanecendo em suspensão por muitos anos. O termo colóide (cola, em grego) foi introduzido por Thomas Graham ainda no final do século XIX para descrever as pseudosoluções de Selmi. Tal escolha foi com base na ênfase na baixa taxa de difusão ou falta de cristalinidade do sistema. A baixa taxa de difusão se caracteriza pelo fato das partículas serem suficientemente largas (pelo menos 1 nm). Por outro lado, para as partículas não sedimentarem sob ação da gravidade devem ter um limite de tamanho de aproximadamente 1 μm . Esta definição é amplamente aceita até os dias atuais (EVANS e WENNERSTRÖN, 1994). Dessa forma, sistemas coloidais são definidos como "sistemas nos quais um ou mais componentes apresentam pelo menos uma das dimensões entre 1 nm e 1 μm " (SHAW, 1992).

Um grande número de sistemas é classificado como coloidal, tais como: fumaças, aerossóis, dispersões de partículas, soluções e misturas de polímeros, espumas etc.

Uma característica comum dos sistemas coloidais é a grande área interfacial em relação ao volume da partícula (como consequência da faixa de tamanhos nanométrica). Essas interfaces são geralmente regiões de alta energia livre e onde muitos fenômenos como adsorção ocorrem, de maneira que as propriedades de superfície dominam o comportamento de sistemas coloidais. Desta forma, o estudo de colóides inclui o estudo de superfícies e interfaces, sendo importante definir conceitos básicos como tensão superficial ou energia livre de superfície (ADAMSON e GAST 1997).

I.4.2 Tensão Superficial

A tensão superficial, γ , tem origem nas interações intermoleculares, as quais diferem no interior em relação à superfície. Na água, por exemplo, as moléculas do interior fazem até quatro ligações de hidrogênio. Na interface, no entanto, o número de moléculas vizinhas é reduzido e uma forma de se compensar a “quebra” dessas ligações de hidrogênio é minimizar a área interfacial para a menor possível. Como a esfera é a figura geométrica que apresenta menor área para determinada massa, as superfícies dos líquidos tendem a esta forma geométrica, através da qual podemos definir outras características importantes de química coloidal como, por exemplo, o ângulo de contato (HIEMENZ e RAJAGOPALAN, 1997).

O trabalho requerido, W , para o transporte de moléculas do interior para a superfície, ou seja, aumento da área superficial (ΔA) pode ser expresso por:

$$W = \gamma \Delta A \quad (\text{I.1})$$

De maneira que, a tensão superficial ou energia livre de superfície pode ser definida como o trabalho necessário para aumentar uma unidade de área de uma superfície de maneira isotérmica e reversível, podendo ser expressa como energia por área (equação I.1) ou força por comprimento (Equação I.2, Figura I.3):

$$F = \gamma l \quad (\text{I.2})$$

onde F = força, γ = tensão superficial (interfacial) e l = comprimento.

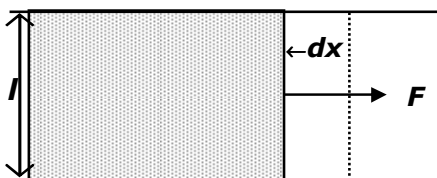


Figura I.3: Representação da expansão, dx , de um filme através da força F aplicada em um fio metálico de comprimento l .

Assim, o trabalho reversível dW pode ser descrito como:

$$dW = Fdx = \gamma 2l dx = \gamma dA \quad (I.3)$$

O trabalho reversível de aumento de área contribui para o aumento da energia livre de Gibbs diferencial, dG , podendo ser descrito do ponto de vista da termodinâmica como:

$$dG = \gamma dA \quad (I.4)$$

onde,

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{P,T} \quad (I.5)$$

Essa expressão deduz a tensão superficial como um aumento da energia livre por aumento de unidade de área.

Como consequência da tensão superficial, sempre que há uma interface curva, ocorre uma diferença de pressão (ΔP) através da interface, a qual é dependente apenas da tensão superficial e dos raios de curvatura, R (equação de Young-Laplace:

$$\Delta P = \gamma(1/R_1 + 1/R_2) \quad (I.6)$$

Em esfera:

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{R} \quad (I.7)$$

(EVANS e WENNERSTRÖN, 1994; ADAMSON e GAST, 1997).

I.4.3 Estabilidade Coloidal

Os sistemas coloidais liofílicos (afinidade pelo solvente) são considerados estáveis termodinamicamente. Esses sistemas se formam espontaneamente como é o caso de polímeros solúveis em água e microemulsões. Nas microemulsões (gotículas menores do que 100 nm), o aumento na energia livre, causado pela tensão superficial (pequena), é compensado pelo aumento da entropia do sistema.

Os sistemas coloidais liofóbicos, no entanto, não são estáveis termodinamicamente, sendo que possuem apenas uma estabilidade cinética também chamada de estabilidade coloidal. Exemplos desses sistemas são as nanoemulsões (entre 100 nm e 1 μ m) e dispersões de partículas em um meio imiscível como metálicas ou poliméricas em fase aquosa.

Nos sistemas liofóbicos, as partículas menores formam partículas maiores espontaneamente ou mesmo separação das fases dependentemente do tempo. Os fenômenos que normalmente ocorrem são denominados coalescência ou agregação. Na coalescência, ocorre fusão entre partículas (diminuindo a área superficial). Na agregação, as partículas se unem diminuindo a área superficial apenas em alguns pontos formando agregados parecidos com “cachos de uva”, os quais muitas vezes também são chamados de coagulação.

A estabilidade coloidal é geralmente estudada pela teoria DLVO (Derjaguin e Landau, Verwey e Overbeek) as quais preconizam que a agregação de partículas é dependente apenas das forças atrativas de van der Waals e repulsão eletrostática. A repulsão eletrostática é devida à dupla camada elétrica formada em sistemas coloidais a partir de cargas na superfície ou por íons adsorvidos da solução.

A energia potencial total (ΔG_T) através da soma dos potenciais de atração (ΔG_A) e repulsão (ΔG_R) pode ser descrita por:

$$\Delta G_T = \left[\left(\frac{64c_0 kT}{\kappa} \right) \exp(-\kappa H) \right] - \frac{A_H}{(12\pi H^2)} \quad (I.8)$$

Onde c_0 é a concentração da suspensão, k é a constante de Boltzmann, T = temperatura absoluta da dispersão, κ é dependente da concentração de íons, H é a distância de separação entre as partículas. No segundo termo (atração), A_H é a constante de Hamaker, a qual é relacionada com a contribuição da energia livre de superfície do líquido da dispersão (MYERS, 1999; ADAMSON e GAST, 1997). Como consequências diretas da teoria DLVO:

- quanto maior o potencial de superfície das partículas (na dupla camada elétrica), maior a repulsão entre as partículas;
- quanto menor a concentração de eletrólito no meio, maior a distância da superfície anterior a diminuição da repulsão;
- quanto maior a constante de Hamaker (A_H), maior a atração entre as partículas (HIEMENZ AND RAJAGOPALAN, 1997).

Uma contribuição adicional da teoria DLVO é que sob certas condições, os colóides podem sofrer floculação reversível devido à possibilidade da existência de um mínimo primário. A Figura I.4 ilustra a aplicação da teoria DLVO.

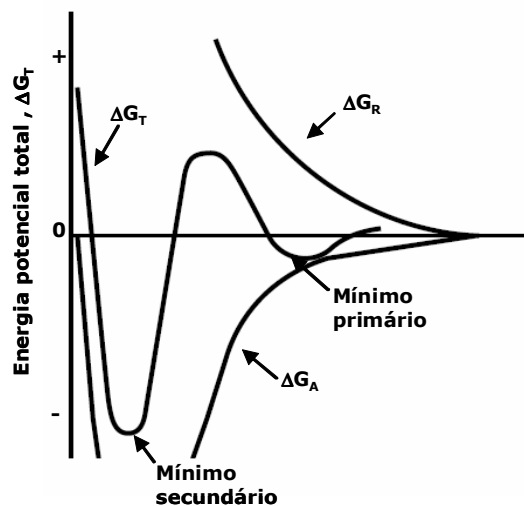


Figura I.4: Ilustração da estabilidade coloidal de um sistema a partir da teoria DLVO (adaptado de Myers, 1999).

A teoria descrita acima descreve sistemas em que a estabilidade é referente à dupla camada elétrica (estabilização por cargas). No entanto, outra forma de mecanismo de estabilização é através da adição de um colóide liofílico, por exemplo, polímeros, os quais são adsorvidos ou ligados em superfície de partículas. Esse tipo de estabilização é denominado estabilização estérica ou entrópica. O mecanismo de estabilização estérica consiste no efeito do aumento da concentração local das moléculas adsorvidas na superfície com a aproximação das partículas de maneira que perdem graus de liberdade pelo aumento das interações, além de ocasionarem um efeito osmótico. Dessa forma, ocorre diminuição da entropia do sistema, além de uma contribuição entálpica devido à dessolvatação (maior empacotamento das moléculas). Para restabelecer a entropia do sistema, o solvente age na solvatação, ou seja, separação das partículas. A resultante é uma barreira energética que diminui a aproximação das partículas, sendo que neste caso, as principais componentes no sistema são efeito estérico (osmótico) e a força atrativa de van de Waals (MYERS, 1999).

Dessa forma, para aumentar a estabilidade coloidal, minimiza-se a atuação da força de van de Waals pela introdução de moléculas com carga na superfície (aumento da repulsão eletrostática), emprego de cadeias poliméricas (efeito estérico) ou aumento da camada de hidratação (aumento da distância entre as partículas) (DHONT, 1996).

Os aspectos mencionados nesse capítulo evidenciam que sem dúvida de química coloidal é fundamental para o entendimento das nanopartículas poliméricas na maioria dos aspectos (obtenção, estrutura, estabilidade e propriedades). A química coloidal é hoje um tópico essencial para um entendimento básico da nanotecnologia.

I.5 Nanopartículas Poliméricas: Características e Obtenção

Os métodos de preparação dos sistemas de nanopartículas poliméricas, geralmente são divididos em duas categorias (COUVREUR e col., 1996; SOPPIMATH e col., 2001): i) polimerização de monômeros, ii) a partir de macromoléculas ou polímeros pré-formados.

No primeiro caso, a partir da polimerização de monômeros, o método apresenta limitações para uso fisiológico, podendo citar: i) a maioria dos monômeros pode levar a uma polimerização micelar em fase aquosa gerando polímeros não biodegradáveis ou de degradação lenta; ii) dificuldade na purificação das partículas formadas quanto à eliminação de resíduos da polimerização, normalmente, com alto grau de toxicidade, como monômeros, oligômeros, solvente orgânico, iniciadores de polimerização e tensoativos; iii) caso a droga seja introduzida nas nanopartículas durante sua formação, pode haver interação entre monômero e droga, de maneira que esta seja desativada.

Devido a essas limitações, os métodos de preparação empregados na obtenção das nanopartículas poliméricas como carreadoras de fármacos, geralmente pertence à categoria de obtenção a partir de polímeros pré-formados.

Os polímeros comumente empregados nessas preparações são poliésteres como o poli(lactídeo) (PLA), poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV), poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL), os quais apresentam boa histocompatibilidade, biodegradabilidade, e produtos de degradação não-tóxicos (QUINTAR-GUERRERO, 1998). No caso, de aplicações em cosméticos, além dos polímeros mencionados é comum o emprego dos biocompatíveis como a poliacrilamida e o polimetilmetacrilato (PMMA).

Devido ao aumento da área superficial pela redução dos diâmetros, ocorre um aumento da energia livre do sistema o que favorece a coalescência

das partículas. Dessa forma, o uso de estabilizantes, tipicamente entre 0,2 e 2% (w/w), é comumente necessário para aumentar a estabilidade física das partículas. (LEGRAND e col., 1999; QUINTAR-GUERRERO e col., 1998). Dentre os estabilizantes mais empregados, destaca-se o álcool polivinílico (PVA) que, no entanto, tem seu uso restrito pela FDA, não podendo ter aplicação intravenosa. Os polaxamers, também conhecidos como Pluronic, são amplamente empregados, pois apresentam baixa citotoxicidade. Os polissorbatos (Tweens e Spans), permitidos pela FDA, são surfactantes não iônicos, encontrando-se nesta classe surfactantes que podem ser solubilizados na fase aquosa ou orgânica (QUINTAR-GUERRERO e col., 1998).

Conforme mencionado no item I.1, as nanopartículas poliméricas podem apresentar-se como nanocápsulas (sistema reservatório) ou nanoesferas (matriz polimérica). As nanocápsulas apresentam como principal vantagem uma maior quantidade de droga incorporada em relação às nanoesferas. O núcleo é formado por um óleo solubilizando o ativo geralmente inerte, como o Miglyol 810 ou Miglyol 812® (QUINTAR-GUERRERO e col. 1998; GUTERRES e col., 2007; SCHAFFAZICK e col., 2003). No entanto, em princípio, outros óleos podem ser empregados no núcleo oleoso, desde que o polímero da parede das nanocápsulas não seja solúvel no óleo (ALMEIDA e col., 2009).

Os métodos de preparação de nanopartículas a partir de polímeros pré-formados podem ser classificados nas categorias: emulsificação/evaporação de solvente, emulsificação espontânea/difusão de solvente, nanoprecipitação, *saulting-out* e emulsificação/difusão de solvente. Estas técnicas são similares em termos de solução orgânica contendo os componentes das nanopartículas como uma fase interna durante a preparação e uma fase aquosa contendo estabilizadores que atuam como o meio de dispersão das nanopartículas.

I.5.1 Nanoprecipitação e Deposição Interfacial

O método de preparação de partículas de interesse neste trabalho, nanoprecipitação, foi primeiramente descrito e patenteado por FESSI e col. (1987). Neste processo, polímero, droga e opcionalmente um estabilizante

lipossolúvel são solubilizados em um solvente orgânico miscível em água, normalmente acetona ou etanol. Esta solução é vertida ou adicionada na fase aquosa contendo um estabilizante (por exemplo, PVA ou polaxamer 188) sob agitação magnética. As nanopartículas são formadas pela rápida difusão do solvente. Conforme o solvente se difunde para a água, carrega algumas cadeias poliméricas que ainda permanecem em solução. Na difusão contínua do solvente, as cadeias poliméricas se agregam formando as nanopartículas. A Figura I.5 esquematiza a obtenção das nanopartículas por esta técnica.

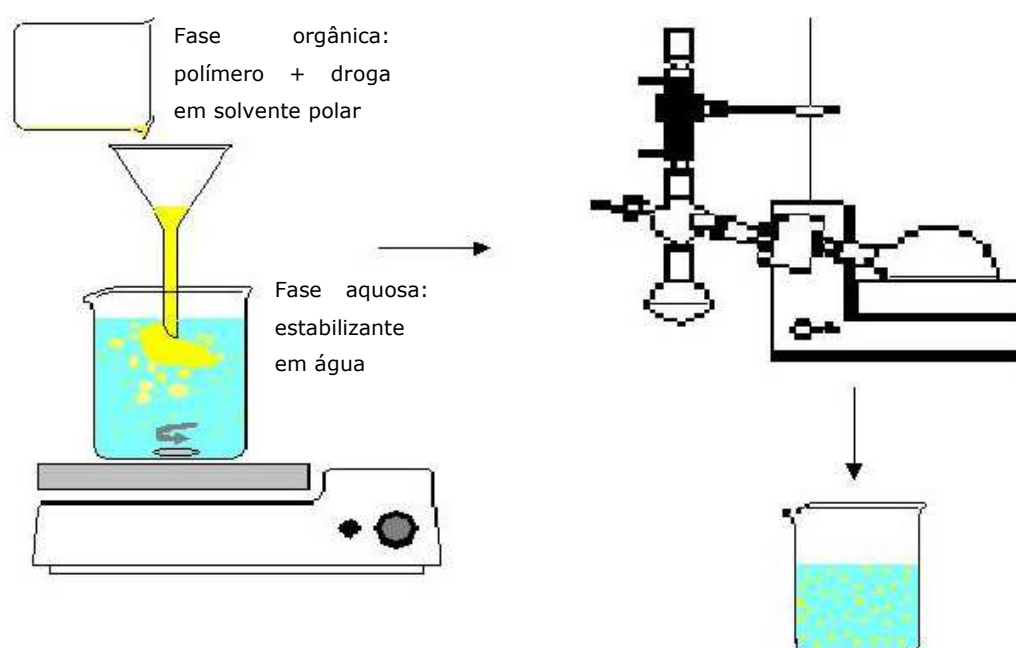


Figura I.5: Representação esquemática da obtenção de partículas pela técnica de nanoprecipitação.

O mecanismo de formação das nanopartículas por esta técnica tem sido sugerido em termos de turbulência interfacial gerada durante a difusão do solvente. Uma forte turbulência é observada devido à miscibilidade mútua entre os solventes. Gotas de solvente, provavelmente em tamanhos nanométricos são produzidas a partir da interface. A energia necessária para estes movimentos compulsivos vem da energia livre liberada conforme o solvente é redistribuído para seu estado de equilíbrio. O mecanismo molecular

da turbulência interfacial pode ser explicado pela formação de remoinhos de solvente na interface. Cada remoinho pode ser originado durante a formação da gota ou de gradientes de temperatura no sistema. Assim, uma vez que o processo tem início, movimentos associados com pulsações irregulares prévias mudam a pressão da fase orgânica pelo aumento da pressão de superfície ou diminuição da tensão interfacial. Desse modo, se as gotas de solvente formadas contêm polímeros, os mesmos tenderão a se agregar e formar as nanopartículas devido à contínua difusão do solvente e a presença de um não solvente (QUINTAR-GUERRERO, 1998).

Esta técnica permite a obtenção de nanocápsulas, neste caso o termo mais apropriado para denominar o método de preparação é: deposição interfacial de polímero pré-formado. Quando o solvente difunde-se para o não-solvente, o polímero, insolúvel tanto no não-solvente quanto no núcleo oleoso, é dissolvido na interface desses dois componentes imiscíveis, formando a membrana das nanocápsulas. Tal método demonstra a possibilidade do polímero em atuar como barreira e estabilizar a emulsão formada pelo material no núcleo oleoso. Nestas preparações, os seguintes aspectos devem ser considerados: i) o óleo não pode ser solúvel no polímero, ii) deve ser um bom solvente para a droga de maneira a prevenir “vazamento” da droga e reduzir sua cristalização espontânea durante a preparação (QUINTAR-GUERRERO, 1998).

Em suma, as principais variáveis nas preparações por nanoprecipitação ou deposição interfacial são: a concentração do polímero na fase orgânica, surfactante empregado e parâmetro de solubilidade do solvente orgânico em água. Com relação a aspectos de preparação, vários estudos foram realizados nos últimos anos.

Nanocápsulas de PCL contendo o fotoprotetor metoxinamato de octila (OMC) foram obtidas variando-se a velocidade de agitação, concentração de polímero, tipo de surfactante hidrofílico e volume de fase orgânica. Neste estudo, as variáveis significativas foram: o tipo de surfactante hidrofílico e volume da fase orgânica, sendo que se mostraram mais eficientes Tween 80

em relação ao Pluronic F68 e um maior volume de fase orgânica empregada (JIMÉNEZ e col., 2004b).

Outro estudo na obtenção de nanocápsulas poliméricas no encapsulamento de OMC variando a razão óleo:polímero (m/m) evidenciou por comparação de densidades, a formação de nanocápsulas preferencialmente na razão 2,5:1,0 em relação as razões 1,0:1,0 e 4,0:1,0. Nesta última proporção, verificou-se a formação de nanoemulsões em coexistência com as nanocápsulas (OLVERA-MARTÍNEZ e col., 2005).

A organização dos componentes das nanocápsulas ao nível molecular foi proposta para o sistema com PCL, triglicerídeo capríco/caprílico (Miglyol ®), monoestearato de sorbitan (Span 60) e Tween 80 (MÜLLER e col, 2001). As curvas de DSC mostraram picos de fusão do polímero com ausência do pico de Span 60 e do Tween 80. O pico de fusão do óleo, no entanto, apresentou um decréscimo significativo, indicando que o Span 60 é dissolvido na fase oleosa e que o polímero provavelmente forma uma parede para este núcleo oleoso. Tal modelo foi confirmado por análises de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) (CRUZ e col., 2006a,b).

O uso de uma sonda fluorescente sensível a ambientes polares e apolares, quimicamente ligada ao polímero, evidenciou que de fato o polímero é depositado na interface água/óleo, formando a parede das nanocápsulas, além de interagir com as fases aquosa e oleosa em nível molecular. Além disso, estudos de estabilidade indicaram que a água aumenta sua interação com a parede polimérica em função do tempo (JÄGER e col., 2007).

Preparações de nanocápsulas de PLA foram investigadas quanto à morfologia por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), densidade em gradiente em Percoll®, tamanhos de partícula e potencial zeta. As variáveis empregadas foram o tipo de óleo, massa molar polimérica, tipo e concentração de surfactantes. O principal aspecto concernente a este trabalho foi que dependentemente da preparação, não somente nanocápsulas são obtidas, mas também nanoesferas e nanoemulsões, bem como lipossomas (empregando lecitina de soja). A quantidade de lipossomas formada foi avaliada através do

encapsulamento de uma sonda fluorescente hidrofílica (MOSQUEIRA e col., 2000).

Quanto a medidas da espessura da parede polimérica em nanocápsulas, as técnicas de FFEM e SANS têm sido sugeridas para obtenção deste tipo de informação. Para as nanocápsulas utilizando Mygliol® (núcleo) e poly(D,L-lactídeo), além de Polaxamer 188, as espessuras de parede polimérica obtidas por SANS e FFEM foram 9,8 e 10 nm, respectivamente (RÜBE e col., 2005). Este sistema não empregou, no entanto, surfactante lipofílico.

Nas formulações das nanocápsulas, além de um surfactante hidrofílico, emprega-se um surfactante lipofílico. Na verdade, a presença de tensoativos não é um fator primordial na formação dos sistemas coloidais por este método, uma vez que estes se formam espontaneamente. Eles conferem maior estabilidade, prevenindo a agregação com o passar do tempo (estabilidade cinética). Estudos mostraram que formulações preparadas com apenas um dos tensoativos sedimentaram e formaram agregados não redispersíveis (FESSI e col., 1989). O tensoativo lipofílico é importante para a obtenção de partículas com distribuição de tamanho estreita. A sedimentação das partículas e a passagem da substância ativa para o meio aquoso dispersante são evitadas pela presença do tensoativo lipofílico na formulação (GUTERRES e col., 1995).

I.6 Propriedades e Características dos Bioativos

O composto de interesse, palmitato de retinila, foi escolhido dentre ativos com possível atuação como produtos antirrugas, sugerida através de dados da literatura. Em associação com o palmitato de retinila, como moléculas modelo, empregou-se um outro ativo com potencial antirrugas, a baicaleína, e um fotoprotetor, a benzofenona-3.

Os fatores que comumente causam envelhecimento da pele humana são: i) a radiação UV proveniente do sol (fotoenvelhecimento) e ii) mudanças nas quais os processos degenerativos excedem aos processos regenerativos. O envelhecimento cutâneo é caracterizado por um menor espessamento,

enrugamento, rachaduras e sulcos na epiderme, principalmente acentuados em linhas de expressão facial. A razão das alterações morfológicas aparentes na superfície da pele é o resultado de mudanças na derme, caracterizadas por perdas, especialmente, de fibras de colágeno e elastina, ocasionando menor suporte para as camadas epidérmicas e diminuição da perfusão circulatória. Verdadeiros compostos antirrugas devem atuar diminuindo as perdas dérmicas, ou seja, no balanço regenerativo/degenerativo, exemplificado pelo aumento da síntese ou proteção de colágeno e elastina (ABURJAI e NATSHET, 2003).

O palmitato de retinila tem a função de armazenamento de vitamina A (retinol), facilitando suas funções e absorção. Os retinóides são essenciais para a manutenção da diferenciação epitelial, possuem um papel importante na prevenção de carcinogênese, além de terem propriedade antioxidante. Além disso, a vitamina A e seus derivados também regulam e controlam outras diversas funções fisiológicas, como visão, crescimento, reprodução e atividade anti-tumoral (DRABENT e col., 1997). A radiação UV, proveniente do espectro solar, normalmente ocasiona hipovitaminose (SORG e col., 2001). A interferência nesta deficiência é um dos conceitos para a prevenção de câncer e envelhecimento cutâneo (SAURAT, 2001). O palmitato de retinila vem sendo amplamente empregado em formulações cosméticas devido ao fato de ser a forma mais estável de ésteres retinólicos de vitamina A (BOEHNLEIN e col., 1994). Na tentativa de se aumentar a permeação do palmitato de retinila e vitamina A em camadas mais profundas da pele, há na literatura trabalhos envolvendo a obtenção de palmitato de retinila encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) (JENNING e col., 2000) em que se avaliou a permeação cutânea, dosando por HPLC. Um dos métodos de determinação do palmitato de retinila é por fluorescência com comprimentos de onda de excitação entre 320 e 370 nm com emissão entre 491 e 514 nm (DRABENT e col., 1997).

A Baicaleína, 5,6,7-triidroxiflavona, juntamente com outros flavonóides como baicalina, wogonina e wogonosídeo originalmente obtidos da raiz da planta *Scutellaria baicalensis*, apresenta especialmente atividade de eliminação de radicais livres. Estes quatro flavonóides principais da raiz da escutelária

(*Scutellaria baicalensis*) foram examinados em diferentes sistemas, tais como: varredura de radical hidroxílico, extinção de radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de radical alquílico e danos de célula SH-SY5Y induzidas por H₂O₂. Os testes empregados mostraram que tais flavonóides, especialmente a baicaleína e baicalina, podem ser usados para curar danos associados à ação de radicais livres (KLEIN e col., 2003). A proteção celular de neuroblastomas humanos SH-SY5Y, em relação a espécies reativas de oxigênios como peróxido de hidrogênio, hidroperóxido terc-butílico e ânion superóxido, foi mais efetiva pela baicaleína do que por baicalina, wogonina, wogonosídeo e quercetina (GAO e col., 1999). A atividade celular dos fibroblastos gengivais foi notadamente aumentada (40 %) pela baicaleína e, fracamente, pela baicalina e pela wogonina. De acordo com a ativação celular, os flavonóides aumentaram a síntese tanto de colágeno quanto de proteínas totais em fibroblastos, em contraste aos fatores de crescimento que aumentaram somente a síntese de proteínas totais (CHUNG e col., 1995). As propriedades antioxidantes do extrato de escutelária também podem estar relacionadas, em parte, à sua atividade antiinflamatória. De fato, em diferentes modelos experimentais foi demonstrado que extratos de escutelária possuem esta atividade (PO e col., 2002; GAO e col., 1998).

O outro ativo empregado nesse trabalho, a benzofenona-3 (BZ3), é um dos fotoprotetores mais empregados, sendo encontrada em concentrações de até 6% em formulações associada ou não a outros fotoprotetores, além de ser empregada como estabilizante cosmética (até 0,5%) (PADULA e col., 2008). No entanto, a BZ3 apresenta como uma desvantagem, uma alta permeação cutânea (forma livre), sendo encontrada no leite materno e na urina após aplicação na pele (JANJUA e col., 2008). Alguns trabalhos têm focado a diminuição da permeação da BZ3 na pele (LUPPI e col, 2004; SIMEONI e col., 2006). Por exemplo, um sistema do tipo hospedeiro-convidado foi empregado através da complexação da BZ3 em ciclodextrinas, sendo que a sulfobutil(éter)- β -ciclodextrina apresentou melhor resultado quanto a diminuição da permeação cutânea, além de diminuir a exposição da droga diretamente com a pele, reduzindo o efeito tóxico (SIMEONI e col. 2006). Cabe

mencionar, que a benzofenona-3 e a baicaleína foram empregadas como moléculas modelo no carregamento de demais ativos nas nanocápsulas de palmitato de retinila.

II OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consistiu na obtenção de um sistema polimérico nanoestruturado carreador de bioativos com relevante interesse científico e tecnológico, além uma investigação do mecanismo de penetração de nanopartículas na pele.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Escolha do polímero biodegradável e estudo das variáveis no método de nanoprecipitação.
- Funcionalização do polímero PLA com a molécula azul do Nilo.
- Preparação de nanocápsulas de palmitato de retinila.
- Caracterização das nanopartículas quanto à morfologia, quantidade total encapsulada, distribuição de tamanho de partículas e potencial zeta.
- Avaliação da citotoxicidade e fototoxicidade das nanoestruturas obtidas em fibroblastos e queratinócitos.
- Estudo da estabilidade física e química das nanopartículas.
- Obtenção de nanocápsulas de palmitato de retinila no carregamento de bioativos (baicaleína e benzofenona-3).
- Avaliação das propriedades térmicas das partículas por DSC.
- Estudo de liberação *in vitro*.
- Ensaios de extrusão em membranas sintéticas de policarbonato.
- Obtenção e caracterização de formulação semi-sólida.

- Avaliação da permeação de nanoesferas e nanocápsulas em pele humana abdominal, doada de cirurgia plástica, através da técnica de microscopia de varredura a laser confocal (CLSM) e dosagem por HPLC.

III PARTE EXPERIMENTAL

III.1 Reagentes Utilizados

A Tabela III.1 apresenta as procedências dos reagentes utilizados, os quais foram empregados sem purificação adicional. As fórmulas estruturais são apresentadas no Anexo (destacadas em negrito), juntamente com as estruturas químicas dos demais compostos mencionados no decorrer da Tese.

Tabela III.1: Procedência dos reagentes utilizados.

Reagente	Procedência	Massa Molar
Palmitato de retinila (palmitato de vitamina A)	Sigma	524,89
Baicaleína	Sigma	270,24
Benzofenona-3 (filtro UV)	Delaware	228,24
Poli(D,L-lactídeo) (PLA)	Sigma	75000-120000
Poli(ε-caprolactona) (PCL)	Sigma	~65000
Tinogard Q (filtro Químico)	Ciba	-
Anfotericina B (Fungizona)	Sigma	924,08
Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	Sigma	389,38
Tween 80 (monooleato de sorbitan)	Oxiten	~1300
Pluronic F 68 (Poloxamer 188)	Aldrich	8400
Polioxietilenoglicol 8-lauril (PEG-8L)	Lipo Chemicals	552
Poli(vinil)álcool (PVA)	Sigma	30000-70000
Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico (MTT)	Sigma	414,32
Cloridrato de 3-amino-7- dimetilamino-2-metilfenazina (VN)	Sigma	288,78
Acetato de uranila di-hidratado	Sigma	424,15
Azul do Nilo (cloreto) (AN)	Sigma	353,85
N-hidroxisuccinimida (NHS)	Sigma	115,10
Carbopol 940 (polímero de ácido acrílico)	BFGoodrich	-
Trietanolamina	Sigma	149,19
Dicicloexilcarbodiimida (DCC)	Fluka	206,32
Span 60 (Monoestearato de sorbitan)	Oxiten	430,62

III.2 Metodologia

III.2.1 Teste de Inchamento e Dissolução dos Polímeros

Filmes dos polímeros PCL e PLA foram obtidos através da utilização de uma prensa hidráulica, durante cerca de 5 minutos a 60 °C. Para cada experimento um filme de cerca de 150 mg foi colocado em contato com o óleo palmitato de retinila (PR) em quantidade suficiente para cobrir os filmes poliméricos, em frascos de vidro âmbar. Os frascos foram fechados e mantidos a temperatura ambiente por um total de 24 dias. Após 2, 4, 9, e 24 dias os filmes foram afastados do contato com o óleo, e este por sua vez retirado do óleo suavemente com um papel absorvente e, posteriormente pesados com a finalidade de verificar se houve alguma alteração na massa destes filmes. Após a pesagem os filmes foram novamente colocados em contato com o óleo. As análises foram realizadas em triplicata (GUTERRES e col., 2000).

III.2.2 Estudo de Algumas Variáveis de Preparação no Método de Nanoprecipitação

Foi realizado um planejamento fatorial 2^{5-2} para investigação de algumas variáveis na obtenção de partículas de PLA pelo método de nanoprecipitação (Tabela III.2).

Tabela III.2: Variáveis empregadas no planejamento 2^{5-2} .

	Variáveis	Nível (-)	Nível (+)
1	Forma de agitação	Magnética moderada	Mecânica 300 rpm
2	Solvente	15 mL de acetona	15 mL de acetona + 10 mL de etanol
3	Massa de polímero	50 mg	100 mg
4	Tipo de estabilizante	Pluronic F68	Poli(vinil)álcool
5	% surfactante	0,7	2

A partir destas variáveis, construiu-se a Tabela de planejamento 2^{5-2} (Tabela III.3), que deram origem a 8 ensaios realizados (BARROS NETO e col., 2002).

Tabela III.3: Planejamento Fatorial 2^{5-2} empregado na obtenção de partículas pelo método de nanoprecipitação.

Ensaio	Variáveis				
	1 forma de agitação	2 solvente	3 massa de polímero	4 surfactante	5 % surfactante
1	-	-	-	-	+
2	+	-	-	+	-
3	-	+	-	+	-
4	+	+	-	-	+
5	-	-	+	+	+
6	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-
8	+	+	+	+	+

Cabe mencionar que os ensaios foram feitos em ordem aleatória para se minimizar o efeito de erros sistemáticos. Tais ensaios foram realizados, adicionando-se a fase orgânica contendo polímero (PLA) e solvente orgânico (acetona ou acetona/etanol) em 40 mL de fase aquosa contendo surfactante com o auxílio de funil. Após a adição, manteve-se a suspensão sob agitação por 5 minutos. Eliminou-se o solvente orgânico em rotaevaporador. A suspensão resultante foi centrifugada a 15000 rpm por 40 min, descartando-se o sobrenadante e lavando as partículas com 10 mL de água deionizada. As partículas foram novamente centrifugadas o excesso de sobrenadante foi eliminado, sendo que o *pelet* formado foi ressuspendido com 10 mL de água deionizada, sendo que 5 mL foram, a seguir, liofilizados.

III.2.3 Obtenção do Derivativo Polimérico Fluorescente: Poli(D,L-Lactídeo)-Azul do Nilo (PLA-AN)

A funcionalização polimérica foi realizada segundo adaptação da metodologia descrita por WEISSEBOECK e col. (2004) que consiste na ligação entre o grupo amina do composto fluorescente e o grupo carbonila do polímero. Em um balão de fundo redondo de 50 mL, foram adicionados 1 g ($1,08 \cdot 10^{-5}$ mol) de PLA e 10 mL de acetonitrila. Resfriou-se esta solução a 0 °C e adicionaram-se 20 mg ($1,62 \cdot 10^{-4}$ mol) de N-hidroxisuccinimida (NHS) solubilizados em 4 mL de acetonitrila. A seguir, foram adicionados 24 mg ($1,15 \cdot 10^{-5}$ mol) de dicicloexilcarbodiimida (DCC) solubilizados em 4 mL de acetonitrila. Manteve-se esta solução sob agitação por 3 h. Após este período retirou-se o banho de gelo e à temperatura ambiente, foram adicionados 70 mg ($1,7 \cdot 10^{-4}$ mol) de azul do Nilo em 4 mL de acetonitrila. Manteve-se esta reação sob agitação magnética vigorosa e ao abrigo de luz sob atmosfera de argônio por 24 h. A solução passa de azul para violeta.

Para purificação do derivativo polimérico formado, evaporou-se o solvente da reação em rotaevaporador, ressuspendendo a seguir com 10 mL de clorofórmio. Em um funil de separação, lavou-se a fase orgânica 5 vezes com porções de 10 mL de HCl 1 mmol L⁻¹, seguidas de 5 vezes com porções de água deionizada. Precipitou-se o polímero pela adição da solução em 200 mL de etanol a 0 °C. Para total sedimentação polimérica, centrifugou-se esta suspensão a 15000 rpm por 15 min. O precipitado formado foi lavado com água deionizada, congelado em N_{2(l)} e liofilizado.

A massa molar polimérica foi determinada pela técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC) em equipamento Agilent 1100 sob fluxo isocrático de 0,7 mL min⁻¹ de tetraidrofurano, detector de espalhamento de luz a laser multiângulo Dawn EOS, Optilab DSP refratômetro, em coluna Ultrastyrigel 103 Å, 7.8x300 mm Waters. A temperatura foi mantida a 30 °C no detector e na coluna. A calibração foi realizada com padrões de poliestireno.

III.2.4 Preparação das Nanopartículas

A Tabela III.4 apresenta as formulações de nanocápsulas (NC), nanoesferas (NS), nanoemulsões (NE) e vesículas de surfactantes (NI) estudadas. As nanocápsulas foram obtidas pelo método de nanoprecipitação, que nesse caso é denominado deposição interfacial de polímeros pré-formados (FESSI e col.,1987). Uma fase orgânica (15 mL de acetona e 5 mL de etanol), contendo de palmitato de retinila, 30 mg de monoestearato de sorbitan (Span 60) e 50 mg de PLA, foi adicionada a fase aquosa (40 mL) contendo 1% (m/v) em relação ao volume final de surfactante hidrossolúvel (Tween 80 ou Pluronic F68). A suspensão foi mantida sob agitação magnética por 10 min. A seguir, evaporou-se o solvente orgânico e reduziu-se o volume da suspensão a baixa pressão para 10 mL. A formulação foi intitulada NC. Para estudos de estabilidade, foram adicionadas 10 µL de Tinogard Q ® a fase aquosa e 0,1% de 3,5-di-terc-butil-4-hidroxi-tolueno (BHT) a fase orgânica. Além disso, após o preparo das NC, adicionou-se um fungicida, anfotericina B (1 ng mL⁻¹). Esta formulação foi intitulada como NCEST

Tabela III.4: Formulações de NC, NS, NE e NI.

Nomenclatura	PLA / mg	Span 60 /mg	Formulação		Ativo (Bai ou BZ3) / mg
			PR / mg (óleo:polímero)	Pluronic F68 ou Tween 80 (mg)	
NC_A	50	30	100 (2:1)	100	-
NC1	50	30	125 (2,5:1)	100	-
NC2 (= NC)	50	30	150 (3:1)	100	-
NC3	50	30	175 (3,5:1)	100	-
NS	50	30	-	100	-
NE	-	30	150 (3:1)	100	-
NI	-	30	-	100	-
NCBAI	50	30	150 (3:1)	100	5
NSBAI	50	-	-	100	0,5
NCBZ3	50	30	150 (3:1)	100	5
NSBZ3	50	-	-	100	0,5

Formulações sem palmitato de retinila foram obtidas para algumas análises, sendo denominadas nanoesferas, NS. Algumas análises também

foram realizadas com nanoemulsões (NE, preparação sem a adição de polímero) e vesículas de surfactantes, niossomas (NI, sem a adição de polímero e óleo). Para o encapsulamento de demais ativos (baicaleína, BAI ou benzofenona, BZ3) nas NC ou NS, o ativo foi adicionado à fase orgânica.

III.3 Caracterização

III.3.1 Eficiência de Encapsulamento

A eficiência de encapsulamento foi avaliada através da quantidade livre de ativo encontrada no filtrado das nanopartículas pelo método de filtração/centrifugação em filtro Millipore Microcon 100kDa. Empregou-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em equipamento Shimadzu (detector SPD-M20A). As condições analíticas foram: 1) palmitato de retinila, coluna C18 Nova Pak Waters, 3,9 x 150 mm, fase móvel= 100% de metanol (MeOH), fluxo= 1 mL min⁻¹, λ = 325 nm; 2) benzofenona-3, coluna C18 Varian, 4,6 x 250 mm, fase móvel = MeOH:H₂O(ácido acético 1%) 70:30, fluxo= 1 mL min⁻¹, λ = 289 nm; 3) baicaleína, coluna C18 Varian, 4,6 x 250 mm, fase móvel = MeOH:H₂O(ácido acético 2%) 70:30, fluxo= 1 mL min⁻¹, λ = 320 nm.

III.3.2 Distribuição de Diâmetros e Potencial Zeta

A distribuição de diâmetros de partículas foi avaliada por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) e o potencial zeta através da mobilidade eletroforética em KCl 1 mmol L⁻¹, ambas as técnicas em equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments).

III.3.3 Morfologia

Micrografias das partículas foram obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (SEM) em um equipamento Jeol JSM-6063LV,

utilizando-se detector de elétrons secundários. O excesso de surfactante das amostras foi removido por centrifugações (2 x 15000 rpm, 40 minutos). As amostras foram dispostas sobre porta-amostras de latão, secas ao ar e recobertas com Au/Pd, depositadas por um equipamento Balk-Tec MED 020.

Imagens por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) microscópio Carl Zeiss CEM902, operando a 80kV. A preparação da amostra consistiu na deposição de uma gota das suspensões de nanocápsulas (33 mg mL⁻¹ de sólidos) diluídas 50 vezes sobre um *grid* de cobre (400 mesh), contendo filme depositado de *Formvar*/carbono. Após 2 minutos, o excesso de fase aquosa foi removido por capilaridade através de um papel de filtro. A seguir, 1 gota de acetato de uranila 1% previamente filtrado foi adicionado e seu excesso removido após 1 minuto.

As nanocápsulas foram adicionalmente caracterizadas por TEM após fratura criogênica (FFEM). As réplicas foram obtidas após congelamento rápido em porta-amostras duplos de cobre, obtendo-se um filme de amostras em ambos os lados do porta-amostra (Bal-tec AG, BUO 12 055-T). A fratura das amostras foi realizada a -150 °C, sendo depositado um filme de platina/carbono em um equipamento Polaron E7500 em Polaron E6000 (Quorum Technologies). As réplicas foram recuperadas pela imersão das amostras durante 2 a 3 minutos em clorofórmio/metanol 2:1 v/v. As imagens foram obtidas em um microscópio de transmissão FEI Tecnai 12 TEM. As análises de FFEM foram realizadas no King's College London (UK).

III.3.4 Avaliação da Estabilidade Físico-Química

A avaliação da estabilidade foi realizada através da dosagem da quantidade total de palmitato de retinila por HPLC (dissolução de 100 µL de suspensão em 10 mL de acetato de etila, seguida de diluição 1:10 em acetonitrila), medidas de pH, distribuição de tamanhos e potencial zeta. Além disso, utilizou-se o equipamento Turbiscan LAb, a 30 °C por 24 h, que avalia fenômenos como floculação, cremagem ou sedimentação. O equipamento Turbiscan LAb utilizado foi do grupo da Profa. Sílvia Guterres na UFRGS.

III.3.5 Medidas de Densidade

As medidas de densidade das NC foram realizadas por método isopícnico em gradiente de Percoll® (partículas coloidais de sílica recobertas com polivinilpirrolidona), formado *in situ* sob centrifugação a 18 000 x g por 1 h. Nos tubos de centrifuga, foram adicionados 0,5 mL de suspensão de NC para 10 mL de Percoll. As densidades foram estimadas por comparação com o gradiente de Percoll contendo *beads* coloridos com densidades específicas.

III.3.6 Estudos de Citotoxicidade/Fototoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade e fototoxicidade foram realizados empregando-se culturas de queratinócitos humanos (HaCat) e fibroblastos de embriões de camundongos (BALB/c 3T3). As linhagens de fibroblastos foram adquirida do NIH (National Institute of Health-Baltimore, USA) e de queratinócitos humanos HaCaT, gentilmente foram cedidas pela Dra. Ludmila Kodach (Academic Medical Center, Amsterdam University). O ensaio de captação de vermelho neutro utilizando células de fibroblastos BALB/c 3T3 para avaliação da fototoxicidade é validado pela EU/COLIPA (European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association, Brussels, Belgium) (OECD Guideline) e apresenta correlação de cerca de 95 a 100% com os resultados obtidos *in vivo* (BENAVIDES e col., 2004).

As células BALB/c 3T3 e HaCaT foram cultivadas em meio DMEM e suplementadas com 15% e 10% de soro fetal bovino, respectivamente, e 1% de antibiótico. As células BALB/c 3T3 e HaCaT foram plaqueadas numa densidade de 1×10^5 células/mL e 7×10^4 células/mL, respectivamente, em 2 placas de 96 poços, incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 24 h (BORENFREUND e PUERNER, 1984). Para os ensaios de citotoxicidade, após esse período, o meio foi removido e os poços foram lavados duas vezes com PBS. As células foram tratadas com diferentes concentrações das formulações e incubadas por 24 h. A seguir, a proliferação celular foi avaliada através da redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico, para avaliação da função mitocondrial) e captação de vermelho neutro (VN: cloridrato de 3-

amino-7- dimetilamino-2-metilfenazina) para as formulações de estabilizantes (estudo preliminar) e nanopartículas, respectivamente. Os resultados foram expressos em relação ao controle (100%) e representam média $\pm$ desvio padrão de 2 experimentos independentes realizados em sextuplicata

Para os testes de fototoxicidade, após o período inicial de incubação das células plaqueadas supracitado (24 h a 37 °C e 5% CO₂), o meio foi removido e os poços foram lavados duas vezes com PBS. O tratamento foi feito em várias concentrações dos compostos testes (30 a 1150 $\mu\text{mol L}^{-1}$), sendo utilizado como controle positivo de fototoxicidade a hematoporfirina I $\square$ (HP) e negativo, a tiouréia. O tempo de tratamento foi uma hora. Posteriormente uma placa contendo as amostras foi exposta à radiação UVA, dose de 5 J cm⁻² (determinada com utilização de radiômetro - Cole Parmer, UVA - 365 nm), por 50 minutos utilizando uma lâmpada de UVA (Bellarium S 100 W - Wolff System - gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Francisco B. T. Pessine do Instituto de Química da Unicamp). Após exposição à radiação o meio foi removido, os poços foram lavados duas vezes com PBS, adicionado meio de cultura com soro e realizada incubação por 22 h (período de recuperação). Após esse período, o meio de cultura foi removido e em seguida avaliada a viabilidade celular pela captação do vermelho neutro Os resultados foram expressos em relação ao controle (100%) e representam média $\pm$ desvio padrão de 2 experimentos independentes realizados em triplicata (BORENFREUND e PUERNER, 1984; LASAROW e col., 1992). Estes ensaios foram realizados no laboratório da Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira do Instituto de Biologia da Unicamp.

III.3.7 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As medidas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram realizadas em um equipamento TA Instruments, modelo Q-10. Amostras de nanopartículas em suspensão concentradas (330 mg/mL) foram adicionadas a porta-amostras de alumínio. Cada gota foi seca sob capela de exaustão por 2 h. Na etapa final, evaporou-se a água residual em linha de vácuo dinâmico, obtendo-se massas finais entre 14 e 16 mg. Os porta-amostras foram fechados

e um fluxo de $N_{2(g)}$ no equipamento foi mantido a 50 mL min^{-1} . Empregou-se uma taxa de resfriamento de $5 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ da temperatura ambiente à $-3 \text{ }^{\circ}\text{C}$, seguida de isoterma por 5 min. A seguir, aplicou-se uma taxa de aquecimento de $5 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ a $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

III.3.8 Estudos de Liberação *in Vitro*

Nos ensaios de liberação *in vitro*, suspensões de nanopartículas ou ativo livre com massa equivalente a 0,5 mg de ativo foram colocados em tubos de diálises (membrana SpectraPor de celulose regenerada, corte de massa molar = 3,5 kDa). O volume interno dos tubos de diálises foram completados para 5 mL com PBS 20 mM, pH 7,4, contendo Tween 80 a 0,5%. A diálise foi realizada em um volume de PBS de 400 mL a 1000 rpm e $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Alíquotas de 3 mL foram retiradas após 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h, filtradas e analisadas por HPLC. Após a retirada de cada alíquota, o volume foi reposto pelo PBS.

III.3.9 Preparação e Caracterização de Formulações Semi-Sólidas

As suspensões de nanopartículas foram incorporadas em gel de Carbopol 940®. Em um gral de porcelana contendo Carbopol 940® previamente macerado (equivalente a 0,5 wt%), adicionou-se a suspensão de nanopartículas. Após a homogeneização, o pH foi ajustado entre 6,5 e 7,0 através da adição de 0,1 mL de trietanolamina. Adicionou-se propilenoglicol (umectante) a 0,5 wt%.

A formulação do branco (somente solução de surfactantes sem nanopartículas) e a formulação contendo as nanocápsulas foram caracterizadas quanto à característica reológica em um viscosímetro do tipo Brookfield.

III.3.10 Estudos de Permeação Cutânea em Célula de Difusão de Franz

A liberação dos ativos foi avaliada em célula de difusão vertical de Franz, em pele humana abdominal, a qual foi doada de cirurgia plástica. Os tecidos adiposos foram removidos imediatamente após a cirurgia e a pele foi armazenada a -18 °C por até 3 meses antes do uso. A célula de difusão de Franz empregada tem uma área de 2,01 cm² e capacidade do compartimento receptor de 7 mL (Figura III.1).



Figura III.1: Célula de difusão de Franz utilizada no experimento de permeação em pele humana abdominal.

A epiderme foi exposta à célula doadora, enquanto que a derme foi mantida em contato com tampão fosfato (PBS), pH 7,4, contendo 5 % de Tween 80 na célula receptora. Na célula doadora, empregou-se o gel de Carbopol 940 ® a 0,5 wt% com as nanopartículas. O sistema foi mantido sob agitação magnética na célula receptora, a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação. A superfície da pele foi cuidadosamente lavada com água destilada e seca com algodão. Realizou-se a quantificação do ativo na camada córnea, removendo-a através da técnica de *tap stripping* (20 *tapes*). A extração do ativo foi realizada a 40 °C em 5 mL de metanol, alternando-se entre *Vortex* e ultrassom por 30 minutos. Realizou-se a extração do ativo do restante da epiderme e da derme pelo mesmo procedimento de extração. As amostras foram filtradas em filtro de 0,45 µm e analisadas por HPLC. Os resultados representam média ± desvio padrão de 6 células de Franz para cada formulação.

III.3.11 Microscopia de Varredura a Laser Confocal (CLSM)

Para a avaliação por CLSM, utilizou-se diferentes períodos de incubação na célula de difusão de Franz (30 min., 1 h, 2 h e 4 h), utilizando a suspensão de partículas na célula doadora. Após o período de incubação, a superfície da pele foi enxaguada com água destilada e cuidadosamente seca com lenço de papel. A pele foi imediatamente cortada com bisturi no sentido do início da derme para a camada córnea. Um outro tipo de corte foi realizado no sentido paralelo a superfície de aplicação das nanopartículas com a finalidade de diminuir a espessura, adequando-se ao equipamento. As amostras foram depositadas em uma lamina de microscopia óptica e mantidas úmidas pela adição de PBS. As investigações nas amostras foram realizadas em um microscópio de varredura a laser confocal Carl Zeiss LSM510. O azul do Nilo foi excitado com laser He-Ne (543 nm) e a emissão foi detectada empregando filtro *bypass* (590-665 nm). O palmitato de retinila foi excitado com um laser coerente multifóton Ti-safira (720 nm), com excitação em 360 nm, e a emissão detectada através de um detector Zeiss meta (419-548 nm). Adicionalmente, o corante isotiocianato de fluoresceína foi excitado usando laser He-Ne (488 nm) e filtro 505-548 nm. As imagens foram sobrepostas em programa Zeiss LSM confocal. As amostras também foram avaliadas somente com o as nanoesferas sem funcionalização para observação de uma possível auto fluorescência nas mesmas condições que as amostras com corantes. As imagens confocal foram primeiramente obtidas no plano xy (ou seja, paralela ao plano da superfície). A superfície da pele foi definida em $z = 0 \mu\text{m}$, como o plano de início da fluorescência (ao longo do eixo z). Para gerar os cortes xz, uma linha horizontal foi delimitada ao longo do eixo xy em $z = 0 \mu\text{m}$, e então opticamente seccionada através da digitalização da imagem de cortes sucessivos xy para gerar o plano xz. As análises foram realizadas na Universidade Federal de São Paulo.

III.3.12 Estudos de Permeação em Membranas de Policarbonato

A possibilidade de permeação das nanocápsulas em poros menores foi avaliada em membranas de policarbonato (50 nm de diâmetro, GE, Osmonics Inc.), a uma pressão de 2,5 atm e 6,0 atm através de $N_{2(g)}$ (Figura III.2). Para a extrusão, adicionou-se Polioxietilenoglicol 8-lauril (PEG-8L) à suspensão de NC (concentração final de PEG-8L 0,2 % m/v). O volume utilizado foi de 1 mL.



Figura III.2: Extrusora utilizada na permeação em membranas de policarbonato.

Avaliaram-se os diâmetros médios anteriores à permeação, além do filtrado e da suspensão superior após a permeação. Tal método é comumente empregado para avaliação de lipossomas elásticos (TROTTA e col., 2002; BOUWSTRA e HONEYWELL-NYGUYEN, 2002). Os ensaios de extrusão foram realizados no laboratório da Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana, Engenharia Química, UNICAMP.

III.3.13 Análise dos Resultados

As Análises estatísticas dos dados, quando pertinentes, foram realizadas através do teste “t de Student” através do programa Prisma®, considerando-se como significativo $P < 0,05$.

IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 Escolha do Polímero Biodegradável

A escolha do polímero para o encapsulamento do palmitato de retinila (óleo) foi feita com base no teste para se verificar a inchamento/dissolução de dois polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, PCL e PLA. Esse teste foi proposto pela primeira vez por GUTERRES e col. (2000) como indicativo da formação de nanocápsulas. O PCL apresentou intumescimento do segundo ao vigésimo quarto dia. O PLA não apresentou diferença em sua massa nesse período (Figura IV.1). Desta maneira, o PLA foi o polímero de escolha no encapsulamento do palmitato de retinila.

Cabe mencionar que após 24 dias os filmes de PCL se tornaram quebradiços indicando a dissolução do polímero após o intumescimento e perda de massa para a fase oleosa.

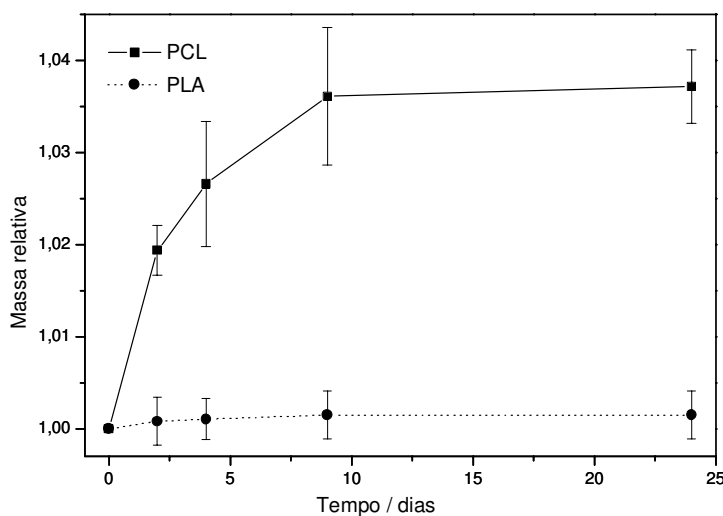


Figura IV.1: Testes de inchamento dos filmes poliméricos PCL e PLA em PR.

Na literatura, as formas mais comuns de encapsulamento do palmitato de retinila são nanopartículas lipídicas sólidas, SLN (JENNING e col. (2000); SAPINO e col., 2005). Em nanopartículas poliméricas, o palmitato de retinila foi encapsulado apenas em PCL (CLEMMENSEN e col. 2007), no entanto, nesse caso, sugere-se, conforme observado na Figura IV.1, a formação de nanoemulsões ao invés de nanocápsulas devido à solubilidade do palmitato de retinila na matriz polimérica.

IV.2 Estudo das Variáveis na Preparação de Nanopartículas de PLA

O método de nanoprecipitação para a preparação de nanoesferas foi primeiramente descrito e patenteado por FESSI e col. (1988). Em nosso trabalho, foi realizado um planejamento fatorial 2^{5-2} para investigar algumas variáveis deste processo.

Nas Figuras IV.2 e IV.3, são apresentadas as imagens SEM representativas dos ensaios realizados. Observou-se morfologia esférica em todas as amostras, sendo que após a liofilização (Figura IV.3) ocorreu a formação de agregados. Tais agregados, não são totalmente redispersíveis, mesmo após serem ressuspensos e submetidos à ultrassom por 15 min, o que provavelmente quebraria aglomerados onde não houvesse coalescência.

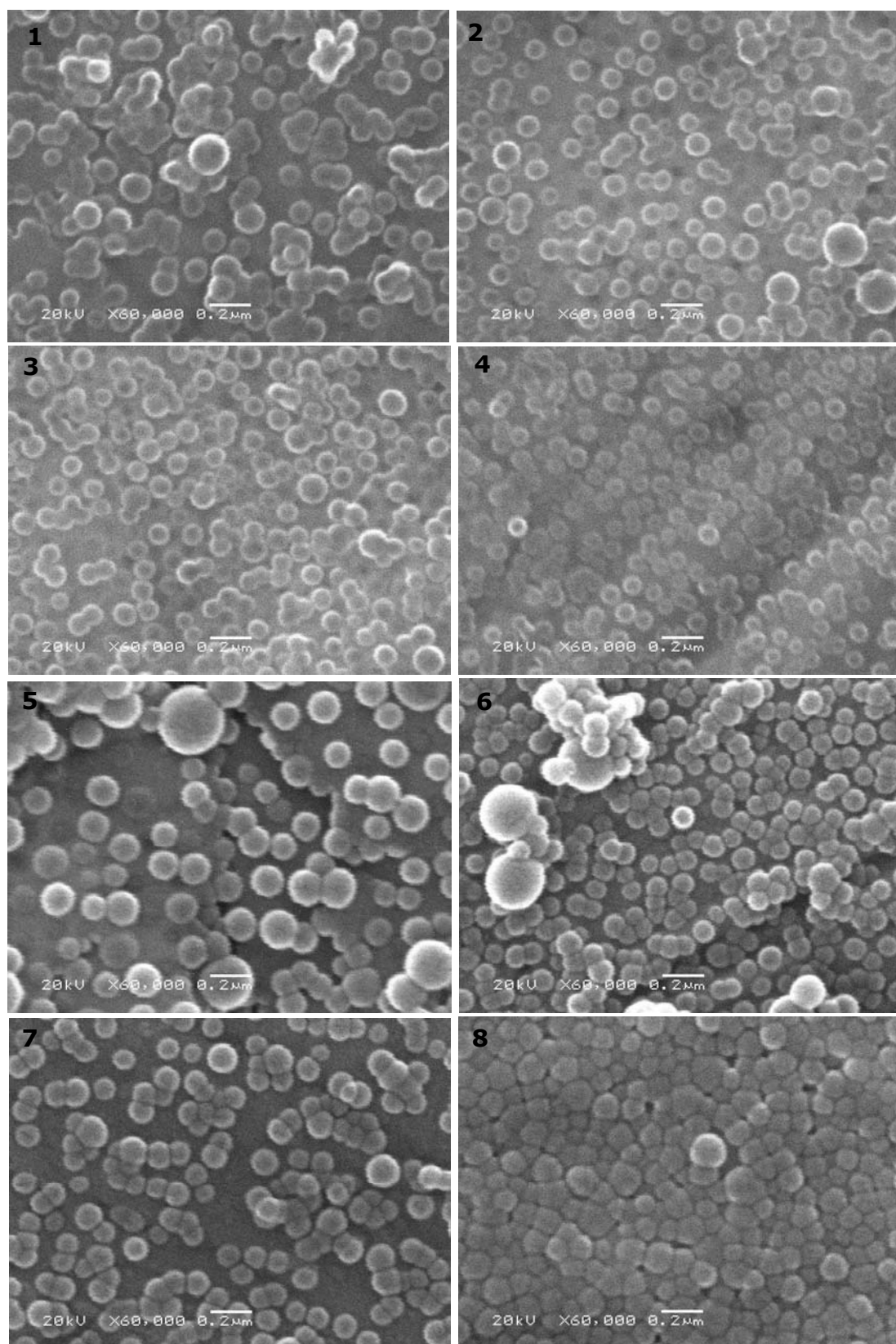


Figura IV.2: Imagens SEM representativas dos ensaios 1-8 anteriores à liofilização.

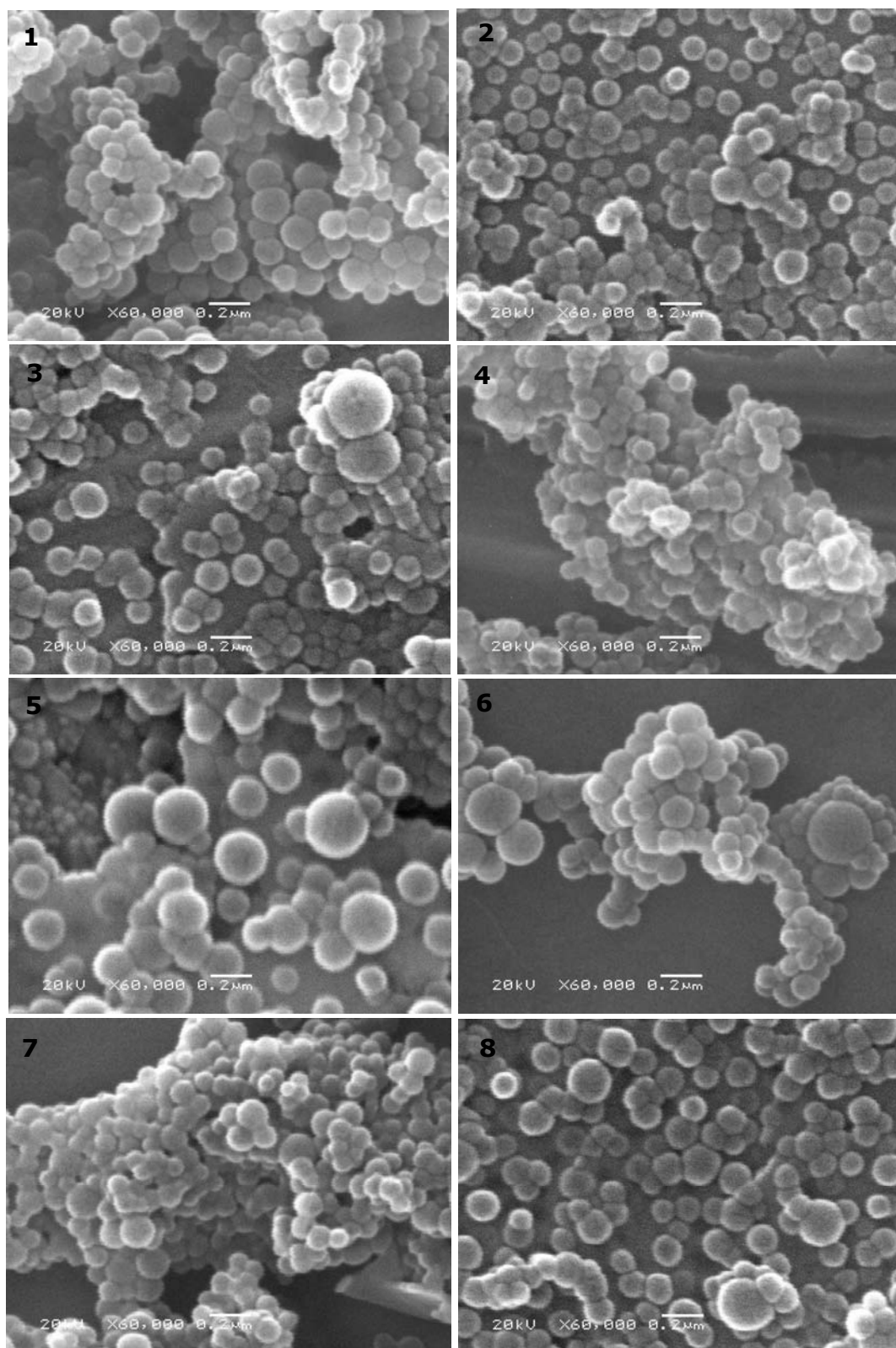


Figura IV.3: Imagens SEM representativas dos ensaios 1-8 após a liofilização.

Os diâmetros médios de partículas e índices de polidispersidades são mostrados na Tabela IV.1. As amostras foram analisadas anteriormente a lavagem das partículas por centrifugação e após a liofilização por DLS. Quando empregado o Pluronic F68 como surfactante, observou-se a formação de agregados após as lavagens que não foram totalmente redispersíveis. Os ensaios que empregaram PVA, no entanto, ensaios 2, 3, 5 e 8, mostraram agregados de tamanhos menores do que com Pluronic F68 após a liofilização. Isto evidencia um efeito crioprotetor relativamente maior do PVA em relação ao Pluronic quando empregados próximos de uma monocamada nas partículas, tendo em vista que as amostras foram lavadas após suas preparações. Quando utilizados em percentagens entre aproximadamente 0,5 e 2% em solução, sabe-se da literatura que o Pluronic F68 e o PVA podem ser empregados como crioprotetores (SAEZ e col., 2000; DONINI e col., 2002).

Tabela IV.1: Diâmetros médios de partículas e (d) e índices de polidispersidades (P.D.I.).

Ensaio	Partículas anteriores a remoção de estabilizante por centrifugação		Liofilizadas	
	d/ nm	P.D.I.	d/ nm	P.D.I.
1	162	0,13	908	0,29
2	177	0,12	251	0,14
3	187	0,07	272	0,18
4	166	0,05	135	0,33
5	233	0,10	367	0,20
6	185	0,03	711	0,26
7	139	0,14	789	0,29
8	238	0,06	205	0,13

A Tabela IV.2 apresenta os resultados dos cálculos dos efeitos a partir dos diâmetros anteriores às lavagens das partículas.

Tabela IV.2: Efeitos calculados para os diâmetros médios de partículas no planejamento fatorial 2^{5-2} .

Efeitos calculados para os diâmetros médios de partículas	Diâmetros / nm (DLS) ($S_{(efeito)} * t = 11$) [#]
Média	186
1 (modo de agitação)	45
2 (solvente)	-27
3 (massa de polímero)	105
4 (tipo de surfactante)	183
5 (% surfactante)	11

[#] $S_{(efeito)} * t$ = erro padrão dos efeitos em intervalo de confiança de 99,95%, usando a distribuição t (BARROS NETO e col., 2002).

Os cálculos dos efeitos (Tabela IV.2) indicam que são variáveis significativas o modo de agitação, solvente, massa de polímero e tipo de surfactante. Quanto à forma de agitação, observou-se que uma agitação mais rápida e mecânica ocasionou a formação de alguns agregados interferindo nos valores de diâmetros efetivos e polidispersidades. De acordo com resultados prévios da literatura, solventes com parâmetros de solubilidade mais próximo ao parâmetro de solubilidade da água resultam em partículas menores e de tamanhos mais homogêneos. Comparando-se etanol e acetona, o etanol possui parâmetro de solubilidade mais próximo ao da água, resultando em menores tamanhos de partículas no primeiro caso (GALINDO-RODRIGUEZ e col., 2004). Nas preparações com o polímero PLA, foi empregada uma mistura de solventes etanol e acetona, pois o polímero não é totalmente solúvel em etanol. Verificou-se que tal mistura apresentou propriedade superior à da acetona na obtenção de partículas menores e menos polidispersas, uma vez que se espera que a mistura apresente parâmetro de solubilidade mais próximo ao da água do que a acetona pura. A concentração de polímeros na solução orgânica também é conhecida na literatura por ocasionar diferenças nos tamanhos de partículas. Em gotas mais diluídas adicionadas na fase aquosa, os tamanhos de partículas formados são menores, devido a menor possibilidade de formação de agregados durante a formação das partículas. No caso dos estabilizantes

empregados, tanto o Pluronic F68 quanto o PVA são conhecidos como bons estabilizantes, sendo empregados em uma faixa de concentração geralmente de 0,2 a 2% (LEGRAND e col., 1999). As fases aquosas com PVA têm maior viscosidade do que as com Pluronic F68. Este pequeno aumento na viscosidade pode ocasionar um pequeno aumento na polidispersão.

Em suma, se obtêm partículas menores e menos polidispersas quando se emprega agitação magnética, a mistura de solventes acetona e etanol, uma massa de polímero menor, além do surfactante Pluronic F68.

IV.3 Obtenção do Derivativo Polimérico Fluorescente Poly(D,L-Lactídeo)-Azul do Nilo (PLA-AN)

No mecanismo proposto para a obtenção do derivativo polimérico fluorescente (Figura IV.4), primeiramente tem-se a ativação da carbonila de terminações poliméricas pelo DCC, obtendo-se a *O*-acilouréia (Figura IV.5a). Tal intermediário tem baixa seletividade para nucleófilos específicos. Além disso, pode se rearranjar em *N*-acilouréia (Figura IV.5b), resultando em contaminação do produto e baixo rendimento. Adicionalmente pode se rearranjar para *S*(4H)-oxazolonas (Figura IV.5c) que se tautomeriza prontamente, resultando em racemização. A formação da *N*-acilouréia é suprimida pelo emprego de alguns solventes como clorofórmio e acetonitrila, especialmente a baixa temperatura.

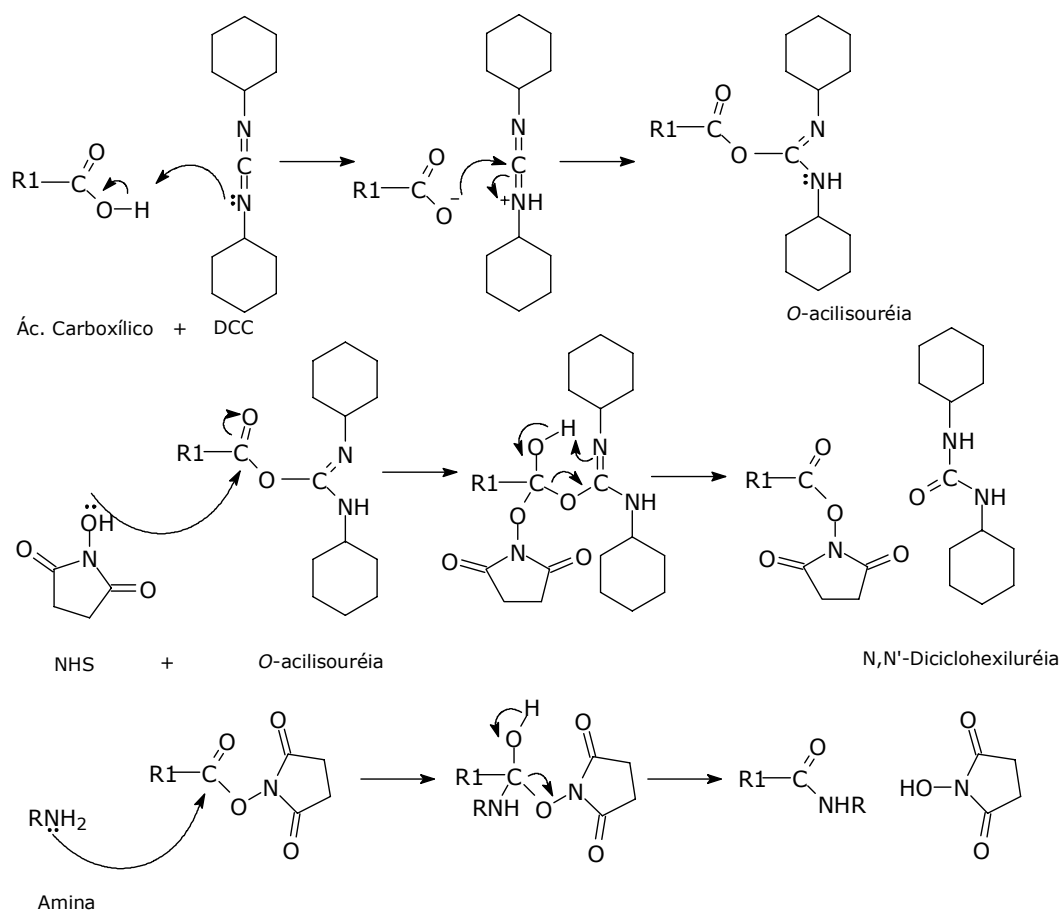


Figura IV.4: Mecanismo proposto para obtenção do derivativo fluorescente (CARRY, 2005). R1= cadeia polimérica; RNH₂ = corante azul do Nilo.

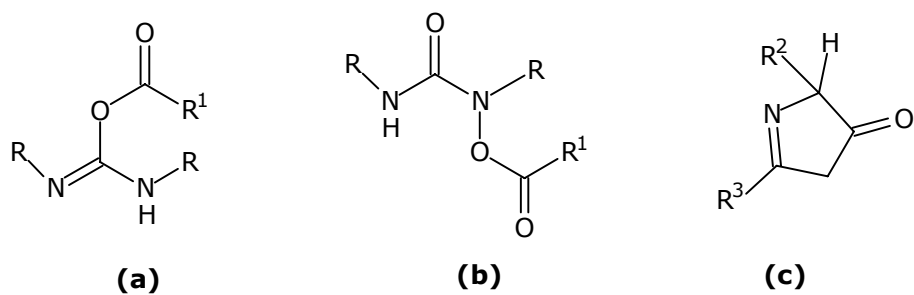


Figura IV.5: Possíveis intermediários na reação, onde R = cadeia carbodiimida, R¹= cadeia polimérica, R²= grupos laterais das cadeias poliméricas, R³= NH. (a) O-acylisouréia, (b) N-acylisouréia e (c) = S(4H-)oxazolonas.

O emprego de solventes de baixa constante dielétrica tende favorecer a dimerização dos ácidos carboxílicos terminais. Enquanto solventes com altas constantes dielétricas como dimetilformamida retardam a acetilação dos aminoácidos, e N-acilouréia pode ser, nesse caso, o produto majoritário. A utilização de agentes de *trapping* como o NHS reduz a extensão destas reações laterais, especialmente a formação da N-acilouréia. Além disso, a racemização é inibida na presença deste aditivo (PEARSON e ROUSH, 1999).

A massa de polímero recuperado após a liofilização foi de 83 %. O produto foi caracterizado por espectroscopia de absorbância no UV/Vis e por fluorescência (Figura IV.6), empregando-se etanol como solvente. O máximo de absorção do PLA-azul do Nilo foi em 552 nm, enquanto que o azul do Nilo apresenta máximo de absorção em 636 nm. Os comprimentos de onda de emissão, no entanto, não são diferentes significativamente. O azul do Nilo mostrou excitação em 622 nm e emissão em 663 nm, enquanto que o derivativo PLA-azul do Nilo apresentou excitação em 566 nm e máximo de emissão em 668 nm. A análise da solução aquosa resultante da lavagem do polímero com água mostra dois máximos de absorção que correspondem ao azul do Nilo em excesso e ao polímero-azul do Nilo que não foi recuperado. Adicionalmente, o polímero funcionalizado foi caracterizado pelo método de cromatografia de permeação em gel (GPC), o qual indicou que o polímero não apresenta mudanças significativas em sua massa molar após a funcionalização.

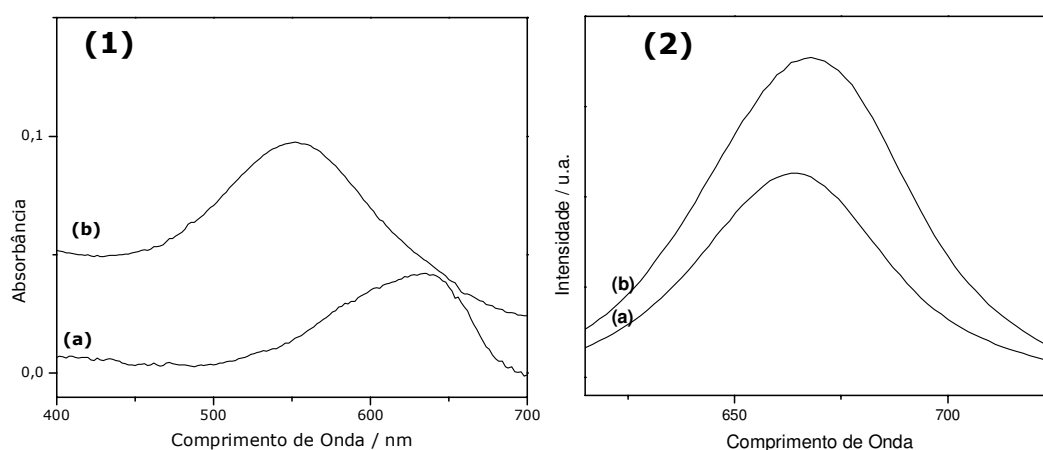


Figura IV.6: Espectros de (1) absorbância no UV/VIS e (2) emissão de: (a) azul do Nilo e (b) PLA-azul do Nilo.

A Figura IV.7 apresenta os espectros de emissão e excitação para o palmitato de retinila em comparação ao PLA-azul do Nilo.

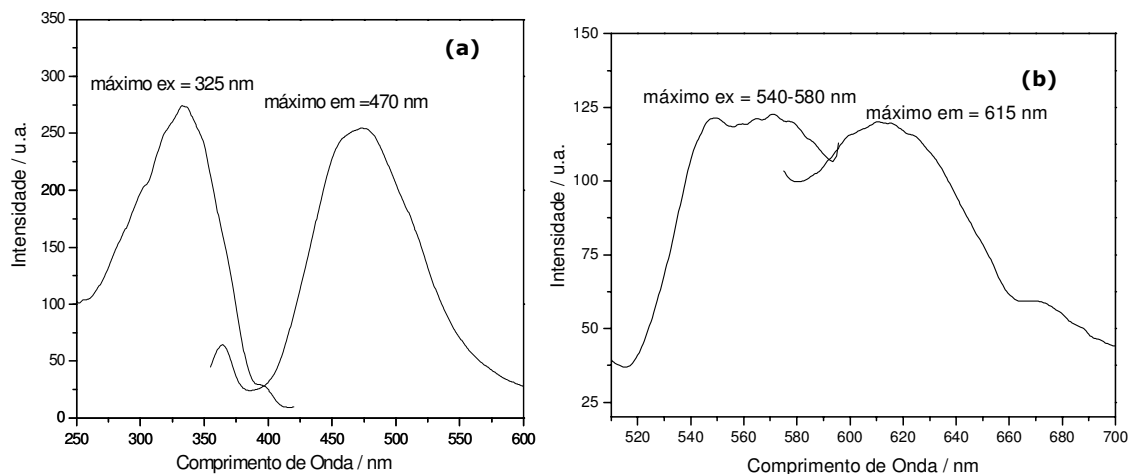


Figura IV.7: Espectros de excitação e emissão para (a) palmitato de retinila e (b) PLA-azul do Nilo em fase aquosa.

Cabe mencionar que também foram obtidos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) e de infravermelho (FTIR), porém, como a reação de funcionalização ocorre apenas na carbonila terminal polimérica, os grupos funcionalizados representam uma percentagem em massa inferior a 1%, não apresentando mudanças nos espectros destas técnicas convencionais em relação ao polímero não-funcionalizado.

O palmitato de retinila e o polímero funcionalizado com azul do Nilo apresentam excitações e emissões em comprimentos de ondas distintos, o que viabiliza a investigação tanto do carreador quanto do bioativo em estudo de permeação cutânea pela técnica de CLSM, conforme será apresentado no item IV. 13.2.

IV.4 Preparação das Nanoestruturas

Na obtenção de nanocápsulas, teve-se por base os ensaios realizados na preparação das nanoesferas de PLA (item IV.2), escolhendo-se as condições de preparação próximas aos níveis (-) dos ensaios. A mistura de solventes havia apresentado o melhor resultado, desta forma decidiu-se empregar acetona e

etanol na preparação de nanocápsulas. Além disso, utilizou-se a menor massa de polímero 50 mg e agitação magnética moderada. O PVA mostrou-se um excelente estabilizante, no entanto, tem algumas restrições de uso, como proibição no emprego intravenoso, devido a seu efeito carcinogênico (BOUILLLOT e col., 1999). O Pluronic F68 apresentou a formação de agregados nas lavagens. Entretanto, esse surfactante pode ser empregado sem etapa de purificação das partículas (devido à baixa toxicidade). Outra classe de surfactantes amplamente empregada na preparação de partículas é a dos polissorbatos (Tweens e Spans). Em trabalho da literatura, na obtenção de nanocápsulas de PCL empregando o Pluronic F 68 e o Tween 85, observou-se que o Tween resultou em preparação com tamanhos de partículas menores. Além disso, após uma semana as partículas obtidas com Pluronic mostraram agregados (ALVAREZ-ROMÁN e col., 2001). Entretanto, alguns trabalhos da literatura mostram a obtenção de partículas uniformes e estáveis empregando-se o Pluronic F68 (GAMISANS e col., 1999; TEIXEIRA e col., 2005; FRESTA e col., 1996). Cabe mencionar, que foram testados outros surfactantes que não são comumente empregados na preparação de partículas como alquil poliglicosídeos, álcool graxo etoxilado e óleo de mamona etoxilado (*castor oil*), porém as partículas evidenciaram a formação de agregados durante a lavagem após centrifugações.

Segundo GALLARDO e col. (1993), os fatores que levam à formação das nanocápsulas são a difusão do solvente orgânico, com a miscibilidade completa na fase aquosa e insolubilidade do polímero em ambas as fases aquosas e óleo. Geralmente, a temperatura e agitação não parecem influenciar as características das partículas formadas. No entanto, a viscosidade inicial da fase oleosa pode influenciar o diâmetro médio das nanocápsulas. De fato, uma resistência devida à viscosidade alta é observada podendo aumentar o tamanho das gotas de óleo durante o processo de difusão (MOSQUEIRA e col., 2000). Como o palmitato de retinila apresenta alto ponto de fusão (28 °C), aqueceu-se a fase orgânica e a fase aquosa entre 32 °C e 37 °C, para garantia de que o palmitato estivesse em sua forma fundida, possibilitando a formação das nanocápsulas.

Na preparação das nanocápsulas, empregou-se adicionalmente um surfactante de baixo balanço hidrofílico-lipofílico (HLB), o Span 60. Na verdade, a presença de tensoativos não é um fator primordial na formação dos sistemas coloidais por precipitação, uma vez que estes se formam espontaneamente. Eles conferem maior estabilidade, prevenindo a agregação com o passar do tempo. Estudos mostraram que formulações preparadas com apenas um dos tensoativos sedimentaram e formaram agregados não redispersíveis (MULLER e col., 2004; GUTERRES e col., 1995). A sedimentação das partículas e a passagem da substância ativa para o meio aquoso dispersante são evitadas pela presença do tensoativo lipossolúvel na formulação (MULLER e col., 2004; GUTERRES e col., 1995).

Na obtenção de nanocápsulas, têm sido observadas na literatura razões de óleo/polímero entre 2,5 e 4 (m/m). Na primeira tentativa de obtenção de nanocápsulas, descrita no item III.2.4, no entanto, partiu-se da razão em massa óleo/polímero=2, pois seria esperada a obtenção de nanocápsulas com uma parede polimérica mais espessa. Entretanto, as microscopias eletrônicas de varredura (Figura IV.8) revelaram a obtenção, possivelmente, de um sistema bimodal de nanocápsulas e nanoesferas, podendo ainda ter nanoemulsões no sobrenadante. Sugere-se isto com base nas nanoesferas (NS, 'branco') obtido para estas partículas, sem a adição do óleo, que apresentou os menores tamanhos. Na Figura IV.8 sugere-se que as nanocápsulas são as esferas de tamanhos maiores, sendo que algumas se apresentaram com morfologia discóide.

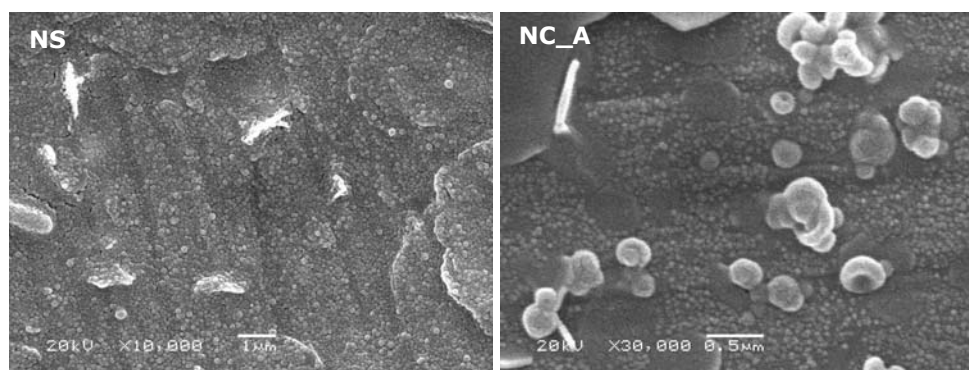


Figura IV.8: Imagens SEM representativas das preparações NS (branco) e NC_A.

Como na preparação NC_A foram observadas nanocápsulas e nanoesferas, mudaram-se algumas variáveis do processo para se obter um sistema mais homogêneo. Uma vez que a maioria das preparações encontradas na literatura tem razão óleo/polímero próxima de 3 (m/m), utilizou-se entre 2,5 e 3,5 (m/m) para o preparo das nanocápsulas.

As preparações de nanocápsulas obtidas a seguir, NC1, NC2 e NC3, apresentam uma razão em massa óleo/polímero de 2,5, 3,0 e 3,5, respectivamente. As fotografias destas preparações de nanocápsulas (Figura IV.9) e das nanoesferas (NS) revelam um efeito Tyndal bem mais pronunciado para as nanocápsulas que além de terem comumente tamanhos maiores, também se encontram em maior número.



Figura IV.9: Imagens das preparações de NS, NC1, NC2 e NC3 (da esquerda para a direita).

Na preparação das nanocápsulas, observou-se que o sobrenadante apresenta um aspecto turvo, de maneira que nem todas as partículas sedimentam. Para confirmar este fato, fez-se uma ultracentrifugação a 48000 rpm/2h, observando-se uma separação de fases pela formação de um *pelet* depositado e uma fase menos densa no sobrenadante (Figura IV.10). Neste caso, à fase do *pelet* foi atribuída a nanocápsulas, sendo que a fase superior pode ser devida a nanoemulsões ou nanocápsulas menos densas. Além disso, como a força centrífuga é alta no caso da ultracentrifugação, pode ocorrer “vazamento” do óleo em algumas estruturas.

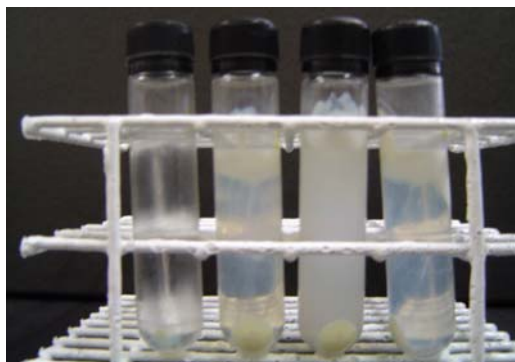


Figura IV.10: Imagens das preparações de NS, NC1, NC2 e NC3 (da esquerda para a direita) após etapa de ultracentrifugação.

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) é amplamente empregada em sistemas coloidais. Nesta técnica, medem-se as intensidades de luz espalhada pelas partículas em função do tempo (ocasionadas devido ao movimento Browniano das partículas em suspensão), obtendo-se uma função de correlação. Partículas maiores movimentam-se mais lentamente do que partículas menores, de maneira que a função de correlação apresenta decaimento mais lento de partículas maiores em relação às menores. A velocidade do movimento Browniano é definida por uma propriedade conhecida como coeficiente de difusão transversal, D_T .

O coeficiente de difusão transversal, D_T , de uma partícula é relacionada com seu raio hidrodinâmico (diâmetro de Stokes), d , e a viscosidade do meio, η , pela equação de Stokes-Einstein (SUGIMOTO, 2001):

$$D_T = \frac{kT}{3\pi\eta d} \quad (\text{IV.1})$$

Dessa forma, o diâmetro de Stokes das partículas é calculado através da equação de Stokes-Einstein.

Na Tabela IV.3, encontram-se descritos os valores de tamanhos de partículas para as preparações NS, NC1, NC2 e NC3, avaliados através da técnica de DLS. Observa-se uma diferença não significativa para as amostras NC1 e NS em relação aos tamanhos médios das amostras da suspensão original e obtidas após centrifugação. No caso das amostras NC2 e NC3 as

diferenças de tamanhos em torno de 8% podem referir-se à deposição por centrifugação de partículas menores, uma vez que, neste caso, as nanocápsulas maiores seriam menos densas devido ao maior conteúdo de óleo em relação ao polímero. O palmitato de retinila apresenta densidade entre 0,90 e 0,95 g cm⁻³, enquanto que o PLA tem densidade igual a 1,17 g cm⁻³. Com relação aos índices de polidispersidade (P.D.I.), este índice é adimensional apresentando valores entre 0 e 1. Sistemas monodispersos são aqueles com P.D.I. menor que 0,05. No entanto, índices entre 0,05 e 0,2 indicam baixa polidispersidade. Sistemas que apresentam P.D.I. maiores do que 0,7 apresentam resultado de tamanhos de partículas por DLS incertos.

Tabela IV.3: Diâmetros médios de partículas (d) e polidispersidades (P.D.I.) das preparações NS, NC1, NC2 e NC3.

Preparações	Suspensão Original		Suspensão após centrifugações	
	d / nm	P.D.I.	d / nm	P.D.I.
NS	125,7	0,15	124,3	0,15
NC1	238,3	0,11	232,7	0,06
NC2	261,5	0,10	240,2	0,10
NC3	265,9	0,07	245,1	0,18

O potencial elétrico na superfície de cisalhamento de partículas (entre a parte fixa e difusa da dupla camada elétrica ou camada de Stern) é chamado de potencial zeta. Valores de potencial zeta expressivos contribuem para maior estabilidade das suspensões coloidais, devido à repulsão entre as partículas que previnem agregações durante colisões ocasionadas pelo movimento Browniano, conforme descrito no item I.5.3. O método mais comum nas medidas de potencial zeta é através de medida da mobilidade das partículas relativo a um líquido estacionário por aplicação de um campo elétrico (medidas eletroforéticas) (HUNTER, 1981).

Os valores de potenciais zeta para estes sistemas estão descritos na Tabela IV.4. Para que a carga superficial de partículas confira estabilidade devido à repulsão, são relatados na literatura valores de potencial zeta acima de 30 mV em módulo (MOSQUEIRA e col., 2000). Portanto, uma vez que os

valores de potencial zeta são menores em módulo do que 30 mV, grande parte da estabilidade das partículas se deve a efeitos estéricos (efeito osmótico) e camada de hidratação (aumento da distância entre as partículas), conferida pelos estabilizante (Tween ou Pluronic). Os polímeros dentro da classe dos poliésteres são conhecidos na literatura apresentando carga superficial ligeiramente negativa devido aos grupamentos carboxílicos resultantes de hidrólises (MOSQUEIRA e col., 2000). Os surfactantes não-iônicos e estabilizantes poliméricos, no entanto, tendem a diminuir os valores da carga superficial polimérica.

Tabela IV.4: Valores de potencial zeta para as preparações NS, NC1, NC2 e NC3.

Preparações	Potencial zeta / mV ($\pm S_D$)	
	(suspensão original)	(suspensão após centrifugações)
NS	-8,74 $\pm$ 0,51	-11,45 $\pm$ 0,98
NC1	-9,56 $\pm$ 0,85	-21,31 $\pm$ 0,75
NC2	-14,19 $\pm$ 1,47	-19,94 $\pm$ 1,62
NC3	-14,00 $\pm$ 0,51	-18,18 $\pm$ 1,42

As imagens SEM para estes sistemas é apresentada na Figura IV.11. A técnica SEM não foi adequada para a visualização das partículas, tendo em vista que necessita da lavagem prévia das partículas por centrifugação o que pode selecionar amostra, além de deformar as partículas ou favorecer coalescência (devido à aplicação de força centrífuga), ou ainda, ter surfactante residual formando filme sobre as partículas e prejudicando a análise. Desta maneira, foi empregado o método de TEM após seleção do sistema de nanocápsulas (apresentação em capítulo posterior).

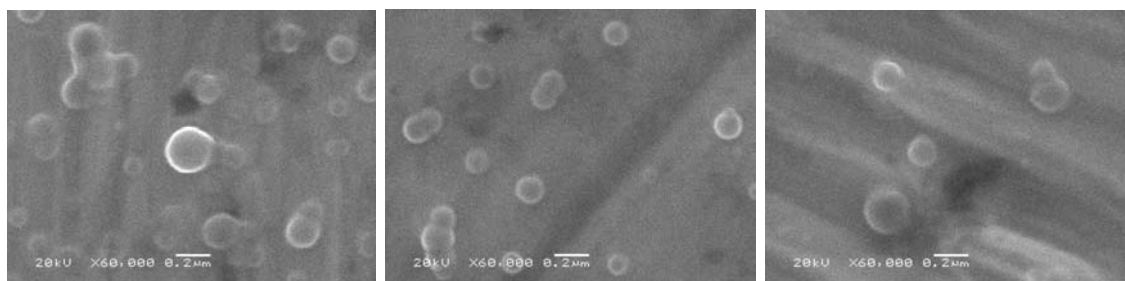


Figura IV.11: Imagens SEM representativas das preparações de NC1 NC2 e NC3 (da direita para a esquerda).

Como as formulações não apresentaram diferenças significativas nas proporções de óleo/polímero estudadas, escolheu-se a formulação intermediária, NC2, para prosseguir os estudos, denominando-a como apenas NC.

Em preparação de nanocápsulas pode ocorrer a formação de uma mistura dos sistemas: nanocápsulas, nanoesferas, niossomas e nanoemulsões, dependente das condições de preparação, conforme sugerido por MOSQUEIRA e col. (2000). Nesse trabalho da literatura, observou-se a obtenção de vesículas do surfactante lipofílico, além de nanoemulsões dependente da concentração e tipo do surfactante empregado. Em nosso sistema, sugere-se majoritariamente a formação das nanocápsulas, tendo em vista que a distribuição de diâmetros apresenta baixa polidispersidade ($P.D.I. < 0,2$) e o sistema não apresenta variação da distribuição de tamanhos conforme o surfactante hidrofílico empregado (Figura IV.12).

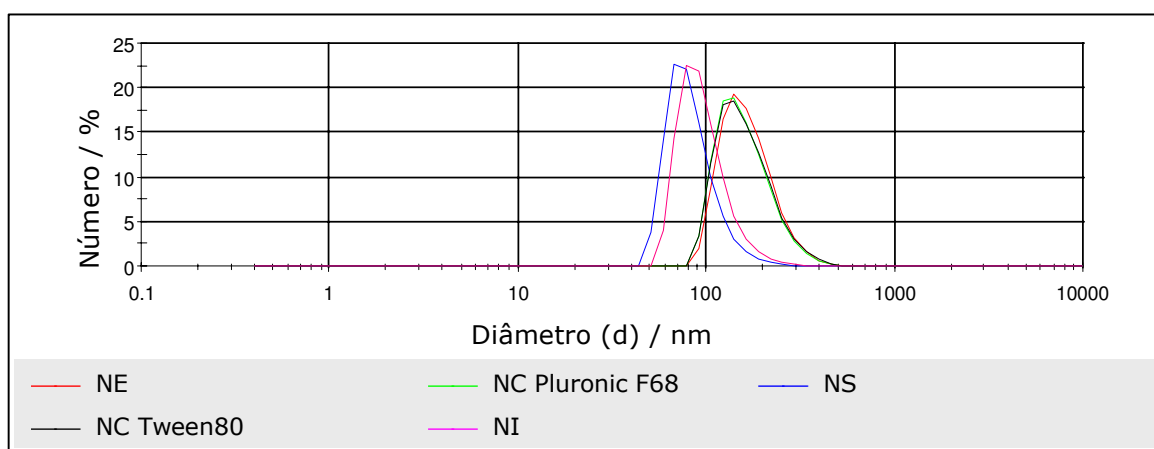


Figura IV.12: Distribuição de diâmetros por número das nanocápsulas (NC), nanoesferas (NS), nanoemulsões (NE), e niossomas (NI).

A Tabela IV.5 apresenta os resultados de distribuição de diâmetros e potencial zeta das nanocápsulas (NC), bem como dos sistemas comparativos de nanoesferas (NS), nanoemulsões (NE) e niossomas (NI) referentes a Figura IV.12. Observa-se que as NS e NI apresentam distribuição de tamanhos

similares. As NE e NC (independentemente do surfactante empregado) também apresentam distribuições de tamanhos similares entre si.

Tabela IV.5: Valores de diâmetros e potencial zeta para as preparações NS, NI, NE e NC com tween 80 (Tw) e Pluronic F68 (PI) a 1% (m/v).

Amostra	Diâmetros / nm (P.D.I.)	Potencial Zeta / mV
NS	132,1 (0,14)	-9,2 ± 4.8
NI	136,1 (0,11)	-23,5 ± 5.5
NE	209,3 (0,11)	-17,1 ± 3.8
NC Tw	219,7 (0,17)	-7,2 ± 5.2
NC PI	219,6 (0,18)	-14,9 ± 5.0

Adicionalmente, a remoção do surfactante hidrofílico na obtenção das nanocápsulas resultou em tamanhos de partículas bem próximos aos de nanoemulsões e das partículas com adição de surfactante hidrofílico, o que também dá indícios de menor formação de mistura dos diferentes sistemas possíveis (Figura IV.13). Cabe mencionar que a preparação de partículas sem surfactante hidrofílico foi possível apenas em um lote do polímero (possivelmente mais hidrolisado) e apresenta coalescência aproximadamente após 1 h da preparação.

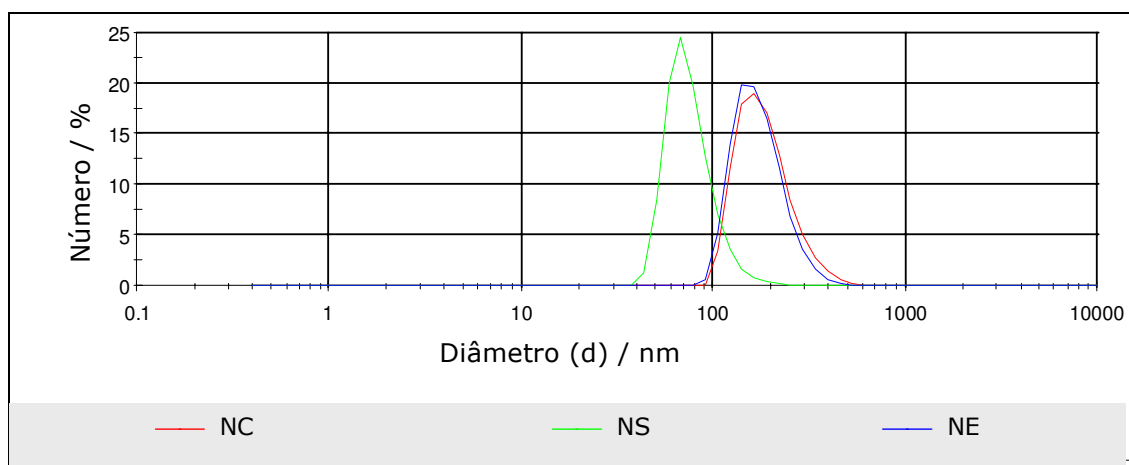


Figura IV.13: Comparação de sistema de nanoesferas (NS), nanoemulsões (NE) e nanocápsulas (NC), sendo que a preparação NC foi realizada sem adição de surfactante hidrofílico.

Desta forma, estabeleceu-se a formulação de razão óleo/polímero = 3 e como surfactante hidrofílico Tween 80 ou Pluronic F68 (sendo independente nas características finais do sistema).

A eficiência de encapsulamento do palmitato de retinila foi avaliada através da dissolução do fármaco total, obtendo-se recuperação entre 90 e 110 %, em relação à quantidade no filtrado (“livre” na suspensão) por HPLC. Sendo que a eficiência de encapsulamento foi de 99,9% para preparações de nanocápsulas empregando Tween 80 ou Pluronic F68.

IV.5 Medidas de Densidade em Gradiente de Percoll

As densidades de sistemas de nanocápsulas (com e sem Span 60) e nanoemulsões foram medidas em gradiente de Percoll® (em NaCl), sendo que a densidade pode ser determinada entre 1,019 e 1,137 g cm⁻³ de acordo com a coloração dos *beads* (Figura IV.14). O método utilizando Percoll se dá por separação isopícnica (equilíbrio através de centrifugação onde a posição da partícula é igual à densidade no mesmo ponto).

O gradiente de Percoll (partículas coloidais de sílica recobertas com polivinilpirrolidona) é formado devido a diferenças nos tamanhos de partículas de sílica, de acordo com a equação:

$$V = d^2 \frac{(\rho_p - \rho_l)}{18\eta} xg \quad (IV.2)$$

onde, a velocidade de sedimentação, V , é dependente do raio hidrodinâmico da partícula, d , densidades do solvente, ρ_l , e da partícula, ρ_p , além da viscosidade do meio, η , e a força centrifugacional, g (LAURENT e col., 1980; PERTOFT, 2000).

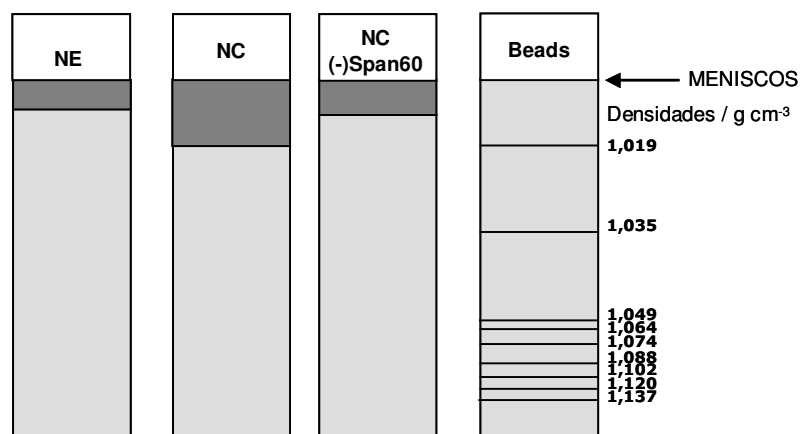


Figura IV.14: Esquema representativo dos tubos após formação de gradiente de Percoll por centrifugação: nanoemulsões (NE), nanocápsulas (NC), nanocápsulas sem Span 60 (NC(-)Span60) e *beads*.

A Figura IV.14 mostra apenas que o sistema de nanocápsulas possui uma faixa de densidades mais ampla do que nanoemulsões. As nanocápsulas sem Span 60 apresentam densidades mais próximas às nanoemulsões o que sugere que o surfactante lipossolúvel (mais denso do que o óleo) é solubilizado no núcleo. A densidade máxima observada no sistema das nanocápsulas é próxima a 1,019. A densidade (com Span 60 incorporado no núcleo) pelo método aditivo é entre 0,96 g cm⁻³ a 1,01 g cm⁻³, considerando a densidade do palmitato de retinila entre 0,90 g cm⁻³ e 0,95 g cm⁻³, respectivamente (densidades do Span 60 = 1,0 g cm⁻³ e do PLA= 1,17 g cm⁻¹).

IV.6 Ensaios de Citotoxicidade e Fototoxicidade

A avaliação da citotoxicidade e fototoxicidade das nanoestruturas foi realizada em sistemas *in vitro*, compreendendo culturas de células das linhagens de fibroblastos BALB/c 3T3 e queratinócitos humanos HaCaT. Tais linhagens foram selecionadas em função dos fibroblastos e queratinócitos representarem os principais constituintes celulares da pele e por apresentarem

modelos bem definidos e amplamente utilizados para ensaios desta natureza (BOUKAMP e col., 1988; GARACH-JEHOSHUA e col., 1999; PIEPKORN e col., 1998; BENAVIDES e col., 2004; DIJOU e col., 2006). Um dos fatores da escolha dos surfactantes empregados foi o estudo prévio de citotoxicidade nestas linhagens celulares, conforme resultados apresentados na Figura IV.15. Este experimento foi essencial tendo em vista que optou-se por eliminar a lavagem das nanopartículas que constitui uma etapa adicional no processo, aumentando gastos e tempo, além de contribuir na seleção de amostra no caso de purificação por centrifugação. Os surfactantes empregados foram os não-iônicos Tween 60, Tween 80, Span 60 e Span 80, e os poliméricos álcool polivinílico (PVA) e Pluronic F68, os quais compreendem os mais empregados em preparações de nanopartículas, além do catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (controle positivo) e aniônico dodecilsulfato de sódio (SDS) (QUINTANAR-GUERRERO, 1998; BASARKAR e col., 2007).

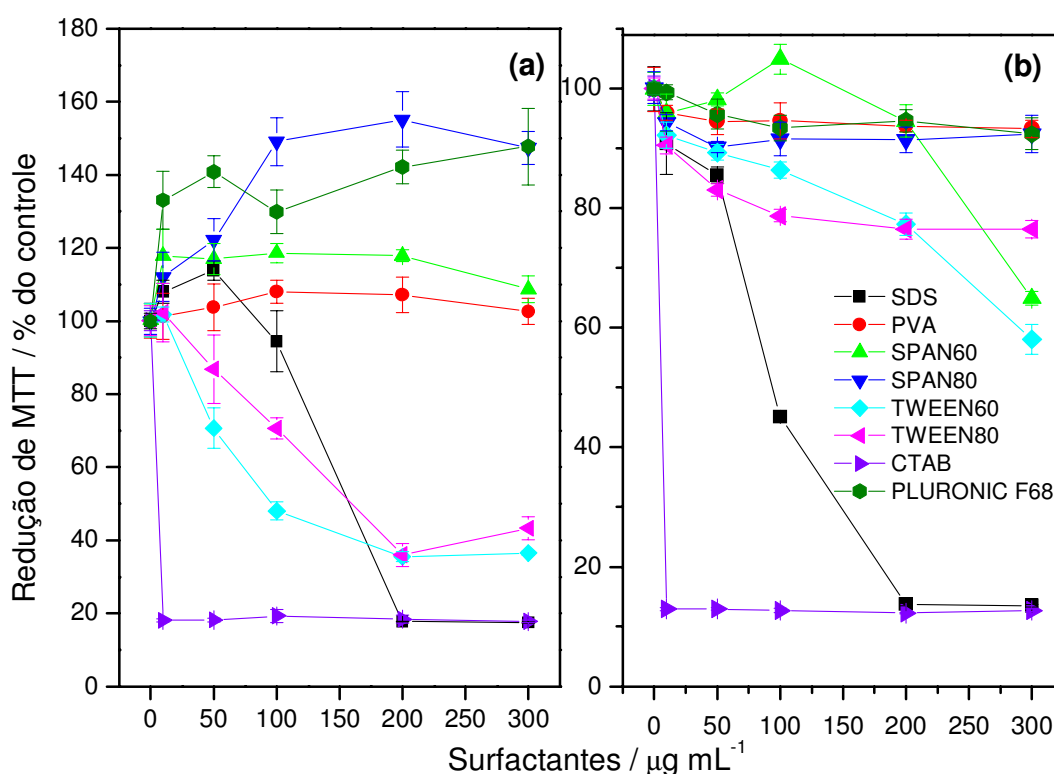


Figura IV.15: Avaliação dos efeitos de surfactantes sobre a proliferação celular em culturas de (a) fibroblastos (linhagem BALB/c 3T3) e (b) queratinócitos (linhagem HaCaT).

Um dos fatores de citotoxicidade das nanopartículas é o tipo de surfactante empregado. Os surfactantes não-iônicos, no geral, apresentam menor citotoxicidade do que os surfactantes iônicos (LIN e col., 2007). Os resultados obtidos na avaliação de citotoxicidade em culturas de células das linhagens de fibroblastos BALB/c 3T3 e queratinócitos humanos HaCaT (Figura IV.15) confirmaram esses achados, uma vez que tanto CTAB quanto SDS foram citotóxicos para ambas as linhagens, apresentando valores de IC₅₀ de 6,4 e 158,0 µg/mL (BALB/c 3T3) e 6,0 e 94,0 µg/mL (HaCaT) para CTAB e SDS, respectivamente.

Além disso, observou-se maior sensibilidade das células BALB/c 3T3 aos surfactantes não-iônicos Tween nos fibroblastos em relação aos queratinócitos (Figura IV.15a), sendo obtidos valores de IC₅₀ de 92,1 e 158,0 µg/mL após 24 h de exposição dos fibroblastos a diferentes concentrações de Tween 60 e Tween 80, respectivamente. Redução significativa na viabilidade de queratinócitos (aproximadamente 40% em relação ao controle) somente foi observada após exposição das células a alta concentração de Tween 60 (300 µg/mL) – (Figura IV.15b). Por outro lado, Pluronic F68 e Span 80 estimularam a proliferação das células fibroblásticas murinas, apresentando um aumento significativo na redução do sal de tetrazólio, em torno de 40% em relação ao controle, na maior concentração testada (300 µg/mL) – (Figura IV.15a), enquanto que, nenhum efeito foi observado nos queratinócitos para a mesma faixa de concentrações (Figura IV.15b). Curiosamente, Span 60, da mesma forma que Tween 60, apresentou toxicidade (35% em relação ao controle) aos queratinócitos quando utilizado na maior concentração testada (300 µg/mL) – (Figura IV.15b).

As diferenças encontradas na sensibilidade das células BALB/c 3T3 e HaCaT aos surfactantes testados devem-se principalmente às características específicas das linhagens celulares. Porém, cabe ressaltar que o efeito protetor e proliferativo do Pluronic já está bem estabelecido na literatura (MEHIER-HUMBERT e col., 2009; STEINHARDT e ALDERSON, 2006; KAPARAKIS e ALDERSON, 2003), sendo um dos mecanismos propostos a proteção da membrana celular (STEINHARDT e ALDERSON, 2006).

A Figura IV.16 apresenta os resultados de citotoxicidade e fototoxicidade para os sistemas de nanocápsulas utilizando Pluronic F68 e Span 60 como surfactantes nas preparações, além dos controles positivo e negativo para esses ensaios.

Avaliou-se o sistema para o branco (controle), nanoesferas (NS), nanoemulsões (NE) e nanocápsulas (NC). Apenas para alguns dos sistemas foi possível obter os valores de IC_{50} (concentração do composto que diminui em 50% a viabilidade celular). A fototoxicidade é classificada segundo o fator de fotoirritação (PIF), o qual é obtido pela razão entre os valores de IC_{50} obtidos no experimento na ausência de radiação UVA (-UVA) e os valores de IC_{50} obtidos nos experimentos na presença de radiação UVA (+UVA), de acordo com a equação:

$$PIF = \frac{IC_{50}(-UVA)}{IC_{50}(+UVA)} \quad (IV.3)$$

A equação IV.3 é utilizada em situações em que é possível determinar os dois valores de IC_{50} , na presença e na ausência de radiação. Assim, o composto será considerado fototóxico se o valor de PIF for ≥ 5 , e não fototóxico para $PIF < 5$. Células HaCaT tratadas com NC apresentaram valores de IC_{50} na presença ($1068 \mu\text{mol L}^{-1}$) e na ausência de radiação ($272,6 \mu\text{mol L}^{-1}$), sendo o valor de PIF calculado < 5 . Desta forma, pode-se concluir que as nanocápsulas não são fototóxicas aos queratinócitos.

Nos casos em que não é possível a determinação dos valores de IC_{50} na ausência de radiação, o valor de IC_{50} (-UVA) é substituído pelo valor da concentração máxima testada [C_{max} (-UVA)] (BORENFREUND e PUERNER, 1984, LASAROW e col., 1992) e o valor de PIF é dado pela equação:

$$PIF = \frac{C_{\text{max}}(-UVA)}{IC_{50}(+UVA)} \quad (IV.4)$$

Caso o valor de PIF obtido pela equação IV.4 seja >1 o composto será considerado fototóxico e para o $PIF \leq 1$, o composto será considerado não fototóxico.

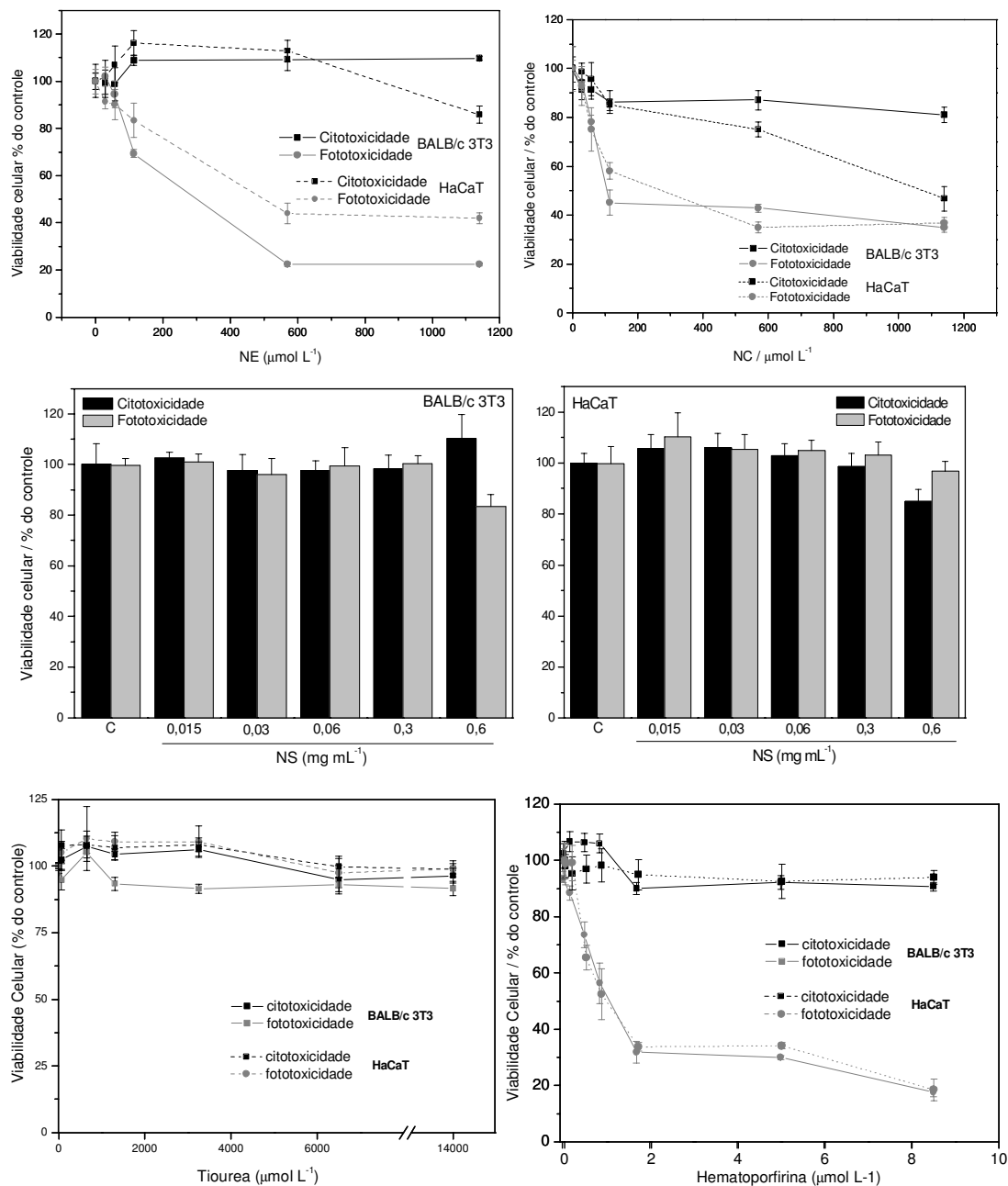


Figura IV.16: Avaliação da citotoxicidade e fototoxicidade das diferentes formulações em células BALB/c 3T3 e HaCaT. (NE= nanoemulsões, NC= nanocápsulas, NS= nanoesferas; Tiouréia = controle negativo; Hematoporfirina = controle positivo).

Em contraste ao observado nas células HaCaT, não foi possível determinar o valor de IC_{50} na ausência de radiação nas culturas de fibroblastos, enquanto que para as células irradiadas o IC_{50} obtido foi de $108 \mu\text{mol L}^{-1}$. Segundo a equação IV.4 conclui-se que $PIF > 1$ e, portanto, as nanocápsulas são fototóxicas aos fibroblastos.

Por este método, observou-se que formulações de nanoemulsões apresentam fototoxicidade em ambas as linhagens, sendo que os IC_{50} na presença de radiação em queratinócitos e fibroblastos são de $498 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $301 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, ou seja, essa formulação apresenta maior fototoxicidade nos fibroblastos.

A mesma equação é empregada para avaliar a hematoporfirina de maneira que $PIF > 1$, sendo fototóxica para ambas as linhagens celulares (controle positivo).

Caso não seja possível a determinação do valor de IC_{50} na presença e na ausência de radiação, o PIF será calculado segundo a equação IV.5 e o valor de PIF será igual a 1.

$$PIF = \frac{C_{\text{máx}}(-UVA)}{C_{\text{máx}}(+UVA)} = 1 \quad (\text{IV.5})$$

O controle negativo (tiouréia) e as nanoesferas não apresentaram valores de IC_{50} na presença e na ausência de radiação, sendo os valores de PIF iguais a 1 em ambos os modelos celulares e, portanto, não fototóxicas (Figura IV.16).

Em função dos resultados apresentados acima, as nanocápsulas apresentaram fototoxicidade em fibroblastos BALB/c 3T3. Porém, deve-se considerar que essas células ficam abaixo da epiderme, o que poderia minimizar o efeito da radiação que supostamente atinge as camadas mais profundas da pele em menor dosagem. Desta forma, pode-se sugerir que as formulações são relativamente seguras e merecem ser consideradas para o emprego tópico. Como no caso de demais retinóides, no entanto, a exposição solar deve ser evitada. Em particular, as nanocápsulas são promissoras ao se considerar a terapia fotodinâmica e possível aplicação terapêutica.

IV.7 Avaliação da Estabilidade Físico-Química

Quanto à estabilidade química (Figura IV.17), avaliada através do conteúdo total na suspensão por HPLC, observou-se que, mesmo encapsulado (razão em massa óleo:polímero 3:1), o palmitato de retinila apresenta uma degradação rápida em função do tempo. Foi possível, no entanto, estabilizar as suspensões formadas através da adição de um estabilizante lipossolúvel, 3,5-di-terc-butil-4-hidroxi-tolueno (BHT), e um filtro UV, Tinogard Q. Somente na avaliação de estabilidade “acelerada”, ou seja, a 42°C observou-se perda significativa do ativo no período avaliado nas formulações com estabilizantes.

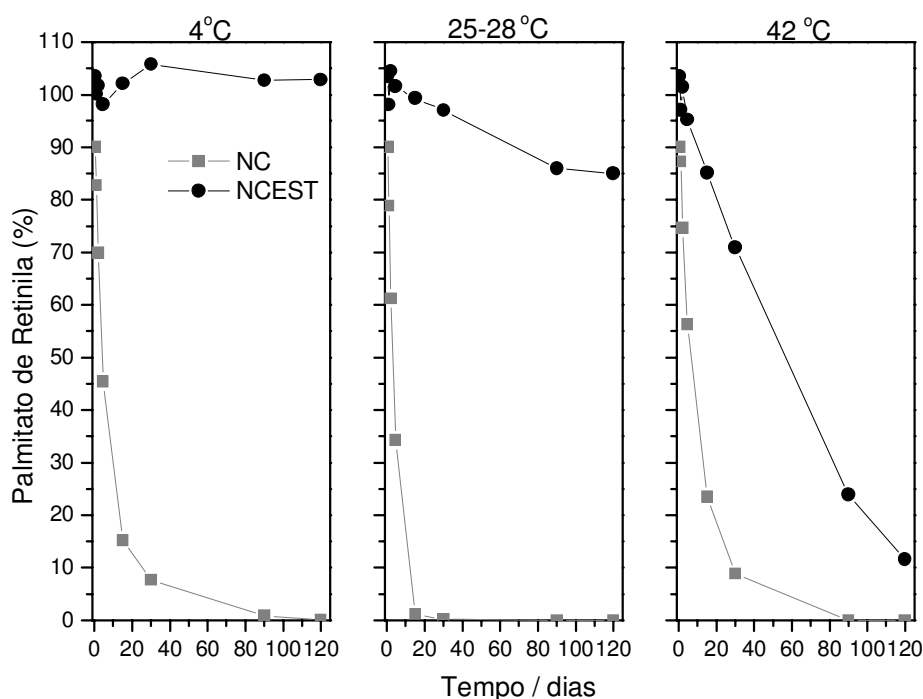


Figura IV.17: Percentagens de palmitato de retinila nas nanocápsulas em relação à quantidade inicial em função do tempo (dosagem por HPLC). NC = nanocápsulas sem estabilizantes; NCEST = nanocápsulas com BHT e Tinogard Q.

Com relação ao pH das suspensões (Figura IV.18), observa-se que o estabilizante hidrofílico inicialmente eleva o pH das suspensões. De maneira

geral, ocorre um decréscimo do pH em função do tempo. Nas formulações com estabilizantes a 4 °C e 28 °C, no entanto, não foi observado decréscimo significativo do pH (e da dosagem do ativo da Figura IV.17). Desta forma, atribui-se a diminuição do pH nos demais sistemas principalmente à hidrólise do palmitato de retinila na carbonila, gerando álcool e ácido carboxílico.

No sistema de nanocápsulas Mygliol 810 em PLA, o decréscimo do pH em função do tempo foi observado, sendo atribuído à degradação do polímero (GUTERRES e col., 1995).

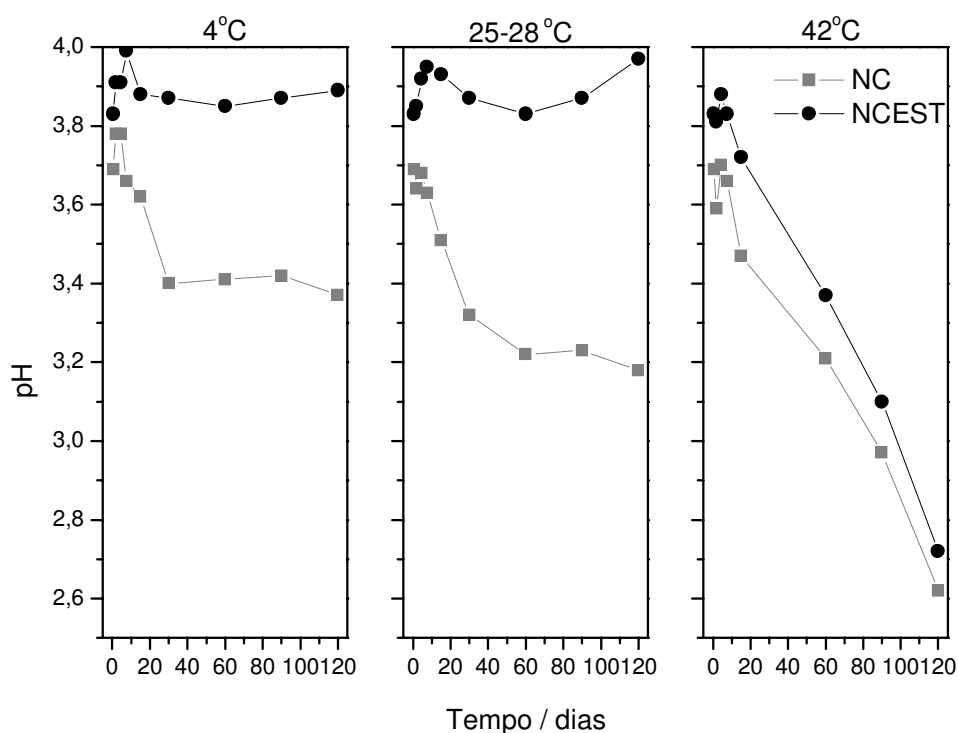


Figura IV.18: Medidas de pH das NC em função do tempo: NC = nanocápsulas sem estabilizantes; NCEST = nanocápsulas com BHT e Tinogard Q.

A estabilidade física das partículas foi avaliada quanto aos diâmetros médios e potencial zeta. Os dados de potencial zeta apresentam um aumento em módulo em função do tempo (Figura IV.19). Considerando que a superfície das partículas é constituída de poliéster (PLA) e surfactantes, com o tempo, as cadeias de poliésteres são hidrolisadas e com isto ocorre a formação de ácidos carboxílicos na superfície. Com o aumento da temperatura, o polímero é degradado mais rapidamente, gerando maior número de ácidos carboxílicos, o

que induz a uma carga na superfície de cisalhamento (raio hidrodinâmico) mais negativa. Como exceção, na estabilidade acelerada (42 °C), observa-se que o potencial zeta vai par valores mais negativos apenas até 30 dias. O comportamento do potencial zeta para essas amostras pode estar relacionado a algum produto de degradação do óleo.

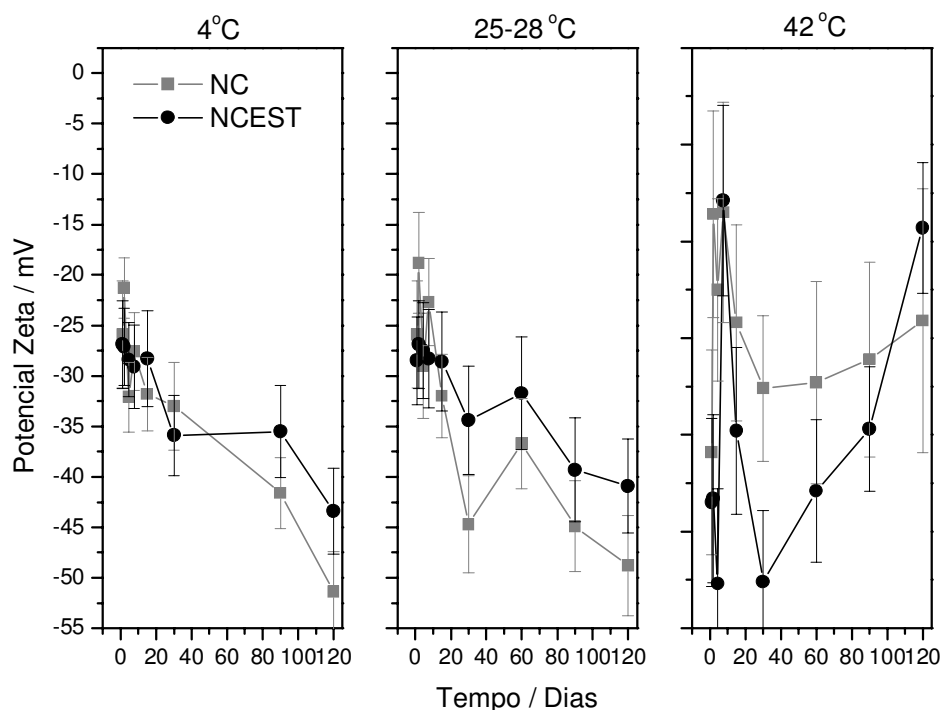


Figura IV.19: Potencial zeta das NC em função do tempo. NC = nanocápsulas sem estabilizantes; NCEST = nanocápsulas com BHT e Tinogard Q.

Com relação aos diâmetros médios (Figura IV.20), observa-se que com o passar do tempo, pelo menos até 120 dias de análise, não ocorre grandes variações nos tamanhos das amostras com estabilizantes armazenadas a temperatura ambiente. No entanto, as amostras armazenadas em geladeira e amostras sem estabilizantes aumentam de tamanho já nos tempos iniciais. Isto pode ser devido a diferenças no comportamento reológico do Pluronic F68 relacionados com a temperatura e o pH, o que implicaria em diferenças na estabilidade em função da temperatura. Cabe destacar que a variação com o tempo das amostras mantidas à temperatura ambiente e a 42 °C refere-se a formação de alguns agregados, sendo que quando se avalia os resultados de DLS por Número, não se observa variação significativa nesses casos. Cabe

menção que, os ensaios apresentados foram utilizando Pluronic F68 como surfactante. Na comparação com Tween 80, as curvas de degradação, pH e potencial zeta não mudam, entretanto, utilizando-se Tween 80 como surfactante não ocorre formação de agregados no mesmo período.

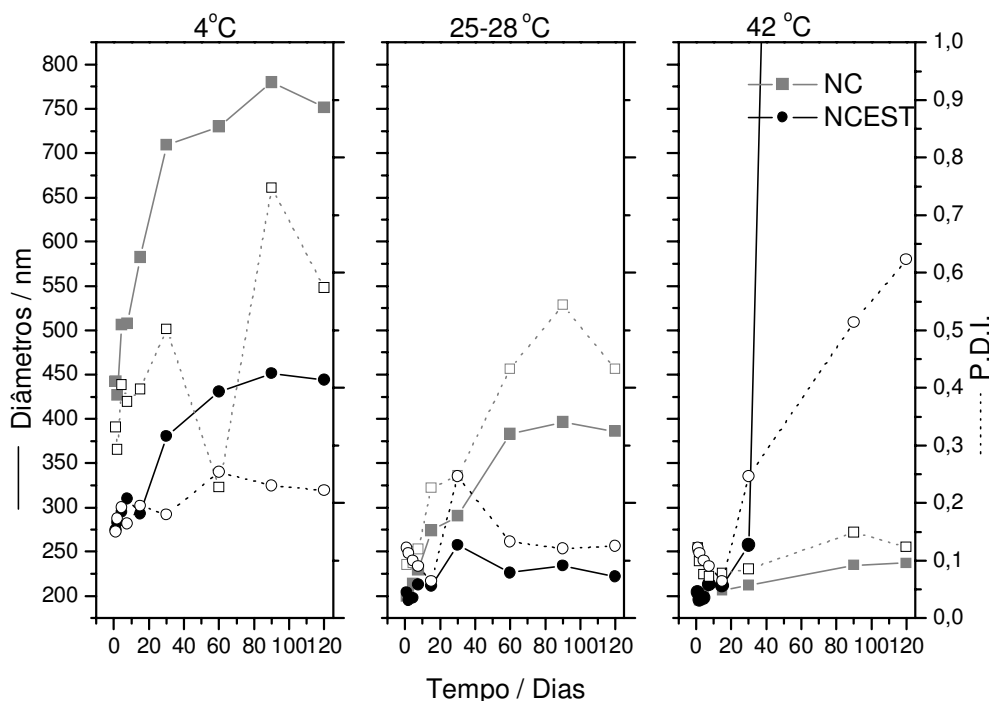


Figura IV.20: Distribuição de diâmetros de nanocápsulas de palmitato de retinila em relação ao tempo. NC = nanocápsulas sem estabilizantes; NCEST = nanocápsulas com BHT e Tinogard Q.

A estabilidade física das nanocápsulas também foi avaliada em equipamento Turbiscan LAb por 24 h, em formulações empregando Tween 80 como surfactante. O princípio de funcionamento do equipamento é a incidência de um feixe de luz (880 nm) sobre a amostra e medidas do retroespalhamento (detector a 45°) ou das transmitâncias (detector a 180°). O esquema experimental do Turbiscan é apresentado na Figura IV.21. Tal equipamento faz a previsão da estabilidade das partículas em tempos maiores, uma vez que detecta mínimos fenômenos de agregação, *creaming* ou sedimentação. A principal vantagem dessa técnica é a detecção de fenômenos de instabilidade muito antes da observação visual do analisador, especialmente no caso de sistemas opacos e concentrados (BURON e col., 2004; MENGUAL e col., 1999).

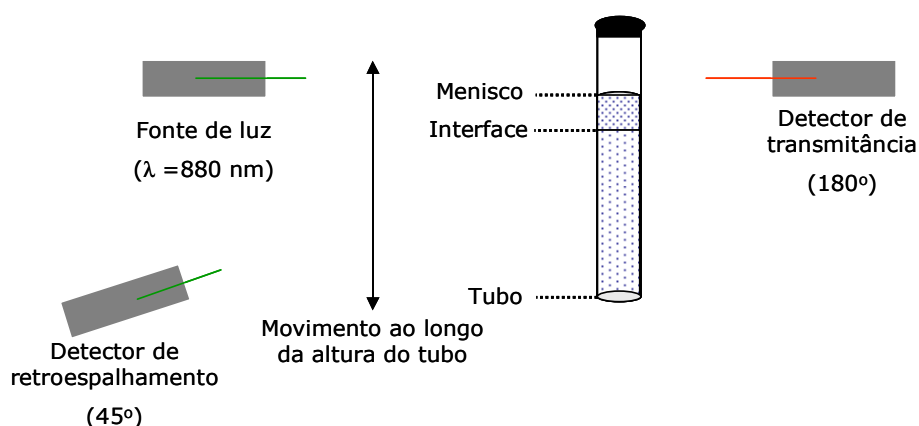


Figura IV.21: Esquema operacional do equipamento Turbiscan.

Na figura IV.22a, da esquerda para direita, observam-se as variações de retroespalhamento ao longo da cubeta. Variações na base, no meio e no topo da cubeta, normalmente referem-se a fenômeno de sedimentação, coalescência e *creaming*, respectivamente. Para o sistema de nanocápsulas, observa-se *creaming* da suspensão. Observa-se uma clarificação no início da cubeta que é relacionado à migração das partículas para a parte superior.

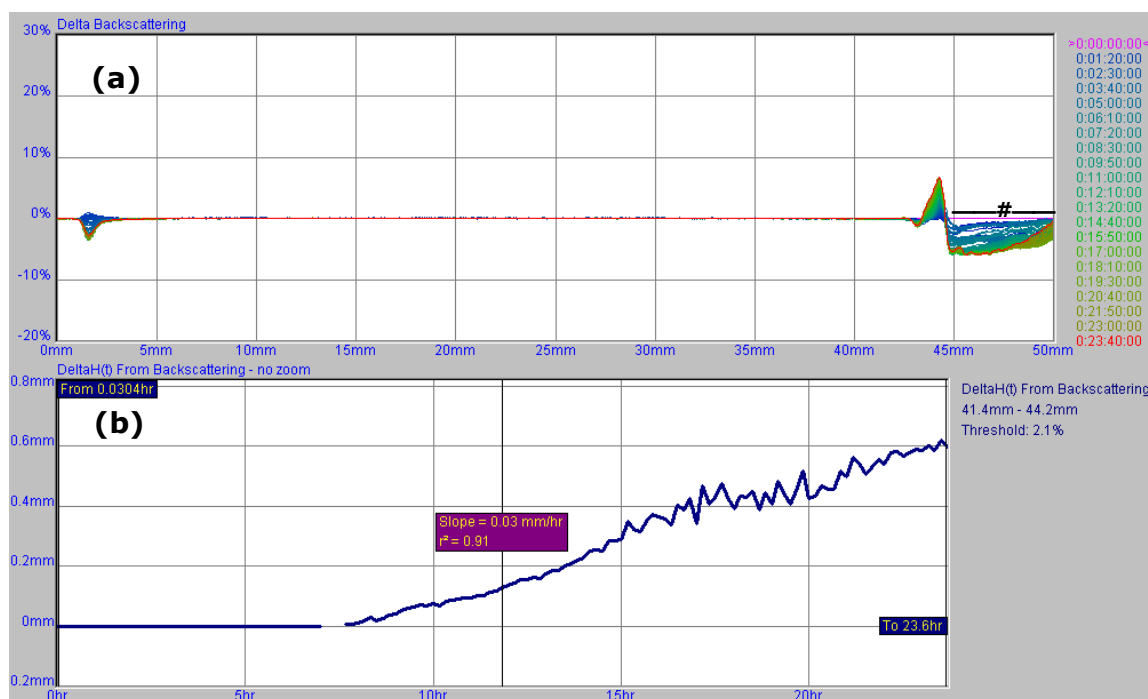


Figura IV.22: (a) Variações de retroespalhamento (eixo Y) ao longo da cubeta (eixo X de 0 a 50 mm). (b) Observação da cinética de *creaming* (altura da cubeta *versus* tempo). (# variações devidas ao menisco)

A variação de *backscattering* (BS) foi inferior a 0,01 %, o que indica que nas condições de análise, nenhuma variação significativa do tamanho de partícula foi detectada (ou seja, não há formação de agregados). A ocorrência de *creaming* possivelmente está relacionada com a variação na distribuição de tamanhos de partículas, sendo que conforme mencionado anteriormente espera-se uma densidade para as nanocápsulas de palmitato de retinila menores ou iguais a $1,01 \text{ g cm}^{-3}$. A formação de nanoemulsões em pequena proporção pode estar presente no sistema, o que também contribuiria para este fenômeno. Cabe mencionar que na avaliação da cinética de *creaming* (Figura IV.22 b) observou-se uma migração de partículas mais rápida nos tempos iniciais da medida, tendendo a um platô entre 15 h e 24 h.

IV.8 Caracterização Morfológica das Nanocápsulas por FFEM e TEM

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) geralmente é a técnica de escolha aplicada na caracterização de nanopartículas poliméricas na avaliação de sua forma e tamanho de partículas. O diferencial desta técnica consiste na possibilidade de se distinguir nanocápsulas de nanoesferas e nanoemulsões. Na TEM, a técnica de criofatura também tem sido bastante empregada para o auxílio da análise morfológica o que possibilita uma estimativa das espessuras de paredes de nanocápsulas (BENITA e MAGHENHEIM, 2001).

A Figura IV.23 ilustra as imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão após fratura criogênica (FFEM). Esta técnica mostra-se de grande relevância na caracterização do sistema quanto à morfologia da parede polimérica. RÜBE e col. (2005) mediram a parede polimérica de nanocápsulas do óleo Miglyol 812 (comumente empregado na formação das nanocápsulas como carreador de ativos lipofílicos). Em tal trabalho, os autores observaram espessuras de paredes de 10 nm, o que foi corroborado por análise de espalhamento de nêutrons em pequenos ângulos (SANS). Em nosso sistema,

foi observado que a parede polimérica possui espessura que varia de acordo com o tamanho da partícula, sendo que partículas menores possuem parede polimérica menos espessas do que as maiores, obedecendo aproximadamente a razão das frações molares óleo:polímero, com espessuras de parede variando entre 5 e 9 nm. A parede polimérica foi atribuída à borda indicada pelas setas nas Figuras, enquanto que a parte mais clara (Figura IV.23a) provavelmente foi a parte em que ocorreu a remoção do polímero na fratura.

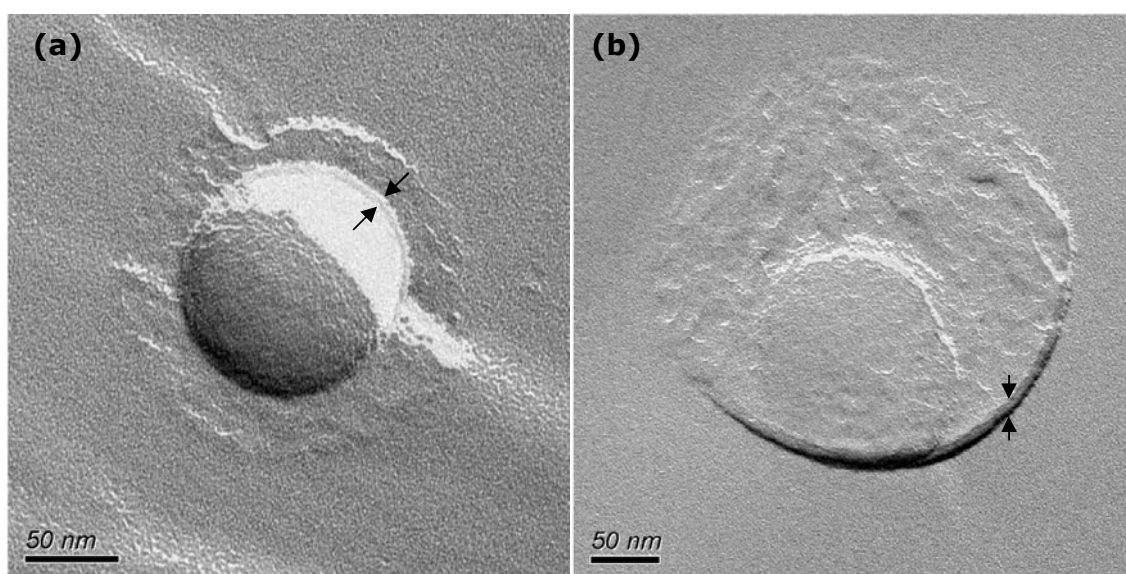


Figura IV.23: Análise morfológica das nanocápsulas por FFEM.

A Figura IV.24 apresenta a imagem TEM das nanoesferas de: (a) branco (surfactantes hidrofílicos) (b) niossomas (sem polímero e óleo), (c) nanoesferas (branco sem óleo), (d) da nanoemulsões (sem polímero) e (e) nanocápsulas. Algumas amostras apresentaram esferas bem pequenas (em torno de 20 nm). No entanto a Figura IV.24 (a) mostra que essas esferas são Pluronic (surfactante hidrofílico) secos sobre porta-amostras ou artefato.

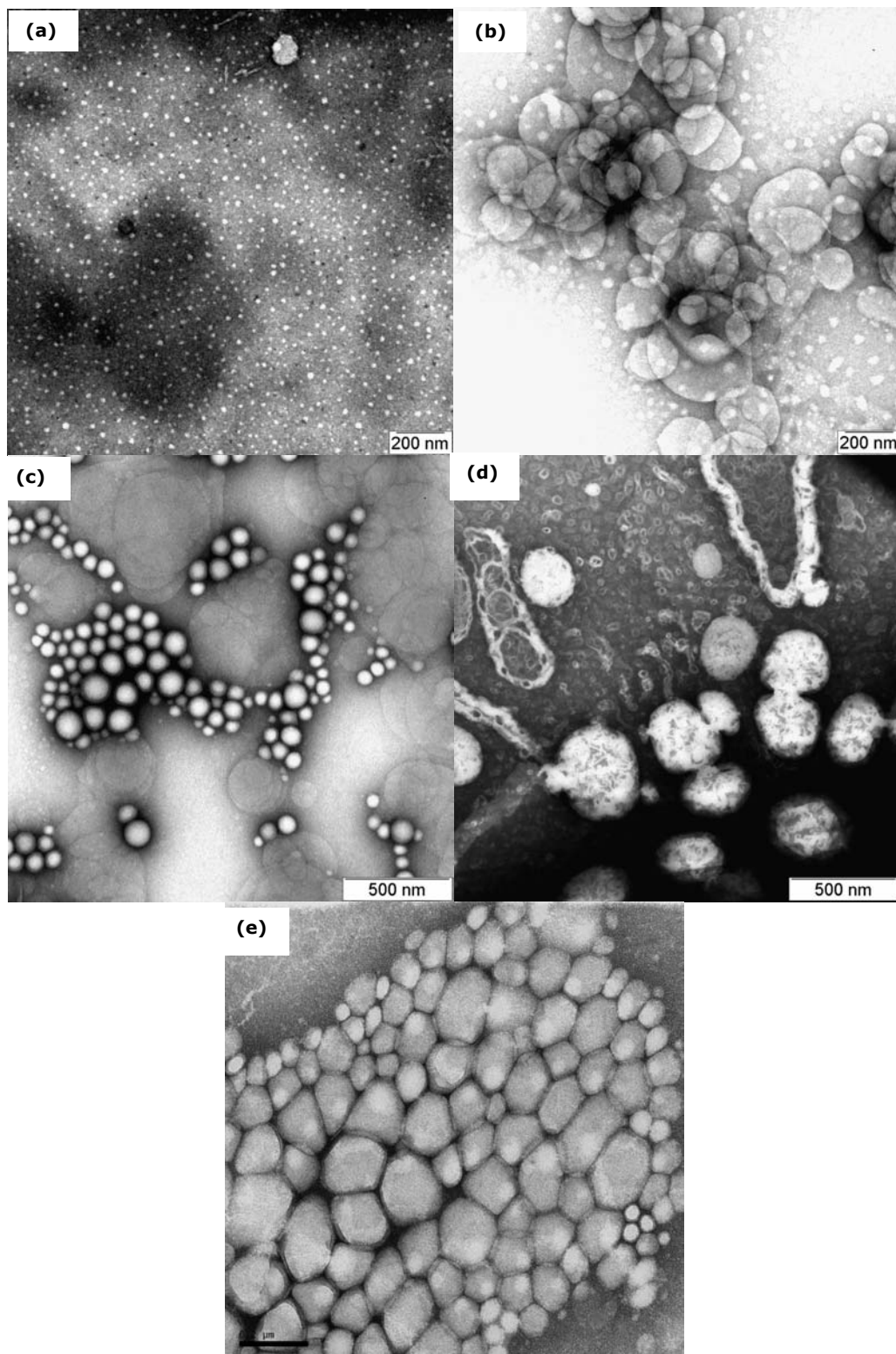


Figura IV.24: Imagens TEM de (a) branco , (b) Niossomas, (c) Nanoesferas, (d) Nanoemulsões e (e) Nanocápsulas.

A amostra de nanocápsulas não é totalmente homogênea, observando-se esferas menores (Figura IV.24e) que podem ser devidas à formação de nanoesferas ou ainda vesículas do surfactante lipofílicos Span 60. A formação de vesículas de surfactante é descrita na literatura possibilitando a preparação de sistemas de liberação sustentada (LAWRENCE, 1994). Observa-se, portanto, que o sistema de nanocápsulas pode apresentar-se como um sistema multicomponente onde as melhores condições são empregadas para que se tenha majoritariamente a formação de nanocápsulas, não impedindo, no entanto, a co-existência de outras fases com menores populações. Observa-se que ao contrário das nanoesferas e nanoemulsões, as nanocápsulas apresentam característica de deformação, sendo que ao secar sobre o porta-amostras, o efeito de adesão capilar permite que elas se deformem sem que ocorra coalescência das partículas. O mecanismo de adesão capilar na secagem das amostras é ilustrado na Figura IV.25.

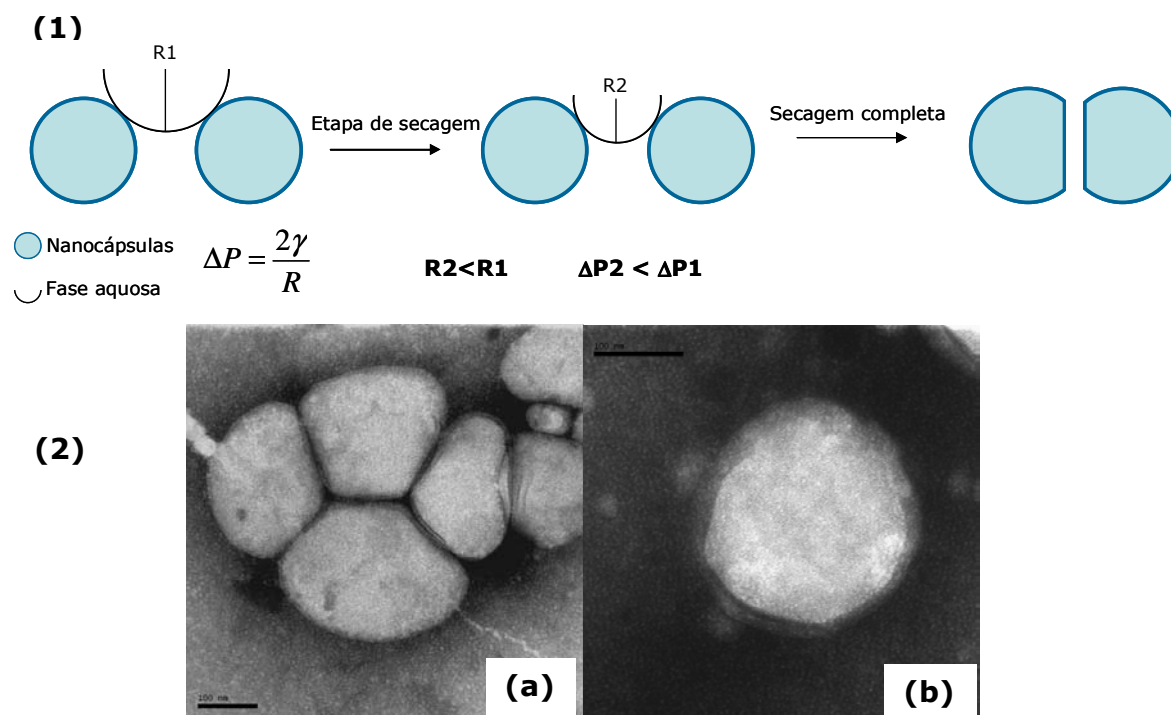


Figura IV.25: Mecanismo proposto para a secagem de partículas: (1) adesão capilar segundo a equação I.7 de Young-Laplace; (2) comprovação do mecanismo através da comparação entre (a) amostras secas com vizinhança e (b) amostras secas isoladas.

Durante o processo de secagem da amostra (Figura IV.25-1), ocorre a diminuição dos raios dos meniscos formados pela fase aquosa que molha as partículas. Conforme mencionado no item 1.5, a diminuição do raio ocasiona um aumento da força de adesão capilar (ΔP), sendo dependente apenas da tensão interfacial e do raio, segundo a equação de Young-Laplace (I.7), de maneira que a pressão externa é maior do que a pressão interna nas partículas, o que, neste caso, foi suficiente para causar deformação das nanocápsulas. Esse mecanismo pode ser comprovado através da Figura VI.25-2 em que se observa que as partículas secas sobre o porta-amostras não apresentaram deformação na ausência de partículas vizinhas, portanto sem formação de capilar, mantendo a morfologia esférica.

O único estudo similar encontrado na literatura até o momento é de RASTOGI e col. (2009) no sistema de vesículas poliméricas (em fase aquosa) obtidas por auto-organização do copolímero em bloco policaprolactona-polietilenoglicol-policaprolactona. Nesse estudo, os autores sugerem que devido à flexibilidade das partículas, esses polimerossomas podem ser empregados para direcionamento a células basais de melanoma.

IV.9 Estudo de Permeação em Membrana Sintética

Em vista da observação de deformação das nanocápsulas, decidiu-se estudar a possibilidade da passagem por poros de menores diâmetros. A pele humana possui poros com diâmetros médios de 30 nm, com uma pressão transepidérmica de 2,5 atm. Dessa forma, montou-se um experimento visando mimetizar a passagem das partículas pela pele. Utilizaram-se duas membranas sobrepostas de policarbonato para simulação da tortuosidade da pele em duas pressões diferentes 2,5 e 6,0 atm geradas por $N_{2(g)}$. Em princípio, as nanocápsulas não passaram pela membrana, sendo que somente algumas esferas menores do que 50 nm permearam a membrana. A maior parte da fase aquosa ficou retida sobre o filtro, mostrando baixa molhabilidade do sistema. A seguir, utilizou-se PEG-8L a 0,2% (m/V) que é amplamente

empregado para a produção de lipossomas elásticos (CEVC e BLUME, 1992). Desta forma, a passagem das nanocápsulas (e todo o volume de suspensão) através dos poros foi possível, sendo que os resultados de tamanhos por intensidade são apresentados na Tabela IV.6.

Tabela IV.6: Dados de diâmetros em estudo de permeação em membranas sintéticas.

	Diâmetros em intensidades / nm (P.D.I.)		
	diâmetros das suspensões	Filtrado	Retido no filtro
NC	227,(0,116)	1421,0 (1,00)	231,6(0,161)
NC + PEG-8L 2,5 atm	220,0 (0,114)	296,0 (0,540)	604,3(0,606)
NC + PEG-8L 6,0 atm	215,7 (0,066)	295,7 (0,268)	608,1(0,553)

Para uma melhor ilustração, os resultados são apresentados na forma de gráficos na Figura IV.26.

Como partículas maiores espalham mais luz do que partículas menores (intensidade é diretamente proporcional a d^6), algumas vezes em sistemas polidispersos, usa-se o diâmetro das partículas em número, de maneira que a distribuição de partículas não muda, mas a população majoritária (máximo na distribuição), normalmente se desloca para valores de menores diâmetros (MALVERN INSTRUMENTS). Pode-se observar que, apesar dos valores por intensidade para a parte superior (não filtrada) serem maiores do que os de intensidades iniciais verifica-se por número que, na verdade, as partículas de menores tamanhos (possivelmente mais rígidas segundo as imagens TEM, Figura IV.24) ficaram retidas no filtro.

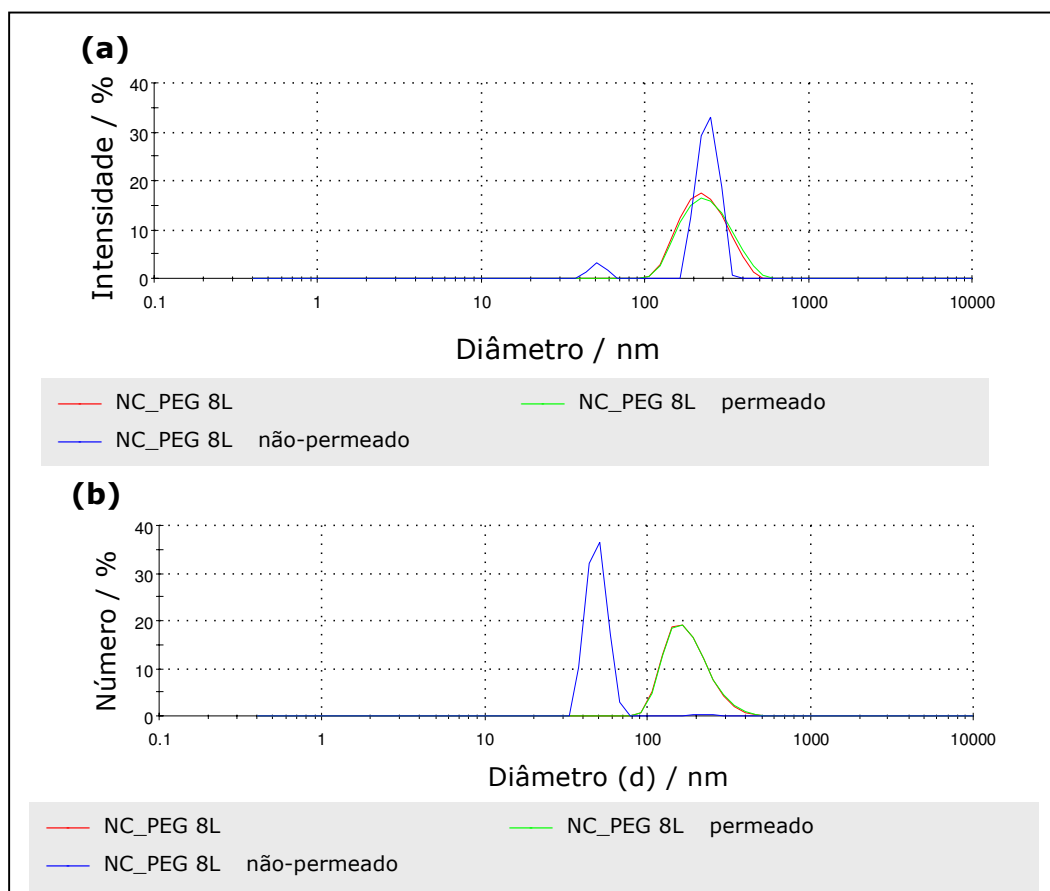


Figura IV.26: Distribuição de diâmetros (a) por intensidade e (b) por número das nanocápsulas anterior a permeação (NC PEG40), após a permeação (NCPEG40 permeado) e partículas retidas no filtro (NCPEG não-permeado) (2,5 atm).

A Figura IV.27 apresenta as imagens TEM para as partículas extrudadas (Figura IV.27a) e retidas na membrana (Figura IV.27b). As imagens de TEM corroboram com os resultados obtidos por DLS, ou seja, partículas em torno de 220 nm se deformam e passam em poros menores. Além disso, retornam a uma configuração próxima da inicial (esférica), sugerindo característica elástica ao sistema. Partículas de menores tamanhos (mais rígidas) ou de tamanhos superiores a 300 nm ficam retidas no filtro.

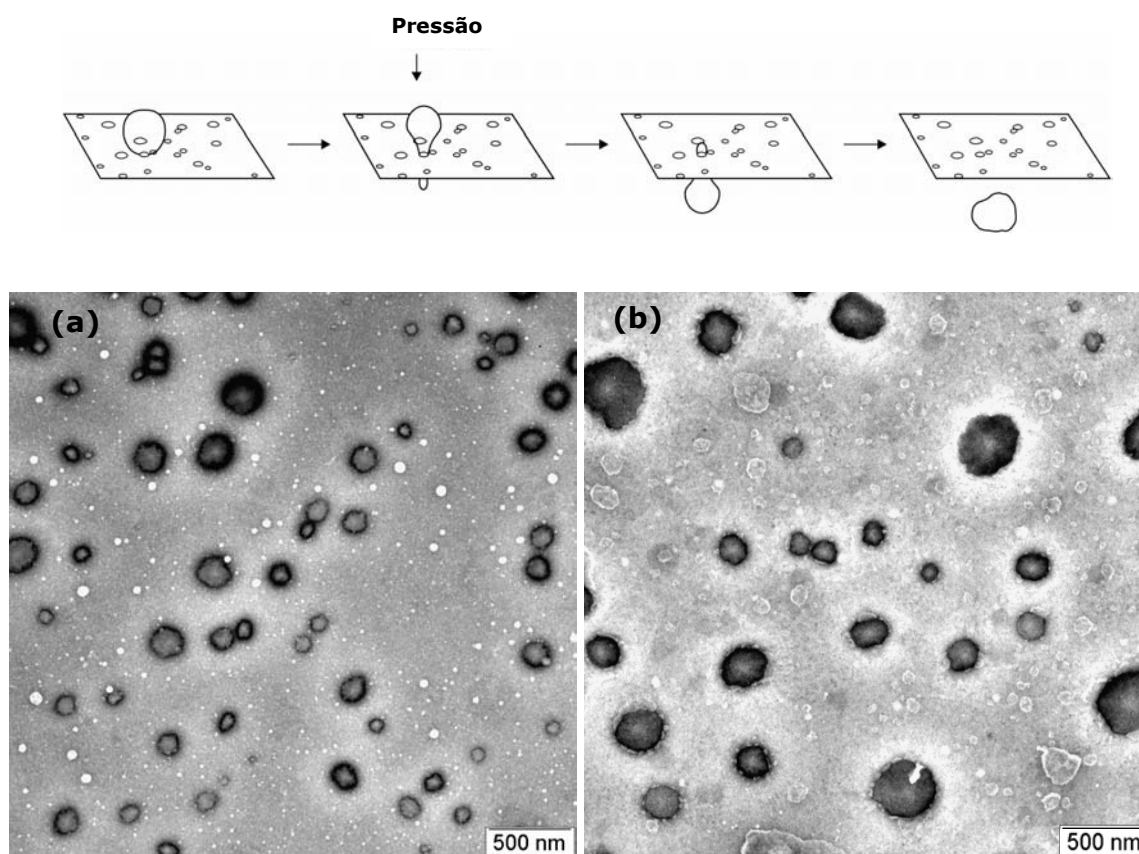


Figura IV.27: Imagens TEM das nanocápsulas após o experimento de permeação: (a) permeado; (b) retido no filtro.

Os dados das Figuras IV.25-IV.27 permitem sugerir que o sistema de nanocápsulas apresenta característica elástica, tendo em vista que a diferença de pressão originada pela diminuição das gotas durante o processo de secagem das partículas sobre o porta-amostra (forças de adesão capilar, ΔP), além da pressão transepidermica nos ensaios em membranas sintéticas, são suficientes para deformar as partículas.

HONEYWELL-NGUYEN e col. (2003) investigaram as possibilidades de permeação de lipossomas utilizando PEG-8L. A primeira possibilidade seria de que o PEG-8L tivesse ação como "*penetration enhancer*", permitindo a passagem dos lipossomas através da camada córnea. A segunda, seria de que o PEG pudesse atuar como carreador do fármaco, sendo que o lipossoma estaria na superfície da pele após permeação. Para investigação destas possibilidades, utilizou-se a pele pré-tratada com PEG-8L (anteriormente a

aplicação das vesículas sem o PEG), um sistema de micelas de PEG-8L sem lipossomas, e aplicação de vesículas com diferentes eficiências de encapsulamento. Como resultados, o pré-tratamento da pele com PEG-8L não resultou em aumento da permeação, sugerindo que o PEG não desestrutura a camada córnea e que deve estar na camada superficial dos lipossomas. Os autores observaram que as vesículas contendo PEG-8L são 5 vezes superiores às micelas de PEG-8L na permeação em pele, ou seja, o carreamento da droga é possivelmente pelos lipossomas. Altas eficiências de encapsulamento resultaram em maior penetração da droga, evidenciando que a droga livre em suspensão permeia menos, ou seja, de fato os lipossomas elásticos aumentam o carreamento para camadas mais profundas da pele. Dessa forma, sugeriu-se que a maior permeação dos lipossomas é devido à propriedade elástica do sistema.

Em nosso trabalho, cabe mencionar que o PEG-8L, apesar de ser empregado acima de sua cmc não é detectado por DLS quando filtrado devido à diluição posterior do filtrado para análise, ou seja, as partículas medidas na suspensão são de fato as nanocápsulas. Apesar da característica elástica das nanocápsulas, há a necessidade de uso do PEG-8L para passagem em poros sintéticos, a qual possivelmente pode estar relacionada com fenômenos de repulsão capilar devido a baixa molhabilidade das partículas para passagem pelos poros de menores tamanhos na ausência desse surfactante.

IV.10 Caracterização da Formulação Semi-Sólida

Para avaliação de uma potencial aplicação das nanocápsulas em formulações dérmicas ou cosméticas, incorporou-se a suspensão de partículas em gel de Carbopol 940, sendo que nesse caso, torna-se importante avaliar se o comportamento reológico do semi-sólido é afetado pela incorporação das nanoestruturas. O comportamento reológico das formulações através das curvas de histerese apresentado na Figura IV.28.

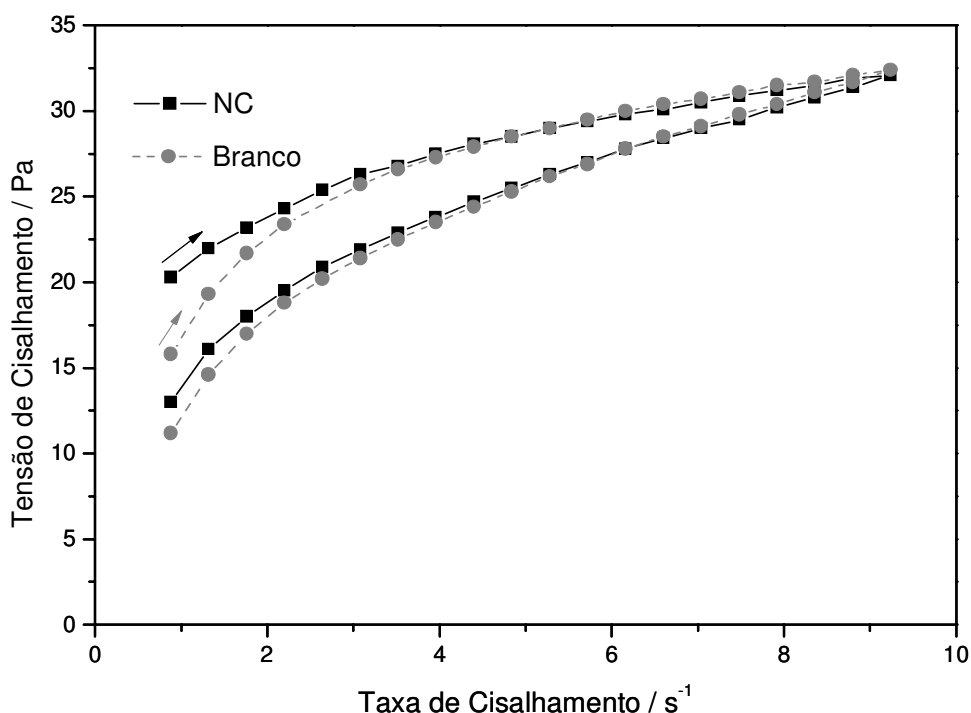


Figura IV.28: Curvas de histerese do comportamento reológico das nanocápsulas incorporadas ao gel (NC) em comparação com o branco (gel sem a adição das nanocápsulas).

(→ = ponto inicial)

O tipo de gel empregado influencia o comportamento reológico e estabilidade física do produto, bem como age como um meio de liberação dos ativos incorporados. O tipo de matriz empregada, Carbopol, pertence à classe de polímeros acrílicos ácidos que se transformam em géis na neutralização em meio aquoso devido a mudanças na conformação das cadeias poliméricas. Os carbopóis apresentam comportamento não newtoniano, o qual é caracterizado por uma dependência não linear entre a taxa de cisalhamento, $\dot{\gamma}$, e a tensão de cisalhamento, τ (KIM e col., 2003). Fluxos não newtonianos podem ainda ser caracterizados por três tipos de curva: plástica, pseudoplástica e dilatante, sendo que os carbopóis geralmente apresentam comportamento pseudoplásticos (CORRÊA e col., 2005). As curvas de tensão de cisalhamento por taxa de cisalhamento podem ser descritas por equações de Bingham (linear, comportamento plástico perfeito), Casson (linear com as raízes quadradas, plástico), Ostwald (modelo exponencial, pseudoplástico) e

Herschel-Burkley (modelo exponencial, pseudoplástico com valor de cedência). Os modelos de Ostwald e Herschel-Burkley geralmente são os que melhor descrevem as curvas de carbopóis (KIM e col., 2003):

$$\tau = \tau_o + n\gamma \text{ (Bingham)} \quad (\text{IV.6})$$

$$\tau^{0,5} = \tau_o^{0,5} + n^{0,5}\gamma^{0,5} \text{ (Casson)} \quad (\text{IV.7})$$

$$\tau = K\gamma^n \text{ (Ostwald)} \quad (\text{IV.8})$$

$$\tau = \tau_o + K\gamma^n \text{ (Herschel-Burkley)} \quad (\text{IV.9})$$

onde n = índice de potência e K = consistência (Pa s^n), e τ_o = valor de cedência (KIM e col., 2003)

Os modelos para as curvas da Figura IV.28 foram de Ostwald e Herschel-Burkley para o gel com e sem nanocápsulas (Tabela IV.7).

Tabela IV.7: Modelagem do comportamento reológico do gel de carbopol contendo as nanocápsulas (NC) e gel contendo surfactante (Branco).

Modelo	Formulação de Carbopol	
	Branco	NC
Fator de regressão linear, R^2 (#)	0,9991	0,9994
Consistência, K / (Pa s^n)	$20,5 \pm 0,1$	$20,3 \pm 0,6$
Índice de fluxo, n	$0,206 \pm 0,002$	$0,195 \pm 0,002$

(#) (ajuste ao modelo)

Os géis pseudoplásticos têm como principal característica a diminuição da viscosidade aparente com o aumento da tensão de cisalhamento. Esse comportamento reológico é de grande importância para produtos cosméticos durante a aplicação tópica, podendo ser classificado como de fácil aplicação. Além disso, os géis são tixotrópicos que significa “mudança com o toque”. Esse termo normalmente é associado ao comportamento pseudoplástico, tendo como vantagens um maior tempo de prateleira por apresentarem viscosidades constantes durante o armazenamento, o que dificulta a separação dos constituintes. Após a deformação durante a aplicação tópica, o produto

recupera a viscosidade inicial o que evita que o produto escorra. Os valores de tixotropia não devem ser muito altos para que o produto escorra após a aplicação devido ao longo tempo para recuperar a configuração original e nem muito baixo para não dificultar a aplicação (CORRÊA e col., 2005). Qualitativamente, podemos observar a formulação do gel de nanocápsulas apresenta uma tixotropia adequada devido à pequena mudança nas viscosidades observadas através da curva de histerese (Figura IV.28).

ALVES e col. (2005) estudaram o comportamento reológico de géis de carbopol incorporando nanocápsulas, nanoemulsões e nanoesferas, encapsulando nimesulida (polímero PCL e óleo Miglyol), sendo que as nanopartículas não alteraram significativamente as características reológicas do sistema. Os comportamentos observados foram pseudoplásticos, melhor ajustados no modelo de Ostwald para todas as formulações.

Em nossas formulações, na comparação entre Branco e nanocápsulas, observamos uma diferença apenas no comportamento inicial da formulação contendo somente surfactantes, o qual segue o modelo de Herschel-Burkley (apresentando um valor de cedência). Esse comportamento pode ser devido à organização do surfactante, o qual foi empregado acima da cmc podendo desestruturar o gel.

A incorporação de surfactantes como Pluronic F127 e Tween 80 em géis de Carbopol 934® alteraram as características reológicas e difusão de nanopartículas de poliestireno de 162 nm de diâmetro. Em pequenas concentrações (abaixo da cmc), os surfactantes aumentaram a viscosidade e elasticidade do sistema. Moléculas de surfactante formam micelas interpoliméricas e criam uma estrutura tridimensional mais conectada do que apenas as redes de Carbopol. O volume livre entre as cadeias de carbopol é pouco alterado de maneira que não afeta a difusão das partículas de poliestireno. Quando a concentração de surfactantes é maior, acima da concentração de agregação crítica, ocorre a formação de micelas intrapoliméricas e diminui a conexão interpolimérica (rompendo pontos da rede tridimensional). Desta forma, a macroviscosidade do sistema diminui, porém a difusão das partículas se torna mais lenta devido ao caminho mais

tortuoso devido às micelas ou agregados de carbopol/surfactantes (BARREIRO-IGLESIAS, 2001).

Em nosso sistema, sugere-se que a introdução de partículas no sistema atue de maneira semelhante à diminuição da concentração de surfactantes (tendo em vista que parte do surfactante está localizado na superfície das partículas). Desta forma, observa-se uma tensão de cisalhamento inicial um pouco maior no caso das nanocápsulas em relação ao branco.

IV.11 Obtenção das Nanocápsulas de Palmitato de Retinila no Encapsulamento da Benzofenona-3 e Baicaleína

Dois bioativos modelos foram encapsulados no sistema de nanocápsulas deformáveis: o filtro UV benzofenona-3 (BZ3) e o flavonóide baicaleína (BAI). O método experimental consistiu na solubilização do bioativo na fase orgânica na preparação das nanocápsulas.

A Tabela IV.8 mostra as principais características físico-químicas do sistema (distribuição de diâmetros e potencial zeta) e a incorporação de bioativos com alta eficiência de encapsulamento. O sistema de nanocápsulas apresenta como principal vantagem uma maior incorporação da droga em relação a nanoesferas. A incorporação da droga não alterou significativamente os diâmetros de partículas e potencial zeta.

Tabela IV.8: Valores de diâmetros e potencial zeta para as preparações nanoesferas (NS) e nanocápsulas (NC) no encapsulamento dos ativos BAI e BZ3.

Formulação	Eficiência de Encapsulamento %	Diâmetros das suspensões / nm (PDI)	Potencial Zeta / mV
NCBZ3	99,8	210,7 (0,06)	-17,0 ± 1,0
NSBZ3	99,7	112,2 (0,04)	-27,5 ± 2,1
NCBAI	99,6	226,2 (0,14)	-26,7 ± 6,6
NSBAI	95,6	154,7 (0,04)	-11,1 ± 5,1

Tais resultados mostram que o sistema de NC é bastante eficiente como sistema reservatório de bioativos.

IV.12 Análise Térmica Diferencial das Nanocápsulas

Técnicas de análises térmicas têm sido empregadas para definir possíveis interações entre princípio ativo e polímeros em sistemas poliméricos no encapsulamento, além de fornecer informações importantes concernentes a dispersões moleculares ou estados físicos de princípios ativos (BENITA E MAGHENHEIM, 2003).

MU e FENG (2003) avaliaram as curvas de DSC de nanopartículas de PLGA recobertas com o surfactante succinato de polietilenoglicol α -tocoferol (TPGS), sendo que o comportamento das nanopartículas foi próximo ao dos materiais sólidos amorfos, sem pico de fusão adicional.

GÓMEZ-GAETE e col. (2007) avaliaram nanopartículas de PLGA encapsulando dexametasona, sendo que não foi observado nenhum evento que pudesse ser atribuído à interação droga-polímero, indicando que a droga está molecularmente dispersa ou a quantidade encapsulada é muito baixa para indicar qualquer alteração. Foram detectados cristais de dexametasona na suspensão, além da eficiência de encapsulamento ter sido baixa: 0,2 mg de droga em 100 mg de polímero, sendo que foram adicionados 5 mg de droga na preparação.

A caracterização das nanoestruturas por calorimetria diferencial de varredura (DSC) é apresentada na Figura IV.29, a qual indica um ponto de fusão adicional (evento endotérmico) nas partículas (próximo a 30 °C). Tal evento poderia ser atribuído ao palmitato de retinila, tendo em vista que sem a adição de BHT sua fusão ocorre a 28 °C. Entretanto, este pico também é observado nas nanoesferas (apesar de estar deslocado para temperaturas um pouco maiores).

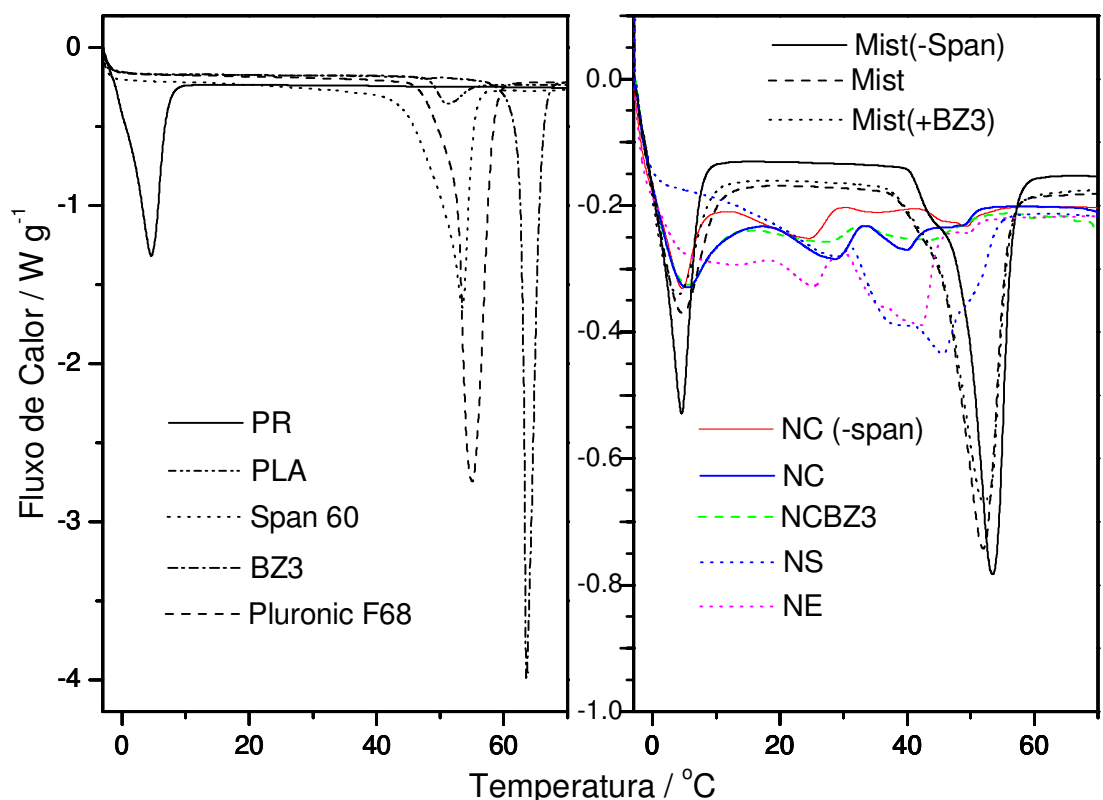


Figura IV.29: Gráficos de DSC para as matérias primas utilizadas, misturas físicas e nanoestruturas. Mist(-span)= mistura física de palmitato de retinila (PR), PLA e Pluronic F68 (sem Span 60); Mist= mistura física; Mist(+BZ3)= adição de benzofenona-3.; NC(-span)= nanocápsulas sem Span60; NC = Nanocápsulas; NCBZ3= nanocápsulas encapsulando BZ3; NS = nanoesferas; NE= nanoemulsões.

A mistura física apresenta comportamento térmico que difere das nanoestruturas e se assemelha a soma das matérias-primas. Como molécula modelo, supostamente solubilizada no palmitato de retinila, utilizou-se a BZ3. Observa-se, no entanto, que para a mistura física e nanoestruturas, não ocorre deslocamento significativo nos fenômenos físicos observados, o que pode ser devido a baixa concentração da BZ3 em relação aos demais componentes da formulação. Comparando-se as nanocápsulas com e sem Span 60, observa-se que ocorre um alargamento no pico de fusão do palmitato de retinila quando se emprega este surfactante lipofílico o que pode ser atribuído a sua solubilização no núcleo oleoso. Além disso, ocorre um abaixamento na temperatura dos eventos subsequentes (fusão) que pode ser relacionado à

menor temperatura de fusão do Span 60 em relação ao surfactante hidrossolúvel e polímero.

IV.13 Estudos de Liberação *In Vitro*

Além da possibilidade de associação com outros ativos, investigou-se também uma vantagem adicional das nanocápsulas em relação às nanoemulsões que consiste, supostamente, em uma liberação mais lenta do ativo nas nanocápsulas devido à presença da parede polimérica, similarmente ao observado na liberação de xantona em nanocápsulas e nanoemulsões de PLGA (TEIXEIRA e col., 2004).

Os estudos de cinética de liberação *in vitro* dependem do estado físico das moléculas encapsuladas no carreador coloidal. Cinéticas diferentes de liberação são esperadas de drogas solubilizadas em um núcleo oleoso nas nanocápsulas ou molecularmente dispersas em uma matriz polimérica. A caracterização da liberação de drogas sob condições *sink* (de não-saturação da droga no meio) é tecnicamente difícil de ser obtida. Isto pode ser atribuído a dificuldade de se separar efetivamente e rapidamente as partículas de droga dissolvida ou liberada na solução *sink* devido às pequenas dosagens. Esforços têm sido feitos para avaliar a liberação de drogas utilizando várias técnicas como tubo de diálise sob ambas as condições dinâmica ou estática. Além disso, filtros e membranas devem ser empregados de maneira que se evitem perdas por degradação ou adsorção de partículas de fração de droga liberada. Os principais métodos para estudos de liberação *in vitro* são: tubo de diálise sob condições dinâmicas ou estáticas e técnicas de separação baseadas em filtração ou ultracentrifugação (BENITA e col., 1991; SOPPIMATH e col., 2001).

O perfil de liberação *in vitro* (através de membrana de diálise) em condições *sink* é apresentado na Figura IV.30. As nanocápsulas apresentam o perfil de liberação mais lento enquanto que a nanoesferas apresentam perfil lento no início, mas ao final do período a liberação se acentua (quase 100% do ativo).

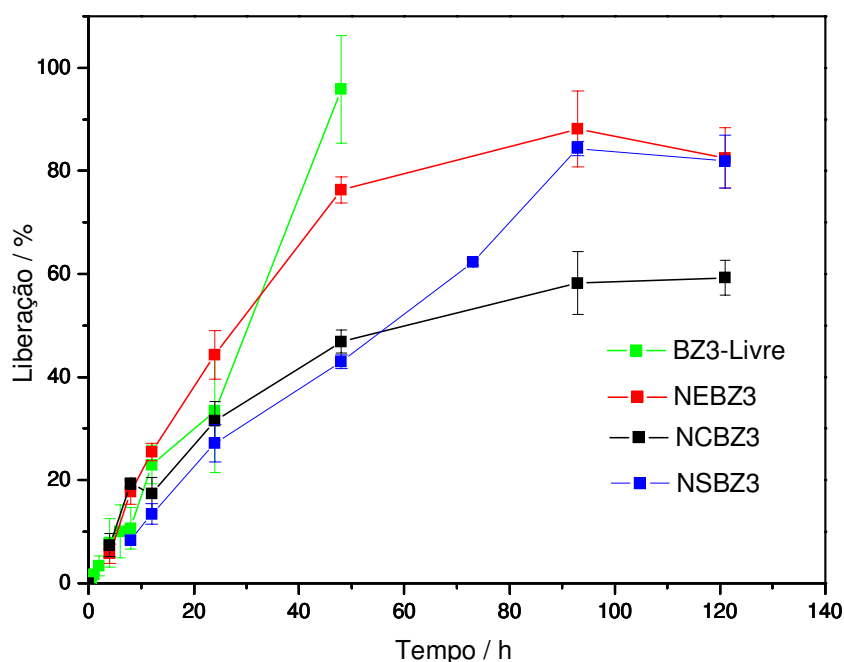


Figura IV.30: Perfil de liberação da benzofenona (BZ3) livre, incorporada em nanoemulsões (NEBZ3), nanocápsulas (NCBZ3) e nanoesferas (NSBZ3).

A liberação de ativos encapsulados pode ser tanto por erosão quanto por difusão (HOLLAND e TIGHE, 1992). No geral, no entanto, observa-se que a difusão é a principal força dirigente para a liberação tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Além disso, cabe mencionar que um efeito *burst* acentuado não é observado nos sistemas propostos devido à alta eficiência de encapsulamento, ou seja, não há uma proporção significativa de fármaco livre ou adsorvido para elevar acentuadamente a concentração inicial em suspensão. Mesmo o fármaco livre, apresenta uma dissolução relativamente lenta por ter sido empregado na forma cristalina, ou seja, a liberação no caso envolveu a dissolução dos cristais. Como exemplo da literatura, MUSUMECI e col. (2006) observaram uma fase *burst* próxima a 50% nas primeiras 24 h em nanopartículas de PLGA e PLA encapsulando docetaxel. As eficiências de encapsulamento nesses sistemas, no entanto, foram bem menores, entre 10% e 23% para massas de droga de 0,5 % e 1% em relação à massa de polímero.

A liberação mais lenta do ativo nas nanocápsulas em relação às nanoemulsões pode ser devida à presença da parede polimérica. Em relação às

nanoesferas, atribui-se às diferenças observadas a diferentes interações ativos-óleo e ativo-polímero.

IV.14 Estudo de Permeação Cutânea em Célula de Difusão Vertical de Franz da Nanocápsulas

IV.14.1 Análise por HPLC

A Figura IV. 31 apresenta um conjunto de cromatogramas ilustrativos das análises feitas no estudo de permeação cutânea, mostrando que no tempo de retenção do palmitato de retinila (16,4 minutos), não há interferentes. Para otimização do método, as curvas de calibração foram construídas desde o limite de quantificação (200 ng mL^{-1}) a $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, mostrando uma ampla faixa de linearidade com R^2 superior ou igual a 0,99 em todas as curvas.

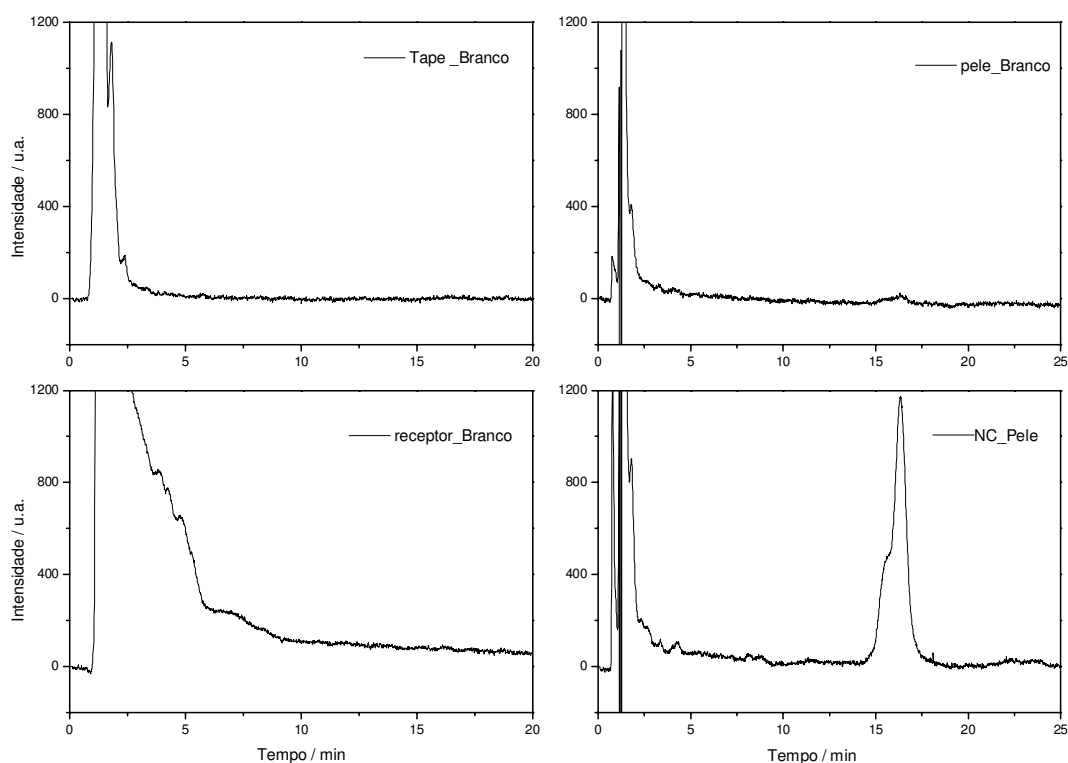


Figura IV.31: Ilustração de cromatogramas após os ensaios de permeação: *tape*, receptor e pele sem palmitato de retinila (Branco), e utilizando nanocápsulas de palmitato de retinila (NC_Pele).

A Figura IV.32 apresenta os resultados dos estudos de permeação em célula de difusão vertical de Franz das nanocápsulas incorporadas em gel de Carbopol após 24 h de experimento. As nanocápsulas atingem em alta concentração a epiderme viável e derme, além da solução receptora, indicando que as nanocápsulas apresentam permeação cutânea muito eficiente. Nestes experimentos, realizou-se a extração do ativo retido na camada córnea através da técnica de *tape stripping*. Na literatura são empregados entre 10 e 20 *tapes* (TOUITOU e col., 1998). Empregamos 20 *tapes* para garantia de remoção do máximo possível da camada córnea.

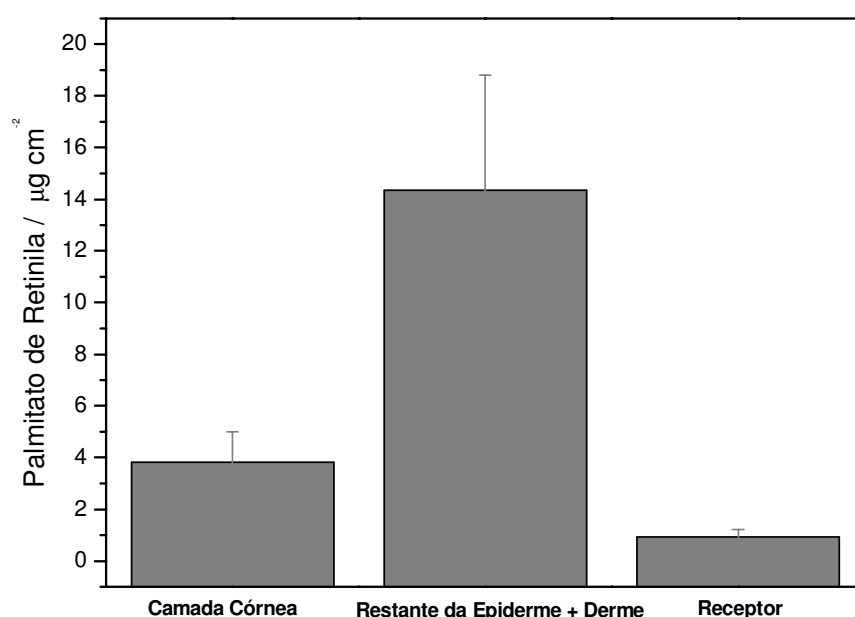


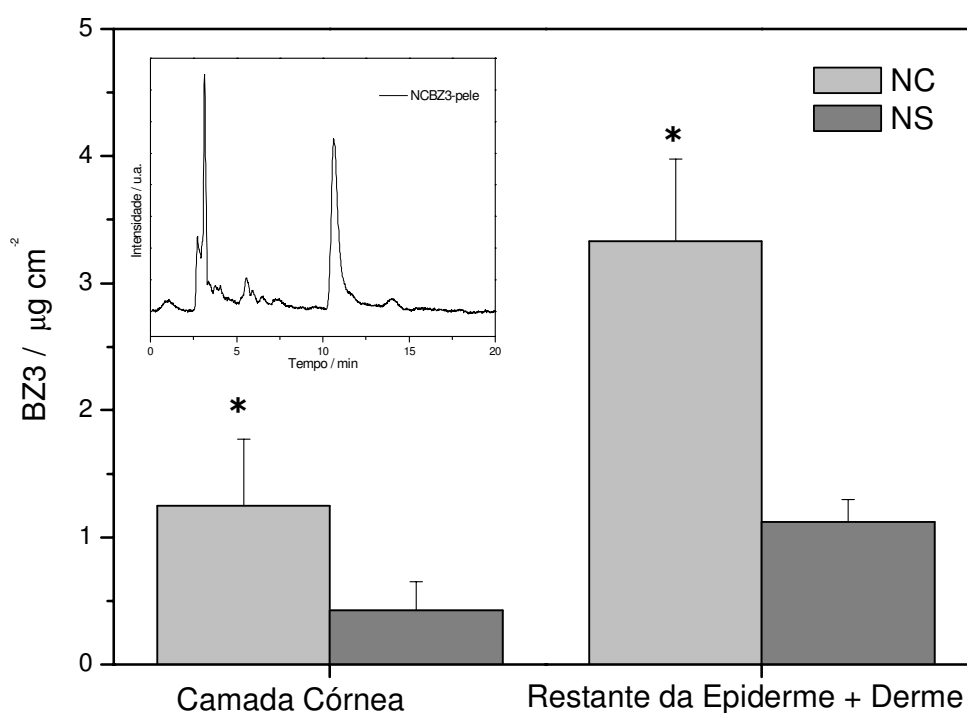
Figura IV.32: Permeação das nanocápsulas em pele humana abdominal após 24 h de permeação em célula de difusão vertical de Franz.

A pele é uma barreira bastante efetiva frente a permeação de diversas substâncias, sendo que a camada córnea (células anucleadas de queratinócitos) apresenta-se como a principal barreira quanto a permeação de ativos (ABURJAI e NATSHET, 2003). Uma vez que atinge-se camadas mais profundas da epiderme ou derme, o ativo pode facilmente atingir a corrente sanguínea (nesse caso mimetizado pela célula receptora). Quando a permeação é uniforme e o ativo não-tóxico, a quantidade em que se atinge a corrente sanguínea pode ser desprezível. Além disso, dependendo da ação desejada dos produtos dermatológicos ou cosméticos, faz-se necessário que o

ativo atinja as células viáveis da pele (queratinócitos na epiderme e/ou fibroblastos na derme).

No geral os retinóides apresentam baixa permeação em pele (GOLLNICKE col. 1997), sendo que o sistema de nanocápsulas mostra-se promissor para o carregamento do palmitato de retinila para camadas mais profundas da pele. Na literatura, as SLN também são relacionadas ao aumento da permeação do palmitato de vitamina A em pele (JENNING e col., 2000).

A permeação de ativos no sistema de nanocápsulas de palmitato de retinila foi avaliada empregando-se a BZ3 como molécula modelo tanto no sistema de nanoesferas quanto de nanocápsulas. A Figura IV.33 apresenta o resultado das análises com um cromatograma ilustrativo no *inset*, sendo que as curvas foram construídas na faixa de 100 ng mL^{-1} a $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (tempo de retenção= 10,7 min), e a análise quanto a possíveis interferentes também foi o parâmetro primordial na escolha do método.



* $P < 0,05$ versus o respectivo NS

Figura IV.33: Permeação da BZ3 encapsulada em nanoesferas (NS) e nanocápsulas (NC) em pele humana abdominal após 24 h de permeação em célula de difusão vertical de Franz.

Desta forma, observa-se que as nanocápsulas permitem uma maior permeação do ativo em relação à nanoesferas, o que pode ser devido a uma maior permeação do carreador (devido à flexibilidade das nanocápsulas) conforme os dados observados por TEM. Cabe mencionar que a BZ3 não foi detectada na célula receptora devido a baixa concentração utilizada. No caso do palmitato de retinila (Figura IV.32), pôde ser detectado na célula receptora por encontrar-se em uma concentração maior na formulação (15 vezes em massa).

O único estudo comparativo de nanoesferas e nanocápsulas na literatura, encapsulando nimesulida em PCL, também apresentou resultado de maior permeação da droga empregando o sistema de nanocápsulas (ALVES e col., 2007). Os autores sugeriram este fato a diferenças nos sistemas de liberação empregados (vesicular ou matriz polimérica).

IV.14.2 Avaliação por Microscopia de Varredura a Laser Confocal

A técnica de microscopia de varredura a laser confocal (CLSM) apresenta como principal vantagem a análise da amostra sem necessidade de congelamento ou evaporação, além da possibilidade de cortes em diferentes planos focais ao longo do eixo z (profundidade) (ALVAREZ-ROMÁN e col., 2004a).

Inicialmente avaliamos a integridade das peles utilizadas através da luz transmitida em cortes transversais da pele (Figura IV.34), indicando a diferença morfológica entre derme e epiderme.

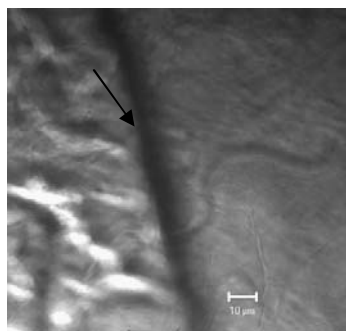


Figura IV.34: Corte transversal na pele indicando a integridade da epiderme e da derme. A seta indica a divisão entre derme (esquerda) e epiderme (direita).

A análise das partículas na pele, no entanto, foi realizada ao longo do eixo z (profundidade na pele) devido à dificuldade em se obter cortes transversais uniformes. A desvantagem desta análise é a perda de orientação quanto à morfologia; porém se tem um melhor indicativo da permeação das partículas em pele. A Figura IV.35 fornece um indício de morfologia devido a marcação de corneócitos pelo isotiocianato de fluoresceína (FITC) após 2 h de permeação.

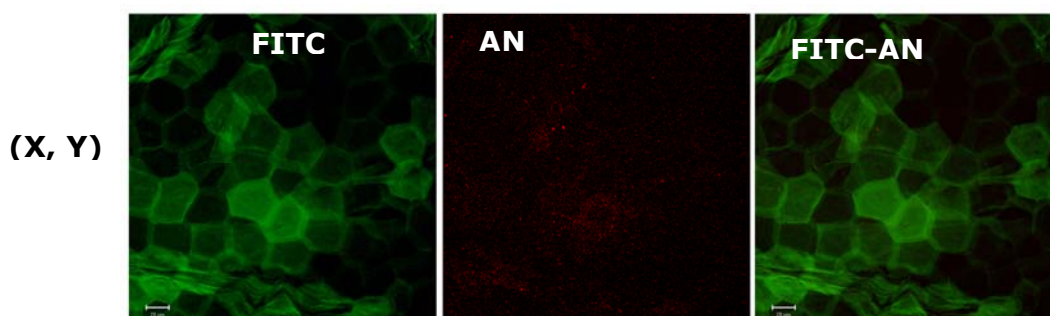


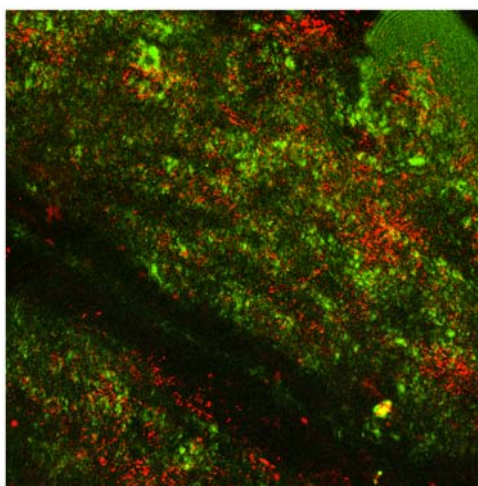
Figura IV.35: Permeação de uma amostra de Nanoesferas PLA-azul do Nilo encapsulando FITC após 2 h de permeação em célula de difusão vertical de Franz: (□Y)= superfície. As imagens mostram a marcação do FITC, azul do Nilo (AN) e a sobreposição das imagens (FITC-AN).

Na Figura IV.35 verifica-se que o corante FITC possui afinidade pelos corneócitos, marcando-os uniformemente quando encapsulado em nanopartículas. As nanoesferas, no entanto, são removidas da superfície na

lavagem após o experimento de permeação, não apresentando a mesma colocalização do que o FITC. Resultado bastante similar foi observado no trabalho de RASTOGI e col. (2009), dada a marcação de corneócitos pelo vermelho do Nilo, a qual foi atribuída à afinidade do corante livre.

A Figura IV. 36 mostra que o palmitato de retinila (PR) permeia a camada córnea, corroborando com o resultado obtido por HPLC. Cabe destacar que não foi possível observar colocalização do verde e vermelho, sendo que o PR (verde) forma o núcleo das NC e o PLA-AN (vermelho), a parede polimérica. Nas condições experimentais usadas o palmitato está presente em alta concentração, apresentando o fenômeno de supressão (“quenching”). Sendo assim, pode-se atribuir a marcação em verde observada ao palmitato livre (0,1% não-encapsulado).

(X, Y)



(X, Z)

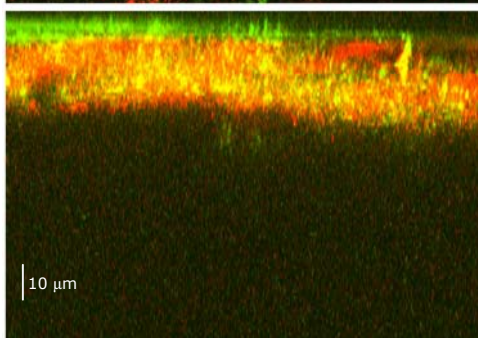


Figura IV.36: Pele após 4h de permeação com a suspensão de nanocápsulas com polímero funcionalizado, analisada em sentido horizontal (□Y) e seccionamento óptico do microscópio no eixo de profundidade Z (□Z).

Desta forma, as nanocápsulas são melhor caracterizadas pela permeação do vermelho. Observa-se que parte do palmitato de retinila, possivelmente “livre”, permanece na superfície, enquanto que as nanocápsulas (com palmitato de retinila encapsulado e possivelmente livre, proveniente de liberação), permeiam em camadas mais profundas, sendo nesse caso, caracterizadas pelo vermelho da parede polimérica.

A Figura IV. 37 apresenta as imagens representativas para os sistemas de nanoesferas e nanoemulsões após 2h de permeação.

A comparação entre nanoesferas, nanoemulsões e nanocápsulas quanto a profundidade de permeação, no entanto, não apresentou variações significativas nos tempos estudados pela técnica de CLSM. Algumas amostras de tempos de 1 a 4 h de nanoesferas apresentaram menor permeação do que as nanocápsulas, sugerindo uma eficiência maior das nanocápsulas em relação a este parâmetro. Entretanto, não foi possível obter reprodutibilidade no ensaio, possivelmente devido ao tempo de permeação relativamente baixo, o qual contribui para aumentar o erro associado às diferenças na rugosidade das peles utilizadas (que pode ser confundida com permeação de tempos iniciais).

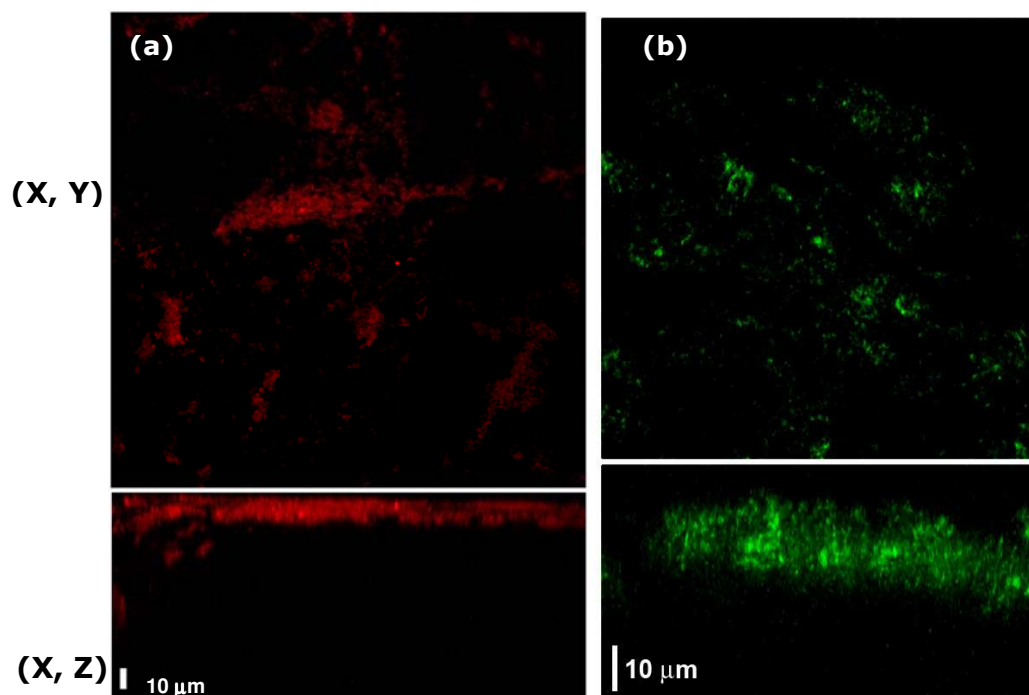


Figura IV.37: Pele após 2 h de experimento de permeação com a suspensão de (a) nanoesferas NS com polímero funcionalizado e (b) e nanoemulsões NE.

Os tempos de permeação foram escolhidos com base em ensaios da literatura (RASTOGI e col., 2009; ALVAREZ-ROMÁN e col., 2004a), mas não foi adequado para nosso sistema. No trabalho de RASTOGI e col. (2009), os autores observaram fluorescência em profundidade de 45 μm na pele após 2 h de permeação, porém apenas a epiderme (remoção após banho a 60 h por 1 minuto), tratada posteriormente com FITC em glicerol e PBS, foi utilizada no experimento. Além disso, os autores observam a permeação do corante encapsulado e não do carreador. No trabalho de Alvarez-Román, os tempos utilizados variaram entre 30 minutos e 2 h, sem que fosse observado aumento de permeação nesse período.

A pele apresenta rugosidades que podem ser as principais responsáveis pelo erro experimental neste caso. Sugere-se assim, como trabalho futuro, a investigação após 6 h e 12 h de permeação (podendo apresentar menor variação nas profundidades). Ainda assim, com base no resultado de permeação apresentado na Figura IV.38 que indica que o palmitato livre ou encapsulado permeia juntamente com o polímero, pode-se sugerir que o principal mecanismo de permeação das nanocápsulas é por via intercelular e através de finos poros da pele, pois a permeação apresenta-se bastante uniforme.

V CONCLUSÕES

Foram obtidas pela primeira vez nanocápsulas de poli(D,L-lactídeo) no encapsulamento do palmitato de retinila, apresentando baixa polidispersidade, baixa citotoxicidade, além de estabilidade física e química. Por DSC, observou-se que as nanoestruturas apresentam um pico adicional endotérmico próximo a 30 °C que difere das misturas físicas, as quais fundem apenas em temperaturas maiores, além de aumento da largura do pico de fusão de palmitato de retinila, sugerindo a solubilização do Span 60 no núcleo oleoso. As nanocápsulas investigadas nesse trabalho de Tese mostraram-se sistemas potenciais não somente para o carregamento de vitamina A, mas também como carreador de outros ativos lipofílicos solubilizados no núcleo oleoso, como a baicaleína e a benzofenona-3. As estruturas das nanocápsulas foram ainda investigadas pela técnica de FFEM, elucidando-se espessuras de parede entre 5 e 9 nm, dependente do diâmetro das nanocápsulas. A análise morfológica por TEM mostrou que a força de adesão capilar é suficiente para deformar as partículas durante a secagem, sugerindo uma característica elástica ao sistema. A extrusão em membranas sintéticas de poros de menores diâmetros do que as nanocápsulas indicaram que à pressão transepidérmica, as nanocápsulas sofrem deformação e passam por poros das membranas, os quais simulam os poros da pele. A investigação da permeação cutânea em pele humana abdominal corrobora com este fato, tendo em vista que a dosagem por HPLC evidencia que as nanocápsulas, de fato, apresentam alta capacidade de permeação cutânea. A comparação, no encapsulamento da benzofenona-3

como molécula modelo, de nanoesferas e nanocápsulas mostram que o ativo apresenta maior absorção cutânea quando incorporado nas nanocápsulas (de maiores tamanhos), o que pode ser atribuído em parte à característica elástica do sistema de nanocápsulas. Obteve-se um derivativo polimérico fluorescente PLA-azul do Nilo pioneiramente neste trabalho para investigação da permeação do carreador (polímero) em comparação com o ativo fluorescente escolhido (palmitato de retinila) de distintos comprimentos de onda de excitação e emissão. A investigação da permeação das nanocápsulas por CLSM mostrou que o polímero é encontrado na mesma profundidade na pele do que o ativo (óleo), sugerindo uma permeação do ativo juntamente com o carreador, diferentemente da revisão de estudo de permeação de partículas poliméricas em pele, na qual as conclusões são de que os carreadores permanecem na superfície. As análises indicaram também que a permeação das nanocápsulas é bastante uniforme, o que sugere que o mecanismo de permeação é por via intercelular e por poros da pele. Dessa forma, as nanocápsulas mostraram-se como um sistema novo e versátil devido a característica elástica que as tornam promissoras para passagem através de barreiras biológicas, como na aplicação transdérmica.

VI TRABALHOS FUTUROS

Como proposta para trabalhos futuros, destacam-se:

- Caracterização das nanocápsulas poliméricas por espalhamento de nêutrons em pequenos ângulos (SANS).
- Investigação do mecanismo de internalização celular das nanocápsulas em queratinócitos por CLSM.
- Investigação do mecanismo de permeação por CLSM das nanocápsulas e nanoesferas após 6 h e 12 h de experimento comparando-se amostras com e sem PEG-8L.
- Avaliação das nanocápsulas e nanocápsulas com baicaleína em experimentos de cicatrização cutânea.
- Encapsulamento de outros bioativos nas NC para liberação uniforme nas diversas camadas da pele.
- Utilização das nanocápsulas de palmitato de retinila ou nanocápsulas de palmitato de retinila encapsulando bioativos para aplicação oral ou parenteral.

VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIHPEC: <http://www.abihpec.org.br/dadosdomercado.php?parametro=6> (julho de 2009)

ABURJAI, T.; NATSHET, F. M. Plants used in cosmetics. *Phytother. Res.*, v. 17, p. 987-1000, 2003.

ADAMSON, A. W.; GAST, P. G. **Physical Chemistry of Surfaces**, 6th edition, New York, John Wiley & Sons, Inc 1997, p. 4-8, 239-246,

ALMEIDA, J. S.; JEZUR, L.; FONTANA, M. C.; PAESE, K.; SILVA, C. B.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Oil-Based Nanoparticles Containing Alternative Vegetable Oils (Grape Seed Oil and Almond Kernel Oil): Preparation and Characterization. *Lat. Am. J. Pharm.*, v. 28, p. 165-72, 2009.

ALONSO FERNANDEZ, M. J.; SANCHEZ BARREIRO, A.; CSABA, N.; UNIV. SANTIAGO COMPOSTELA. Preparing nanoparticles smaller than 1 micron, useful for delivery of therapeutic and cosmetic agents or vaccines, from mixture of biodegradable polymer and polyoxyethylene block copolymer. WO2005002550-A1 2005-112361.

ALONSO, M. J. Nanoparticulate Drug Carrier Technology. In: COHEN, S.; BERNSTEIN, C. (eds). **Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines**. New York, Marcel Dekker Inc. 1996, p. 203-242.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; BARRE, G.; GUY, R. H.; FESSI, H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 52, p. 191-195, 2001.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; FESSI, H.; GUY, R. H. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 58, p. 301-316, 2004 (b).

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H.; FESSI, H. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. *Pharm. Res.*, v. 21, p. 1818-1825, 2004 (c).

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y.; GUY, R. H.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J. Control. Release*, v. 99, p. 53-62, 2004 (a).

ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Semisolid topic formulation containing nimesulide-load nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. *Pharmazie*, v. 60, p. 63-67, 2005.

- ALVES, M. P.; SCARRONE, A. L. SANTOS, M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *Int. J. Pharm.*, v. 341, p. 215–220, 2007.
- ANDERSON, J. M.; SHIVE, M. S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug. Del. Rev.*, v. 28, p. 5-24, 1997.
- BAROLI, B.; ENNAS, M. G.; LOFFREDO, F.; ISOLA, M.; PINNA, R.; LÓPEZ-QUINTELA, M. A. Penetration of Metallic Nanoparticles in Human Full-Thickness Skin. *J. Invest. Dermatol.*, v. 127, p. 1701-1712, 2007.
- BARROS NETO, B.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos**, 2ª edição, Campinas, Editora da UNICAMP 2002, p. 149-180.
- BASARKAR, A.; DEVINENI, D.; PALANIAPPAN, R.; SINGH, J. Preparation, characterization, cytotoxicity and transfection efficiency of poly(DL-lactide-co-glycolide) and poly(DL-lactic acid) cationic nanoparticles for controlled delivery of plasmid DNA. *Int. J. Pharm.*, v. 343, p. 247-254, 2007.
- BECHELLI, L. M.; CURBAN, G. V. **Compêndio de Dermatologia**, 4ª ed., São Paulo, Atheneu Editora São Paulo S.A. 1975, p. 1-7.
- BENAVIDES, R.; MARTÍNEZ V.; MITJANS, M.; INFANTE, M. R.; MORAN, C.; CLAPÉS, P.; CLOTHIER, R.; VINARDELL, M. P. Assessment of the potential irritation and photoirritation of novel amino acid-based surfactants by in vitro methods as alternative to the animal tests. *Toxicology*, v. 201, p. 87-93, 2004.
- BENITA, S.; MAGENHEIM, B. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. *S. T. P. Pharm. Sci.*, v. 1, p. 221-241, 1991.
- BOCHEMAL, K.; BRIANCON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H.; BONNET, I.; ZYDOWICZ, N. Synthesis and characterization of polyurethane and poly(ether urethane) nanocapsules using a new technique of interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification. *Int. J. Pharm.*, v. 269, p. 89-100, 2004.
- BOEHNLEIN, J.; SAKR, A.; LICHTIN, J. L.; BRONAUGH, R. L. Characterization of esterase and alcohol dehydrogenase activity in skin. Metabolism of retinyl palmitate to retinol (vitamina A) during percutaneous absorption. *Pharm. Res.*, v. 11, p. 1155-1159, 1994.
- BORENFREUND, E.; PUERNER, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J. Tissue Culture Methods*, v. 9, p. 7-9, 1984.
- BOUILLOT, P.; BABAK, V.; DELLACHERIE, E. Novel Bioresorbable and Bioeliminable Surfactants for Microsphere Preparation. *Pharm. Res.*, v. 16, p. 148-154, 1999.
- BOUKAMP, P.; PETRUSSEVSKA, R. T.; BREITKREUTZ, D.; HORNING, J.; MARKHAM, A.; FUSENIG, N.E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.*, v. 106, p. 761-771, 1988.
- BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P. L. Skin structure and mode of action of vesicles. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 54, p. S41-S55, 2002.
- BRAHMS, J. C.; BROWN, S. E.; FAIR, M. J.; GLYNN, J. R.; MAITRA, P.; ROTHOUSE, J.; AVON PROD INC. Cosmetic composition for optically blurring appearance of skin imperfections comprises gel system comprising fractal network of nanoparticles and translucent macroscopic particles. WO2009085444-A1

- BURON, H.; MENGUAL, O.; MEUNIER, G.; CAYRE, I.; SNABRE, P. Optical characterization of concentrated dispersions: applications to laboratory analyses and on-line process monitoring and control. *Polym. Int.*, v. 53, p. 1205–1209, 2004.
- CARAFA, M.; MARIANECCI, C.; LUCANIA, G.; MARCHEI, E.; SANTUCCI, E. New vesicular ampicillin-loaded delivery systems for topical application: characterization, in vitro permeation experiments and antimicrobial activity. *J. Control. Release*, v. 95, p. 67–74, 2004.
- CARRY, F. A. **Organic Chemistry**, 5th edition, New York, McGrawHill 2003, p. 1140.
- CEVC, G.; BLUME, G. Lipid vesicles penetration into intact skin owing to transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.*, v. 1104, p. 226–232, 1992.
- CHEN, H.; CHANG, □; DU, D.; LIU, W.; LIU, J.; WENG, T.; YANG, Y.; □, H.; YANG, □ Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. *J. Control. Release*, v. 110, p. 296–306, 2006.
- CHIU, A.; KIMBALL, A. B. Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage. *Brit. J. Dermatol.*, v. 149, p. 681–691, 2003.
- CHUNG, C.P.; PARK, J. B.; BAE, K.H. Pharmacological effects of methanolic extract from the root of *Scutellaria baicalensis* and its flavonoids on human gingival fibroblast. *Planta Med.*, v. 61, p. 151–153, 1995.
- CLEMMENSEN, A.; THORMANN, J.; ANDERSEN, K. E. Allergic contact dermatitis from retinyl palmitate in polycaprolactone. *Contact Dermatitis*, v. 56, p. 288–289, 2007.
- COUVREUR, P.; COURRAZE, G.; DEVISAGGUET, P-P.; PUISIEU □ F. Nanoparticles: preparation and characterisation. In: BENITA, S. (ed). **Microencapsulation: Methods and Industrial Applications**, New York, Marcel Dekker Inc 1996, p. 183–211.
- COUVREUR, P.; KANTE, B.; ROLAND, M.; GUIOT, P.; BRANDHUIJ, P.; SPEISER, P. Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers; preparation, morphological and biological properties. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 31, p. 331–332, 1979.
- COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. *Pharm. Res.*, v. 23, p. 1417–1450, 2006.
- CRUZ, L. ; SHAFFAZICK, S. R. ; COSTA, T. D. ; SOARES, L. U. ; MEZZALIRA, G. ; DA SILVEIRA, N. P. ; SHAPOVAL, E. ; POHLMANN, A. R. ; GUTERRES, S. S. Physico-chemical characterization and in vivo evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules by PCS, TEM, SA□□, interfacial alkaline hydrolysis and antiedematogenic activity. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, v. 6, p. 3154–3152, 2006 (a).
- CRUZ, L. ; SOARES, L. U. ; COSTA, T. D. ; MEZZALIRA, G. ; DA SILVEIRA, N. P. ; GUTERRES, S. S. ; POHLMANN, A. R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers *Int. J. Pharm.*, v. 313, p. 198–205, 2006 (b).
- CUI, Z.; MUMPER, R. J. Chitosan-based nanoparticles for topical immunization. *J. Control. Release*, v. 81, p. 173–184, 2002.
- DAHMS, G.; JUNG, A.; SEIDEL, H.; IFAC GMBH & CO KG. Composition for targeted release of perfumes and aromas, useful e.g. in cosmetics, pharmaceuticals and foods, comprises active agents incorporated in solid lipid-based nanoparticles. WO2004098555-A1; AU2003239845-A1 2005-039244.

- DE JALON, E. G.; BLANCO-PRIETO, M. J.; YGARTUA, P.; SANTOYO, S. PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery. *Int. J. Pharm.*, v. 226, p. 181-184, 2001.
- DHONT, J. K. G. **An Introduction to Dynamics of Colloids**, Amsterdam, Elsevier Science Ltda 1996, p. 5-11.
- DIJOU, N.; GUINGAND, Y.; BOURGEOIS, C.; DURAND, S.; FROMAGEOT, C.; COMBE, C.; FERRET, P.-J. *Toxicol. Vitro*, v. 20, p. 480-490, 2006.
- DONINI, C.; ROBINSON, D. N.; COLOMBO, P.; GIORDANO, F.; PEPPAS, N. A. Preparation of poly(methacrylic acid-g-poly(ethylene glycol) nanospheres from methacrylic monomers for pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.*, v. 245, p. 83-91, 2002.
- DRABENT, R.; BYL, K.; SMYK, B.; ULBRYCH, K. Retinyl palmitate in water environment. *J. Photochem. Photobiol. B*, v. 37, p. 254-260, 1997.
- DUMOSSEAU, C.; GOTO, T.; L'OREAL SA. Cosmetic composition such as skin-care and make-up cosmetics e.g. creams, comprises silicium-based porous particles having specific aspect ratio and optically active substance incorporated into porous particle, in specific medium. WO2005011622-A1; JP2005053846-A 2005-142829.
- Encarta:http://encarta.msn.com/media_461516297_761569048_1/Structure_of_the_Skin.html (abril 2005)
- EVANS, D. F.; WENNERSTRÖM, H. **The Colloidal Domain: where physics, chemistry, biology and technology meet**, New York, VCH Publishers, Inc 1994, p. xxv-xxvi, 41-48, 325-345.
- FESSI, H.; PUISIEU, F.; DEVISSAGUET J. P. Procédé de preparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance, sous forme de nanocapsules. Eur. Patent 0 274 961 (1988).
- FESSI, H.; PUISIEU, F.; DEVISSAGUET, J. P.-H.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharma.*, v. 55, p. R1-R4, 1989.
- FRESTA, M.; CAVALLARO, G.; GIAMMONA, G.; WEHRLI, W.; PUGLISI, G. Preparation and characterization of polyethyl-2-cyanocrylate nanocapsules containing antiepileptic drugs. *Biomaterials*, v. 17, p. 751-758, 1996.
- GALINDO-RODRIGUEZ, S.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsion-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharm. Res.*, v. 21, p. 1428-1435, 2004.
- GALLARDO, M.; COUARRAZE, G.; DENIZOT, B.; TREUPEL, L.; COUVREUR, P.; PUISIEU, F. Study of the mechanisms of formation of nanoparticles and nanocapsules of polyisobutyl-2-cyanoacrylate. *Int. J. Pharm.*, v. 100, p. 55-64, 1993.
- GAMISANS, F.; LACOUILONCHE, F.; CHAUVET, A.; ESPINA, M.; GARCÍA, M. L.; EGEA, M. A. Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure by thermal methods. *Int. J. Pharm.*, v. 179, p. 37-48, 1999.
- GAO, D. Y.; TAWA, R.; MASAKI, H.; OKANO, Y.; SAKURAI, H. Protective effects of baicalein against cell damage by reactive oxygen species. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 46, p. 1383-1387, 1998.

- GAO, Z.; HUANG, K.; YANG, □; □J, H. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1472, p. 643-650, 1999.
- GARACH-JEHOSHUA, O.; RAVID, A.; LIBERMAN, U. A.; KOREN, R. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases the growth-promoting activity of autocrine epidermal growth factor receptor ligands in keratinocytes. *Endocrinology*, v. 140, p. 713-721, 1999.
- GIROUD, F.; L'OREAL SA. Cosmetic composition, useful for imparting sheen to hair, contains active agent and metal nanoparticles stabilized by a protective colloid consisting of a comb polymer. EP1506765-A1; FR2858766-A1 2005-166264.
- GOLLNICK, H. P. M.; DUMMLER, U. Retinoids. *Clin. Dermatol.*, v. 15, p. 799-810, 1997.
- GÓMEZ-GAETE, C.; TSAPISA, N.; BESNARD, M.; BOCHOT, A.; FATTAL, E.; Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *Pharm. Nanotechnol.*, v. 331, p. 153-159, 2007.
- GREEF, R.; COUVREUR, P. Nanocapsules: Preparation, Characterization and Therapeutic Applications. In: TORCHILIN, V. P. (ed.). **Nanoparticulates as drug carriers**, London, Imperial College Press 2006, p. 255-276.
- GU, H.; ROY, K. Topical permeation enhancers efficiently deliver polymer micro and nanoparticles to epidermal Langerhans' cells. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, v. 14, p. 265-273, 2004.
- GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights*, v. 2, p. 147-157, 2007.
- GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUETT, J. P.; PUISIEU□ F. Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: formulation and stability study. *Int. J. Pharm.*, v. 113, p. 57-63, 1995.
- GUTERRES, S. S.; WEISS, V.; FREITAS, L.D.; POHLMANN, A. R. Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. *Drug Deliv.*, v. 7, p. 195-199, 2000.
- HIEMENZ, P. C.; RAJAGOPALAN, R. **Principles of Colloid and Surface Chemistry**, 3th edition, New York, Marcel Dekker, Inc 1997, p. 248-252, 585-619.
- HOET, P. H. M.; BRÜSKE-HOHLFELD, I.; SALATA, O. V. Nanoparticles – known and unknown health risks. *J. Nanobiotech.*, v. 2, p. 12-26, 2004.
- HOLLAND, S. J.; TIGHE, B. J. Biodegradable polymers. In: GARDERTON, D.; JONES, T. (Eds.), **Advances in Pharmaceutical Science**, vol. 6. New York, 1992, pp. 101-164.
- HUNTER, R. J. **Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications**, London, Academic Press Limited 1981.
- JÄGER, A.; STEFANI, V.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. *Int. J. Pharm.*, v. 338, p. 297-305, 2007.
- JAMES, S. C. J.; HENRY, D. J.; LINDA, C.; SUSAN, B.; ANSIE, K. E.; ANNE, G. A novel skin penetration enhancer: evaluation by membrane diffusion and confocal microscopy. *J. Pharm. Sci.*, v. 2, p. 99-107, 1999.

- JANJUA, N. R.; KONGSHOJ, A. M.; ANDERSSON, A.-M.; WULF, H. C. Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *Eur. Acad. Derm. Venereol.*, v. 22, p. 456-461, 2008.
- JENNING, V.; GYSLER, A.; SCHAFER-KORTING, M.; GOHLA, S. H. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 49, p. 211-218, 2000.
- JIMÉNEZ, M. M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M. F.; MARTINI, M. C. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. *Int. J. Pharm.*, v. 272, p. 45-55, 2004 (a).
- JIMÉNEZ, M. M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M. F.; MARTINI, M. C.; FESSI, H. Poly-epsilon-caprolactone nanocapsules containing octyl methoxycinnamate: preparation and characterization. *Pharm. Devel. Tech.*, v. 9, p. 329-339, 2004 (b).
- JUNG, B. H.; LIM, Y. T.; KIM, J. K.; JEONG, J. Y.; H. A; T. H.; CHUNG, B. H.; KOREA RES INST BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOG. Cosmetic pigment composition for e.g. lipstick comprises gold nanoparticles exhibiting red or blue color, silver nanoparticles exhibiting yellow color, and/or gold-silver alloy nanoparticles exhibiting orange color. WO2007011103-A1; KR2007010302-A; EP1909745-A1; KR732249-B1; CN101222906-A; JP2009501786-W; US2009022765-A1
- KAPARAKIS, G.; ALDERSON, P. G. Enhancement of in vitro cell proliferation of pepper (*Capsicum annuum* L.) by Pluronic F-68, haemoglobin and arabinogalactan proteins. *J. Horticult. Sci. Biotechnol.*, v. 78, p. 647-649, 2003.
- KIM, J. W.; SHIM, J. W.; BAE, J. H.; HAN, S. H.; KIM, H. K.; CHANG, I.S.; KANG, H. H.; SUH, K.D. Titanium dioxide/poly(methyl methacrylate) composite microspheres prepared by in situ suspension polymerization and their ability to protect against UV rays. *Colloid Polym. Sci.*, v. 280, p. 584-588, 2002.
- KLEIN, M. D.; GUTERRES, S. S; RATES, S. M. K. **Análise de Extratos d de Óleos Vegetais Utilizados em Produtos Cosméticos Hidratantes, Esfoliantes e Antienvhecimento.** Trabalho de Conclusão de Estágio Curricular em Farmácia, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003, p. 21-50.
- KOHLI, A. K.; ALPAR, H. O. Potential Use of Nanoparticles for Transcutaneous Vaccine Delivery: Effect of Particle Size and Charge. *Int. J. Pharm.*, v. 275, p. 13-17, 2004.
- KÜCHLER, S.; ABDEL-MOTTALE, M.; LAMPRECHT, A.; RADOWSKI, M. R.; HAAG, R.; SCHÄFER-KORTINGA, M. Influence of nanocarrier type and size on skin delivery of hydrophilic agents. *Int. J. Pharm.*, v. 377, p. 169-172, 2009.
- LADEMANN, J.; OTBERG, N.; RICHTER, H.; WEIGMANN, H. J.; LINDEMANN, U.; SCHAEFER, H.; STERRY, W. Investigation of follicular penetration of topically applied substance. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol*, v. 14, p. 17-22, 2001.
- LADEMANN, J.; WEIGMANN, H.J.; RICKMEYER, C.; BARTHELMES, H.; SCHAEFER, H.; MUELLER, G.; STERRY, W. Penetration of titanium dioxide microparticles in sunscreen formulation into the horny layer and follicular orifice. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, v. 12, p. 247-256, 1999.
- LARESEA, F. F.; D'AGOSTIN, F.; CROSER, M.; ADAMI, G.; RENZI, N.; BOVENZI, M.; MAINA, G. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology*, v. 255, p. 33-37, 2009.

- LASAROW, R. M.; ISSEROFF, R. R.; GOMEZ, E. C. Quantitative In Vitro Assessment of Phototoxicity by a Fibroblast-Neutral Red Assay. *J. Invest. Dermatol.*, v. 98, p. 725-729, 1992.
- LAURENT, T. C.; OGSTON, A. G.; PERTOFT, H.; CARLSSON, B. Physical-Chemical Characterization of Percoll .2. Size and Interaction of Colloidal Particles. *J. Colloid. Interface Sci.*, v. 76, p. 133-141, 1980.
- LAWRENCE, J. M. Surfactants Systems: Their Use in Drug-Delivery. *Chem. Soc. Rev.*, v. 23, p. 417-424, 1994.
- LEE, J. S.; NAM, Y. S.; KANG, B. Y.; HANG, S. H.; CHANG, I. S. Vitamin A microencapsulation within poly(methyl methacrylate)-g-polyethylenimine microspheres: Localized proton buffering effect on vitamin A stability. *J. App. Polym. Sci.*, v. 92, p. 517-522, 2004.
- LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V. C. F.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J.-P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: a review. *S. T. P. Pharma Sci.*, v. 9, p. 411-418, 1999.
- LIN, H.; GEBHARDT, M.; BIAN, S.; KWON, K. A.; SHIMA, S.-K.; CHUNGA, S.-J.; KIMA, D.D. Enhancing effect of surfactants on fexofenadine·HCl transport across the human nasal epithelial cell monolayer. *Int. J. of Pharm.*, v. 330, p. 23-31, 2007
- LUENGO, J. WEISS, B.; SCHNEIDER, M.; EHLERS, A.; STRACKE, F.; KÖNIG, K.; KOSTKA, K.-H.; LEHR, C.-M.; SCHAEFER, U. F. Influence of Nanoencapsulation on Human Skin Transport of Flufenamic Acid. *Skin Pharmacol. Physiol.*, V. 9, P. 190-197, 2006.
- LUPPI, B.; CERCHIARA, T.; BIGUCCI, F.; BASILE, R.; ZECCHI, V. Polymeric nanoparticles composed of fatty acids and polyvinylalcohol for topical application of sunscreens. *J. Pharm. Pharmacol.*, v. 56, p. 407-411, 2004.
- MALVERN INSTRUMENTS, Manual do Equipamento Nano ZS, 2007.
- MEHIER-HUMBERT, S.; BETTINGER, T.; YAN, F.; GUY, R. Influence of polymer adjuvants on the ultrasound-mediated transfection of cells in culture. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 71, p. 567-573, 2009.
- MENGUAL, O.; MEUNIER, G.; CAYRE, I.; PUECH, K.; SNABRE, P. TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*, v. 50, p. 445-456, 1999.
- MENZEL, F.; REINERT, T.; VOGT, J.; BUTZ, T. Investigations of percutaneous uptake of ultrafine TiO₂ particles at the high energy ion nanoprobe LIPSION. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B-Beam Interact. Mater. Atom.*, v. 219-220, p. 82-86, 2004.
- MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEU, F.; BARRATT, G. J. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *Pharm. Sci.*, v. 89, p. 614-626, 2000.
- MU, L.; FENG, S. S. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol®): PLGA nanoparticles containing vitamin E. *J. Control. Release*, v. 86, p. 33-48, 2003.
- MÜLLER, C. R.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DALLA-COSTA, T.; DA SILVEIRA, N. P.; FREITAS, L. D. L. GUTERRES, S. S. Spray-dried diclofenac-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres: preparation and physicochemical characterization. *Pharmazie*, v. 56, p. 864-867, 2001.

MULLER, R. C.; HAAS, S. E.; BASSANI, V. L.; GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; PERALBA, M. C. R.; POHMANN A. R. Degradação e estabilidade do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. *Quím. Nova*, v. 27, p. 555-560, 2004.

MÜLLER, R. H.; RADTKEB, M.; S. A. WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv. Drug Del. Rev.*, v. 54, p. S131-S155, 2002.

MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 58, p. 343-356, 2004.

MUSUMECI, T.; , VENTURA, C. A.; GIANNONE, I.; RUOZIC, B.; MONTENEGRO, L.; PIGNATELLO, R.; PUGLISIA, G. PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel. *Pharm. Nanotechnol.*, v. 325, p. 172-179, 2006.

MYERS, D. **Surfaces, Interfaces and Colloids Principles and Applications**, 2nd edition, New York, John Wiley & Sons, Inc 1999, p. 8-13, 214-248.

NAKAJIMA, Y.; OGAWA K.; NIPPON SHOKO, K. K.; ERAN, K. K. Composition for cosmetics such as shampoo, skin lotion, cream and moisturizer, contains preset amount of silver ion or silver nanoparticles excluding disinfectant and antiseptic. JP2008120717-A

OLVERA-MARTÍNEZ, B. I.; CAZARES-DELGADILLO, J.; CALDERILLA-FAJARDO, S. B.; VILLALOBOS-GARCIA, R.; GANEM-QUINTANAR, A.; QUINTANAR-GUERRERO, D. Preparation of polymeric nanocapsules containing octyl methoxycinnamate by the emulsification-diffusion technique: Penetration across the stratum corneum. *J. Pharm. Sci.*, v. 94, p. 1552-1559, 2005.

PADULA, C.; CAMPANA, N.; SANTI, P. Simultaneous determination of benzophenone-3, retinol and retinyl acetate in pig ear skin layers by high-performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.*, v. 22, p. 1060-1065, 2006.

PANYAN, J.; e LABHASETWAR, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Del. Rev.*, v. 55, p. 329-347, 2003.

PEARSON, A. J.; ROUSH, W.R. (Ed.). **Handbook of Reagents for Organic Synthesis: Activating Agents and Protecting Groups**, New York, John Wiley & Sons 1999, p. 133, 225.

PERTOFT, H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *J. Biochem. Biophys. Methods*, v. 44, p. 1-30, 2000.

PIEPKORN, M.; PITTELKOW, M. R.; COOK, P. W. Autocrine regulation of keratinocytes: the emerging role of heparin-binding, epidermal growth factor-related growth factors. *J. Invest. Dermatol.*, v. 111, p. 715-721, 1988.

PO, L. S.; CHEN Z.-Y.; TASANG, D. S. C.; LEUNG, L. K. Baicalein and genistein display differential actions on estrogen receptor (ER) transactivation and apoptosis in MCF-7 cells. *Cancer Lett.*, v. 187, p. 33-40, 2002.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMAN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, v. 24, p. 1113-1128, 1998.

RASTOGI, R.; ANAND, S.; KOUL, V. Flexible polymerosomes—An alternative vehicle for topical delivery. *Colloid Surf. B-Biointerfaces*, v. 72, p. 161-166, 2009.

REDZINIAK, G. Liposomes and skin: past, present, future. *Phatol. Biol.*, v. 51, p. 279-281, 2003.

Revista Época, nº 358, 28 de março 2005, Promessas Demais, p. 46-50.

Revista Veja, Ed. Abril, ano 38 nº 4, 26 de janeiro 2005, A Guerra Invisível Contra as Rugas.

RÜBE, A.; HAUSE G.; MÄDER, K.; KOHLBRECHER, J. Core-shell structure of Miglyol/poly(D,L-lactide)/Poloxamer nanocapsules studied by small-angle neutron scattering. *J. Control. Release*, v. 107, p. 244-252, 2005.

SAEZ, A.; GUZMÁN, M.; MOLPECERES, J.; ABERTURA, M. R. Freeze-drying of polycaprolactone and poly(D,L-lactic-glicolic) nanoparticles induce minor particle size changes affecting the oral pharmacokinetics of loaded drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 50, p. 379-387, 2000.

SAPINO, S.; CARLOTTI, M. E.; PELIZZETTI, E.; VIONE, D.; TROTTA, M.; BATTAGLIA, L. Protective effect of SLNs encapsulation on the photodegradation and thermal degradation of retinyl palmitate introduced in hydroxyethylcellulose gel. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, v. 15, p. 159-165, 2005.

SAURAT, J. H. Skin, sun and Vitamin A: From aging to cancer. *J. Dermatol.*, v. 28, p. 595-598, 2001.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. T.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova*, v.26, p. 726-737, 2003.

SCHWARZ, C.; MEHNERT, W.; LUCKS, J. S.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I: Production, characterization and sterilization. *J. Control. Release*, v. 30, p. 83-96, 1994.

SESSA, G.; WEISSMANN, G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J. Lipid Res.*, v. 9, p. 310-318, 1968.

SHAW, D. J. **Introduction to Colloid and Surface Chemistry**, 4th edition, Oxford, Elsevier Science Ltda 1992, p. 1-6.

SHIM, J.; KANG, H. S.; PARK, W. S.; HAN, S. H.; KIM, J.; CHANG, I. S. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *J. Control. Release*, v. 97, p. 477-484, 2004.

SIMEONI, S.; SCALIA, S.; TURSILLI, R. Influence of cyclodextrin on the in vitro human skin penetration and retention of the sunscreen agent, oxybenzone. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, v. 54, p. 275-282, 2006.

SONAVANE, G.; TOMODA, K.; SANO, A.; OHSHIMA, H.; TERADA, H.; MAKINO, K. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. *Colloid Surf. B-Biointerfaces*, v. 65, p. 1-10, 2008.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. H.; KULKARNI, W. E.; RUDZINSKI, W. E. B. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control. Release*, v. 70, p. 1-20, 2001.

SORG, O.; TRAN, C.; SAURAT, J. H. Cutaneous vitamins A and E in the context of ultraviolet- or chemically-induced oxidative stress. *Skin Pharmacol. App. Skin Physiol.*, v. 14, p. 363-372, 2001.

STEINHARDT, R. A.; ALDERTON, J. M. Poloxamer 188 enhances endothelial cell survival in bovine corneas in cold storage. *Cornea*, v. 25, p. 839-844, 2006.

STRACK, F.; WEISS, B.; LEHR, C.-M.; KÖNIG, K.; SCHAEFER, U. F.; SCHNEIDER, M. Multiphoton Microscopy for the Investigation of Dermal Penetration of Nanoparticle-Borne Drugs. *J. Invest. Dermatol.*, v. 126, p. 2224–2233, 2006.

SUGIMOTO, T. **Monodispersed Particles**, Amsterdam, Elsevier Science 2001.

TEIXEIRA, M.; ALONSO, M. J.; PINTO, M. M. M.; BARBOSA, C. M. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 59, p. 491-500, 2005.

TEIXEIRA, Z.; DURÁN, N.; GUTERRES, S.S. Annatto Polymeric Microparticles: Natural Product Encapsulation by the Emulsion–Solvent Evaporation Method. *J. Chem. Edu.*, v. 85, p. 946-947, suppl. 1-7, 2008.

TOUITOU, E.; MEIDAN, V. M.; HORWITZ, E. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. *J. Control. Release*, v. 56, p. 7-21, 1998.

TROTTA, M.; PEIRA, E.; DEBERNARDI, F.; GALLARATE, M. Elastic liposomes for skin delivery of dipotassium glycyrrhizinate. *Int. J. Pharm.*, v. 241, p. 319-327, 2002.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the preparation and manufacturing of polymeric nanoparticles. *Pharm. Res.*, v. 26, p. 1025-1058, 2009.

VERMA, R.; YUAN, Y.; UNILEVER HOME & PERSONAL CARE USA DIV CO, UNILEVER PC, UNILEVER NV. Incorporating zinc oxide particles in cosmetic composition for controlling or preventing appearance tanning comprises heating mixture of uncoated zinc oxide particles and melted fatty acid below predetermined temperature. US200542187-A1; WO2005018597-A1 2005-180764.

WILLIAMS, D. F.; SCHMITT, W. H. (ed). **Chemistry and Technology of The Cosmetics and Toiletries Industry**, 2nd edition, London, Ed. Chapman & Hall 1996, p. 104-108.

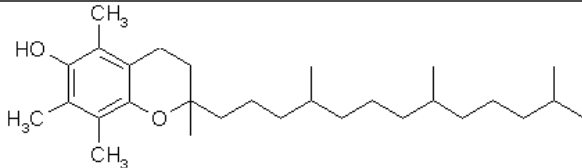
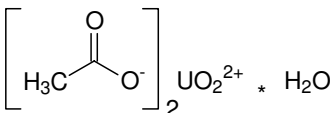
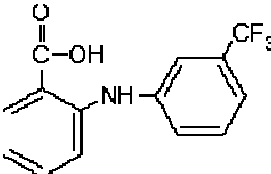
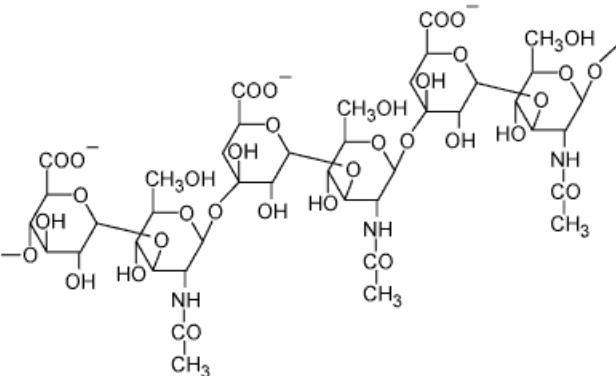
WU, □; BIATRY, B.; CAZENEUVE, C.; GUY, R. H. Drug Delivery to the Skin from Sub-micron Polymeric Particle Formulations: Influence of Particle Size and Polymer Hydrophobicity. *Pharm. Res.*, v. 26, p. 1995-2001, 2009.

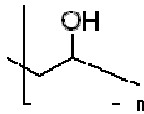
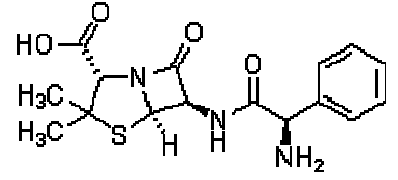
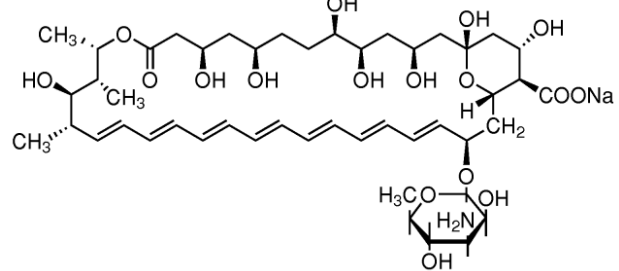
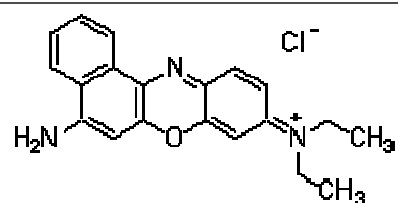
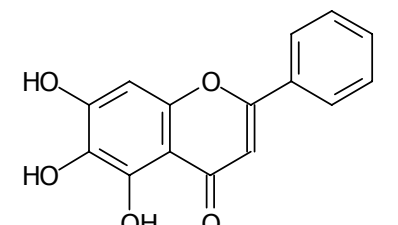
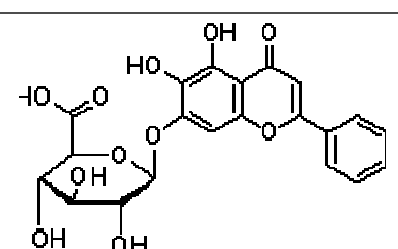
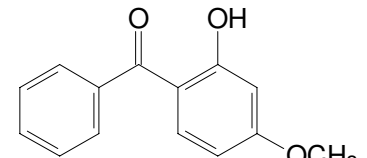
□ING, J.; ZHANG, D.; TANA, T. Studies on the oridonin-loaded poly(d,l-lactic acid) nanoparticles in vitro and in vivo. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 40, p. 153-158, 2007.

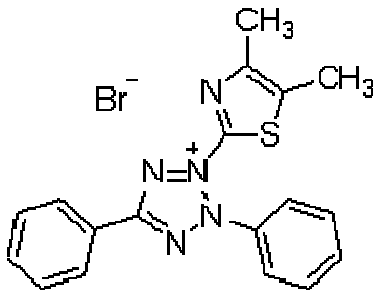
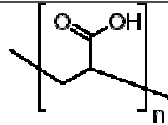
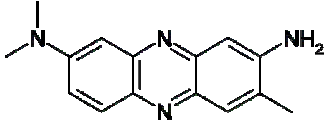
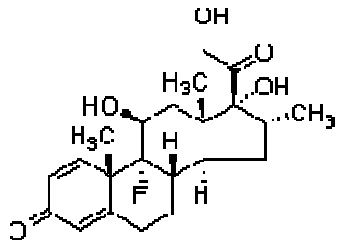
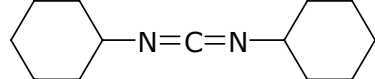
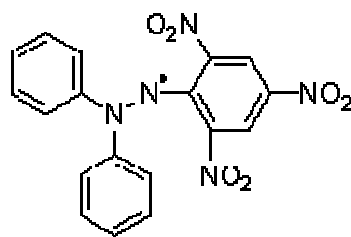
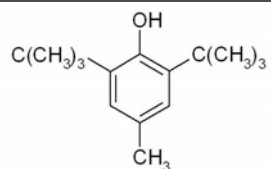
YOW, N. Y.; WU, □; ROUTH, A. F.; GUY, R. H. Dye diffusion from microcapsules with different shell thickness into mammalian skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 72, p. 62–68, 2009.

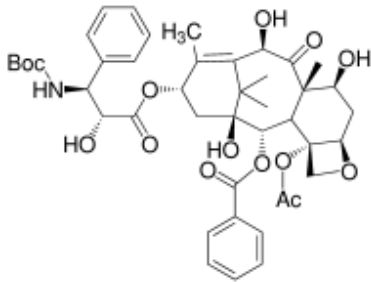
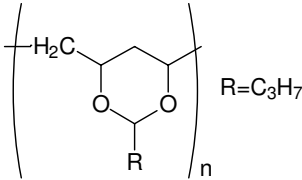
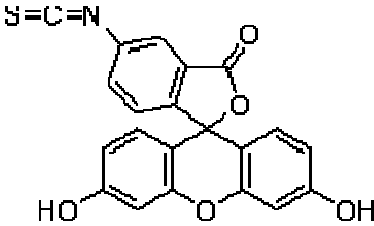
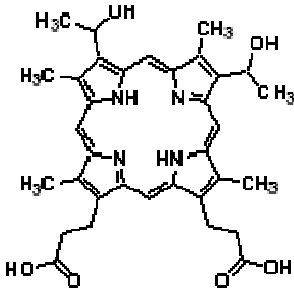
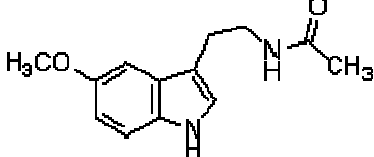
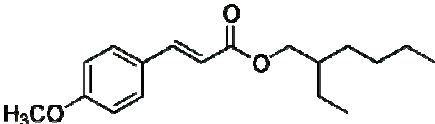
VIII ANEXO

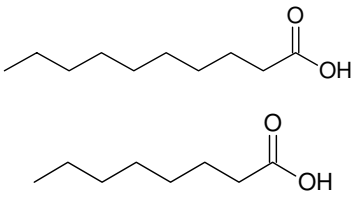
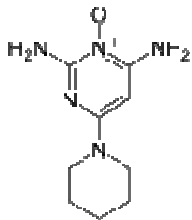
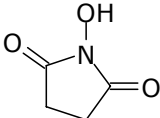
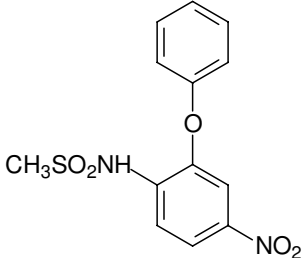
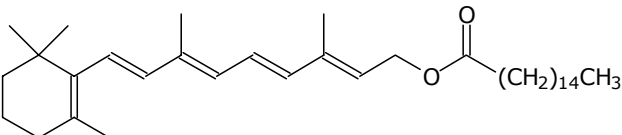
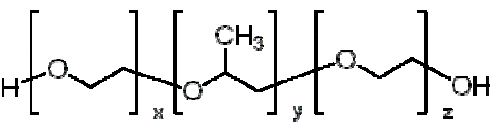
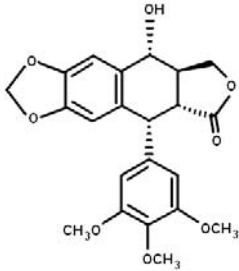
As estruturas químicas dos compostos utilizados nesse trabalho (em negrito), bem como das demais moléculas mencionadas no decorrer do texto são apresentadas a seguir:

α -Tocopherol	
Acetato de uranila di-hidratado	
Ácido flufenâmico	
Ácido hialurônico	

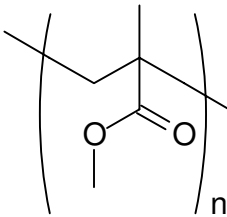
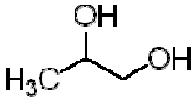
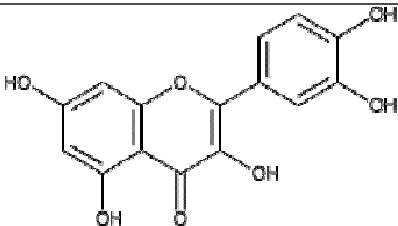
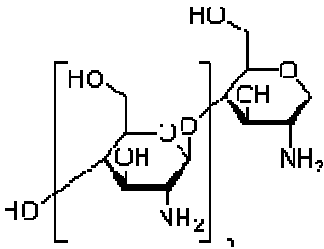
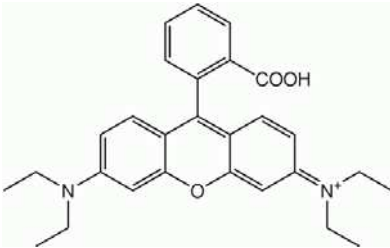
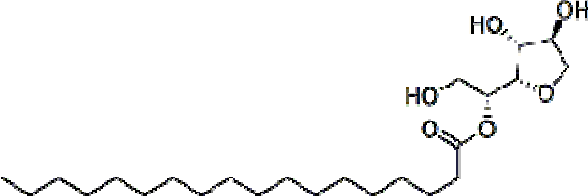
Álcool polivinílico (PVA)	
Ampicilina	
Anfotericina B (fungizona)	
Azul do Nilo	
Baicaleína	
Baicalina	
Benzofenona-3 (BZ3)	

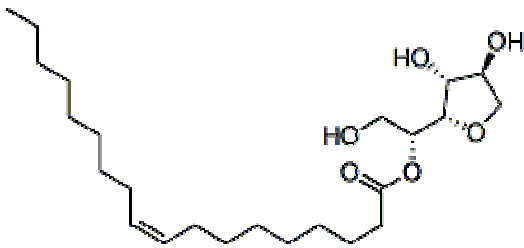
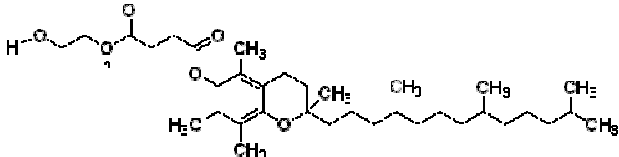
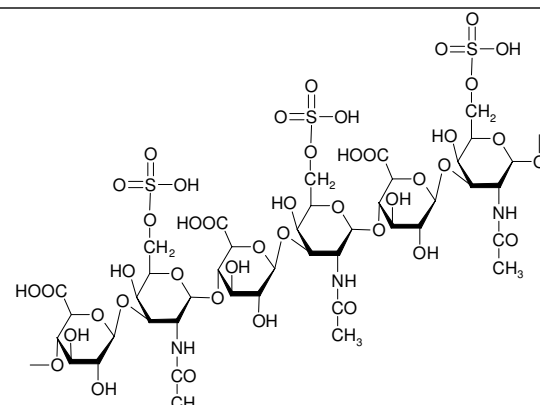
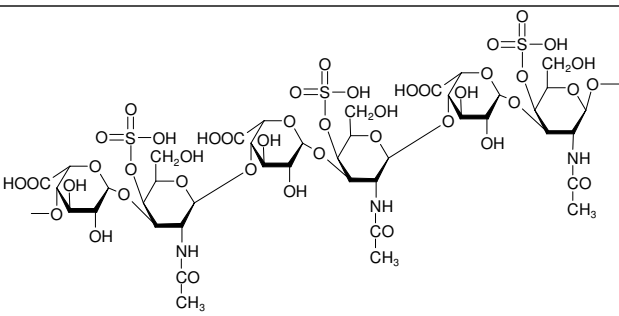
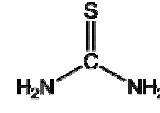
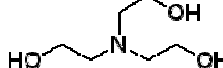
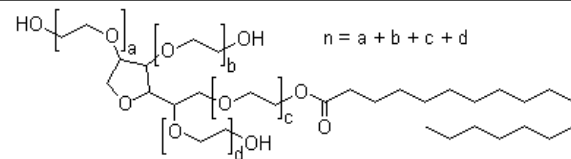
Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)	
Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico (MTT)	
Carbopol (ácido poliacrílico)	
Cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina (VN)	
Dexametasona	
Dicicloexilcarbodiimina (DCC)	
2,2-Difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)	
Di-terc-butil-4-hidroxi-tolueno (BHT)	

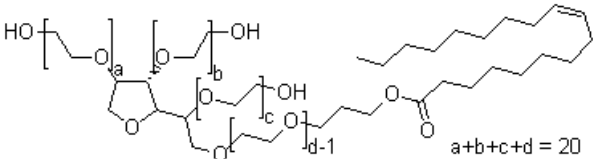
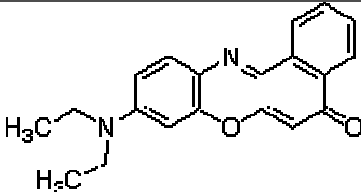
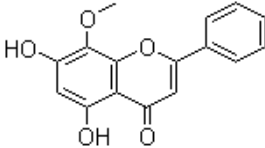
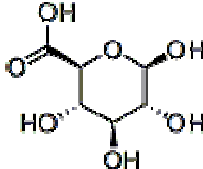
Docetaxel	
Dodecilsulfato de sódio (SDS)	
Formvar (polivinil formal)	
Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	
Hematoporfirina	
Melatonina	
Metoxinamato de Octila (OMC)	

Miglyol 810 (65-80% ácido capríco, 20-35% ácido caprílico) Miglyol 812 (30-45% de ácido cáprico, 30-45% de ácido caprílico)	
Minoxidil	
N-hidroxisuccinimida (NHS)	
Nimesulida	
Palmitato de Retinila	
Pluronic F 68 (Polaxamer 188)	
Podofilotoxina	

Poliacrilamida	$\left[\text{CH}_2 - \underset{\begin{array}{c} \text{C=O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}}{\text{CH}} \right]_n$
Policarbonato	$\left[\text{C}_6\text{H}_4 - \underset{\text{CH}_3}{\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{O} - \text{C}(=\text{O}) - \text{O} \right]_n$
Poli(D,L-lactídeo)	$\left(\text{CH}(\text{CH}_3) - \text{C}(=\text{O}) - \text{O} \right)_n$
Poli(D,L-lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA)	$\left(\text{CH}(\text{CH}_3) - \text{C}(=\text{O}) - \text{O} \right)_x \left(\text{CH}_2 - \text{C}(=\text{O}) - \text{O} \right)_y$
Poli(ε-caprolactona)	$\left(\text{O} - (\text{CH}_2)_5 - \text{C}(=\text{O}) \right)_n$
Polietilenoglicol	$\text{H} - \left[\text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \right]_n - \text{OH}$
Polietilenoimina (arizidina)	$\text{Cl}^- - \text{H}^+ - \left[\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}^+ \right]_n - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{Cl}^-$
Polioxietilenoglicol 8-lauril (PEG-8L)	$\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{O}_2 - \left(\text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \right)_8 - \text{H}$
Poliestireno	$\left(\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5) - \text{CH}_2 \right)_n$
Poli(hidroxi butirato-co-hidroxi valerato) (PHBV)	$\left(\text{O} - \text{CH}(\text{CH}_3) - \text{C}(=\text{O}) - \text{O} - \text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3) - \text{C}(=\text{O}) \right)_n$

Polimetilmetacrilato (PMMA)	
Poliuretano	$\text{R}^1-\text{N}-\overset{\text{H}}{\overset{ }{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\overset{ }{\text{C}}}-\text{O}-\text{R}^2$
Propilenoglicol	
Quercetina	
Quitosana	
Rodamina B	
Span 60	

Span 80	
Succinato de polietilenoglicol α -tocoferol (TPGS)	
Sulfato de condroitina	
Sulfato de dermatan	
Tiouréia	
Trietanolamina	
Tween 60	

Tween 80	 $a+b+c+d = 20$
Vermelho do Nilo	
Wogonina	
Wogonosídeo	
□antona	