UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ESTER PINHEIRO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE AMIDOS HIDROLISADOS, ANIÔNICO E CATIÔNICO,
COMO TENSOATIVOS NAS FORMULAÇÕES DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS PARA APLICAÇÃO EM FILTROS SOLARES**

LORENA - SP

2011

ESTER PINHEIRO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DE AMIDOS HIDROLISADOS, ANIÔNICO E CATIÔNICO,
COMO TENSOATIVOS NAS FORMULAÇÕES DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS PARA APLICAÇÃO EM FILTROS SOLARES**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na Área de Concentração: Novos Materiais e Química Fina.

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Jayne Carlos de Souza Baboza

LORENA – SP

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Especializada em Engenharia de Materiais
USP/EEL

Santos, Ester Pinheiro dos

Avaliação de amidos hidrolisados, aniônico e catiônico, como tensoativos nas formulações de nanopartículas poliméricas para aplicação em filtros solares / Ester Pinheiro dos Santos; orientadora Jayne Carlos de Souza Barboza. – Lorena: 2011.

150 f.: il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. Área de Concentração: Novos Materiais e Química Fina) – Escola de Engenharia de Lorena - Universidade de São Paulo.

1. Amidos hidrolisados 2. Tensoativo 3. Nanopartículas 4. Poli(ϵ -caprolactona) 5. Benzofenona-3. I. Título.

CDU 678.7

DEDICATÓRIA

A você, pai: o meu esforço, a minha vitória,
o seu orgulho.

(in memoriam)

A você, mãe: nossa conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças para continuar mediante a ausência de meu pai.

À Prof.^a Dr.^a Jayne Carlos de Souza Barboza por me ensinar a ser independente e autossuficiente durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio Aarão Serra por ajudar a resolver vários contratemplos no laboratório.

À Prof.^a Dr.^a Maria Lúcia Caetano Pinto da Silva, pela amizade, conselhos e incentivo para que nunca desistisse de conquistar meus objetivos e por permitir a realização das análises de DSC em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Figueiredo Faria pela atenção, ensinamentos e conselhos.

Ao Sr. Rossi Souza pela realização das análises de GPC dos amidos, atenção e auxílio.

Ao Sr. Jordani Luiz Rodrigues da Silva pelo fornecimento dos amidos empregados neste trabalho.

À Cibele Rosa Oliveira pela atenção e dedicação ao realizar as análises de UV/VIS e FTIR.

À Eliane Figueiredo Leite pelo auxílio nas análises de tensão superficial.

Aos técnicos integrantes do Laboratório de Polímeros – EEL/USP pela realização das análises de GPC.

À minha mãe, Suzette, pelo seu amor incondicional, pela paciência e incentivo e por sempre me aconselhar nos momentos difíceis.

Ao meu namorado, Alexandre, não só pelo seu amor, carinho, compreensão, paciência e por acreditar na minha capacidade. Mas também por sempre me ajudar em todos os momentos para que, juntos, concretizássemos nossos objetivos.

A todos os familiares que contribuíram de todas as maneiras, por meio de orações, apoio e incentivo para que pudesse superar as inúmeras adversidades durante a minha caminhada.

Às amigas Christiane e Evelyn, por todos os momentos que compartilhamos e pela amizade inesquecível.

Ao meu grande amigo Rafael, por todos os conselhos, apoio e, principalmente, por nunca me deixar esquecer que os amigos são para a vida toda.

À CAPES, pelo financiamento do projeto.

EPIÍGRAFE

Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.

Leonardo da Vinci

RESUMO

SANTOS, E. P. **Avaliação de amidos hidrolisados, aniônico e catiônico, como tensoativos nas formulações de nanopartículas poliméricas para aplicação em filtros solares.** 2011. 150 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

Atualmente, muitas pesquisas são realizadas com o objetivo de desenvolver novas formulações, sejam elas cosméticas ou farmacêuticas baseadas em nanocarreadores. Devido às suas características favoráveis, nanopartículas poliméricas são propostas como veículos tópicos, principalmente para fotoprotetores, com o intuito de prolongar o tempo de resistência dos filtros na pele, evitando assim o processo de fotodegradação. Filtros solares, de uma maneira geral, são formas cosméticas emulsionadas as quais são termodinamicamente instáveis. Para evitar este processo é necessário um componente capaz de manter esta estabilidade, isto é, um tensoativo. Em alguns sistemas, polissacarídeos ou proteínas atuam como tensoativos/estabilizantes em emulsões óleo/água (O/A). Neste contexto, a proposta deste trabalho é introduzir amidos modificados (catiônicos e aniônicos) e hidrolisados como tensoativo em uma formulação para a encapsulação da benzofenona-3 com uma matriz polimérica de poli(ϵ -caprolactona) (PCL), avaliando a influência deste estabilizante nas características físico-químicas das nanopartículas. As nanopartículas foram preparadas mediante a técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado, empregando-se um planejamento de experimentos de mistura. Previamente, foram avaliadas as condições da hidrólise enzimática, via planejamento de experimentos, para verificar quais parâmetros (tempo e concentração da enzima) maximizariam este processo reduzindo de maneira satisfatória a massa molar do amido para posterior aplicação como estabilizante. Foram realizados testes de tensão para avaliar a capacidade tensoativa das soluções aquosas dos amidos hidrolisados, para posterior aplicação na formulação de nanopartículas. Os resultados indicaram que dois lotes de amido, de quatro avaliados, podem ser empregados como tensoativos na formulação de nanopartículas, sem alterar significativamente propriedades, como diâmetro, polidispersão e teor de encapsulação.

Palavras-chave: Amidos hidrolisados. Tensoativo. Nanopartículas. Poli(ϵ -caprolactona). Benzofenona-3.

ABSTRACT

SANTOS, E. P. **Evaluation of hydrolyzed starches, anionic and cationic, as surfactants in the nanoparticles polymeric formulations for application in sunscreens.** 2011. 150 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

Currently, many researches are conducted with the aim of developing new formulations, whether cosmetic or pharmaceutical-based nanocarriers. Due to its favorable characteristics, polymeric nanoparticles are proposed as topics vehicles, mainly for sunscreens, in order to prolong the resistance of the filters on the skin, thus preventing the photodegradation process. Sunscreens, in general, are emulsified cosmetic forms which are thermodynamically unstable. To avoid this process requires a component capable of maintaining this stability, i.e., a surfactant. In some systems, polysaccharides or proteins act as surfactants/stabilizers in oil-water emulsions (O/W). In this context, the purpose of this work is to introduce modified starches (cationic and anionic) and hydrolyzed as surfactant in a formulation for the encapsulation of benzophenone-3 with a polymer matrix of poly(ϵ -caprolactone) (PCL), evaluating the influence of this stabilizer the physical-chemical characteristics of nanoparticles. The nanoparticles were prepared by interfacial deposition pre-formed polymer technique, using a design of experiments like mixture. Previously evaluated the conditions of enzymatic hydrolysis, by design of experiments to determine which parameters (time and enzyme concentration) to maximize this process satisfactorily reducing the molecular weight of the starch for subsequent use as a stabilizer. Tension tests were conducted to assess the ability of surfactant aqueous solutions of hydrolyzed starch for application in the formulation of nanoparticles. The results indicated that two batches of starch, four-valued, can be employed as a surfactant in the suspension of nanoparticles, without significantly altering properties such as diameter, polydispersity and the content of encapsulation.

Keywords: Starches hydrolysates. Surfactant. Nanoparticles. Poly(ϵ -caprolactone). Benzophenone-3.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da pele: a) epiderme; b) derme e c) hipoderme.....	29
Figura 2 – Representação esquemática do espectro de radiações.	31
Figura 3 – Penetração cutânea das radiações.	33
Figura 4 – Compostos utilizados nas principais associações de fotoprotetores comercializadas no Brasil.	36
Figura 5 – Principais nanocarreadores empregados em sistemas nanoparticulados..	41
Figura 6 – Representação esquemática de nanocápsulas poliméricas: a) ativo dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) ativo adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas.....	42
Figura 7 – Representação esquemática de nanoesferas poliméricas: a) ativo retido na matriz polimérica das nanoesferas; b) ativo adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.	42
Figura 8 – Principais poliésteres alifáticos utilizados no preparo de nanopartículas poliméricas. ..	44
Figura 9 – Estrutura da poli(ϵ -caprolatona), PCL.....	46
Figura 10 – Representação esquemática da síntese da PCL.....	46
Figura 11 – Polimerização catiônica da ϵ -caprolactona.	47
Figura 12 – Polimerização aniônica da ϵ -caprolactona.....	47
Figura 13 – Polimerização por inserção por coordenação da ϵ -caprolactona.	48
Figura 14 – Fórmula estrutural da 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (benzofenona-3, BZ-3).	49
Figura 15 – Fórmula estrutural do triglicerídeo do ácido cáprico.	51
Figura 16 – Fórmula estrutural do triglicerídeo do ácido caprílico.....	52
Figura 17 – Fórmula estrutural do polisorbato 80, Tween 80®	55
Figura 18 – Fórmula estrutural do monoestearato de sorbitana, Span 60®	55
Figura 19 – Método de polimerização em emulsão.	56

Figura 20 – Método de polimerização interfacial.	56
Figura 21 – Método de deposição interfacial do polímero pré-formado.....	57
Figura 22 – Fórmula estrutural da amilose.	70
Figura 23 – Fórmula estrutural da amilopectina.	71
Figura 24 – Estados físicos do amido e suas principais características.....	72
Figura 25 – Cromatograma da Amostra de 60 minutos – Síntese PCL.	95
Figura 26 – Amostras de PCL, da esquerda para direita, nos tempo de 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos.....	96
Figura 27 – Distribuição de massa molar versus tempo de polimerização para a PCL.	97
Figura 28 – Cromatograma do lote final da PCL.	100
Figura 29 – Espectro de infravermelho da poli(ϵ -caprolactona), PCL, sintetizada em laboratório.....	101
Figura 30 – Espectro de infravermelho do monômero ϵ -caprolactona, CL.	101
Figura 31 – Espectro de RMN ^1H da ϵ -caprolactona.	102
Figura 32 – Espectro de RMN ^1H da poli(ϵ -caprolactona) sintetizada em laboratório (lote final).	103
Figura 33 – Espectro de RMN ^{13}C (apt) da ϵ -caprolactona.....	104
Figura 34 – Espectro de RMN ^{13}C (apt) da poli(ϵ -caprolactona) sintetizada em laboratório.	104
Figura 35 – Estados físicos de monômero e polímero.	105
Figura 36 – Curva de DSC do polímero do lote final.	106
Figura 37 – Efeitos padrões sobre a massa molécula ponderal média, M_w	108
Figura 38 – Tensão versus concentração para os amidos hidrolisados.	111
Figura 39 – Suspensão de nanocápsulas poliméricas de PCL/BZ-3 contendo amidos hidrolisados.....	114

Figura 40 – Suspensão de NC de PCL/BZ-3 contendo 100 % m/m de ACAMM e 0 % m/m de Tween 80®	115
Figura 41 – Efeito sobre o diâmetro médio de partículas.	119
Figura 42 – Dados experimentais versus calculados para o diâmetro de partículas.	120
Figura 43 – Efeito sobre a polidispersidade.	122
Figura 44 – Dados experimentais versus calculados para a polidispersidade.	122
Figura 45 – Varredura do espectro de UV para a BZ-3.	123
Figura 46 – Curva de calibração para soluções de benzofenona-3 em acetonitrila.	124
Figura 47 – Efeito sobre o percentual de encapsulação.	126
Figura 48 – Dados experimentais versus calculados para o percentual de encapsulação.	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Eventos históricos importantes da nanotecnologia.....	39
Tabela 2 – Classificação e características dos tensoativos de acordo com o EHL.....	54
Tabela 3 – Propriedade químicas, físicas e funcionais do amido.....	71
Tabela 4 – Formulação referência para a hidrólise dos amidos.	86
Tabela 5 – Formulação referência para o preparo das nanocápsulas poliméricas.....	88
Tabela 6 – Matriz experimental das frações molares de tensoativo na fase aquosa nas formulações de NC poliméricas.....	90
Tabela 7 – Soluções de BZ-3/ACN em diferentes concentrações.....	92
Tabela 8 – Dados obtidos na cinética da PCL.....	96
Tabela 9 – Análise de variância.	98
Tabela 10 – Dados obtidos nos lotes de PCL.....	99
Tabela 11 – Matriz experimental e resultados obtidos com a hidrólise dos amidos modificados.	107
Tabela 12 – Matriz experimental e resultado (hidrólise dos amidos modificados).....	109
Tabela 13 – Condições de hidrólise dos lotes utilizados nas formulações de nanocápsulas.....	110
Tabela 14 – Resultados experimentais.	113
Tabela 15 - Medidas de pH das suspensões de NC de PCL/BZ-3 contendo amidos hidrolisados.	116
Tabela 16 – Efeitos sobre o diâmetro médio de partícula.	117
Tabela 17 – Efeitos sobre a polidispersidade.	121
Tabela 18 – Efeitos sobre o percentual de encapsulação.	125

LISTA DE SIGLAS

A/O	Água/óleo
MDI	4,4'- difenil metano diisocianato
ACN	Acetonitrila
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PABA	Ácido <i>p</i> -aminobenzoico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
PVA	Álcool Polivinílico
APG	Alquil Poliglicosídeos
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
AAAMM	Amido Aniônico de Alta Massa Molar
AABMM	Amido Aniônico de Baixa Massa Molar
ACAMM	Amido Catiônico de Alta Massa Molar
ACBMM	Amido Catiônico de Baixa Massa Molar
ANOVA	Análise de Variância
OSA	Anidrido Octenil Succínico
BASF	<i>Badische Anilin und Soda-Fabrik</i>
BZ-3	Benzofenona-3
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
CD's	Ciclodextrinas
CMC	Concentração Micelar Crítica
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
SEC	Cromatografia por Exclusão de Tamanho
DRX	Difração de Raios X
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DEM	Dose Erimatosa Mínima
CL	ϵ -caprolactona
EHL	Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico
EEL	Escola de Engenharia e Lorena
LS	Espalhamento de Luz
LSE	Espalhamento Estático de Luz
EUA	Estados Unidos da América
FPS	Fator de Proteção Solar

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FAC	Ftalato de Acetato de Celulose
DS	Grau de substituição
HP- α -CD	Hidropropil- α -ciclodextrina
IV	Radiação Infravermelha
IR	Infravermelho
IBM	<i>International Business Machines</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonizaton</i>
LV	Laurato de Vinila
MIT	<i>Massachusetts Institute of Technology</i>
AFM	Microscopia de Força Atômica
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
FM	Microscópio de Foça Atômica
STM	Microscópio de Varredura por Tunelamento
DMF	N, N'-dimetilformamida
NC	Nanocápsulas
NE	Nanoesferas
NP	Nanopartículas Polimérica
CMS	<i>o</i> -(caboximetil) amido
O/A	Óleo/água
MCO	<i>p</i> -metoxicinamato de octila
PGA	Poli(ácido glicólico)
PLA	Poli(ácido lático)
PLGA	Poli(ácido lático- <i>co</i> -glicólico)
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PS	Poliestireno
PHB	Polihidroxibutirato
PHV	Polihidroxivalerato
PTFE	Politetrafluoretileno
PA	Puramente Analítico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROP	<i>Ring-Opening Polymerization</i>

SBE- β -CD	Sulfobutiléter- β -ciclodextrina
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
UV/Vis	Ultravioleta/Visível
USP	Universidade de São Paulo
Vis	Visível
β -CD	β -ciclodextrina

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	Micrometro
nm	Nanometro
TiO_2	Dióxido de titânio
ZnO	Óxido de zinco
T_g	Temperatura de transição vítrea
T_m	Temperatura de fusão cristalina
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
λ	Comprimento de onda
g/mol	Gramas por mol
DL_{50}	Dose letal
g/kg	Gramas por quilo
mg/kg	Miligramas por quilo
pH	Potencial hidrogeniônico
R_h	Raio hidrodinâmico
$\overline{M_w}$	Massa molar ponderal média
kDa	Quilodalton
HCl	Ácido clorídrico
cm^3	Centrímetros cúbicos
$\% \text{ v/v}$	Porcentagem volume por volume
mol/mol	Mol por mol
g/mL	Gramas por mililitro
g/cm^3	Gramas por centímetros cúbicos
MHz	Mega Hertz
g	Gramas
$\text{\AA}$	Ångström
mg/mL	Miligramas por mililitro
μL	Microlitro
mL/min	Mililitros por minuto
cm^{-1}	Por centrímetros
NaCl	Cloreto de sódio
^{13}C	Carbono 13
$\text{RMN } ^{13}\text{C}$	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
$\text{RMN } ^1\text{H}$	Ressonância Magnética Nuclear de Próton

mL	Mililitros
mg	Miligramas
$^{\circ}\text{C}/\text{min}$	Graus Celsius por minuto
TS	Teor de sólidos
CV	Cadinho Vazio
CS	Cadinho Seco
AA	Amostra de Amido
M	Concentração molar
dina/cm	Dinas por centímetros
m.N.m^{-1}	Newton vezes metro por metro
% m/m	Porcentagem massa por massa
$\hat{y}$	Resposta desejada
x_i	Fração molar de um componente i da formulação
b_i	Efeito referente ao componente i da formulação
x_j	Fração molar de um componente j da formulação
b_{ij}	Efeito combinado dos componentes i e j
mmol	Milimol
$\mu\text{g}/\text{mL}$	Microgramas por mililitro
E	Percentual de Encapsulação
CL	Concentração de BZ-3 livre
CT	Concentração total de BZ-3
$\overline{Mn}$	Massa molar numérica média
$\overline{Mw}/\overline{Mn}$	Polidispersão
ΔH_f	Entalpia de fusão
T_c	Temperatura de Cristalização
J.g^{-1}	Joule por grama
Ca^{2+}	Cátion cálcio
Mg^{2+}	Cátion magnésio
Ni^{2+}	Cátion níquel
Sr^{2+}	Cátion estrôncio
Mn^{2+}	Cátion manganês
DP	Diâmetro de partículas
Poli	Polidispersidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	OBJETIVOS DA PESQUISA	28
1.1.1	Objetivos específicos	28
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1	PELE: UMA ROTA PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA	29
2.2	RADIAÇÃO SOLAR	31
2.3	FILTROS SOLARES	33
2.4	NANOTECNOLOGIA	37
2.4.1	Nanocarreadores	40
2.5	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	41
2.6	COMPONENTES DAS NANOPARTÍCULAS	43
2.6.1	Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis	43
2.6.1.1	Poli(ε-caprolactona), PCL	45
2.6.2	Ativos	48
2.6.2.1	Benzofenona-3, BZ-3	49
2.6.3	Óleos	51
2.6.4	Solventes	52
2.6.5	Tensoativos	53
2.6.5.1	Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico, EHL	53
2.7	MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS	55
2.8	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS	58
2.8.1	Avaliação morfológica	59
2.8.2	Massa molar e distribuição de massa molar do polímero	60
2.8.3	Potencial zeta	60
2.8.4	pH das suspensões	60
2.8.5	Determinação da taxa de associação e da forma de associação do ativo	60
2.8.6	Outras técnicas	61
2.9	NANOCARREADORES E A PELE	62
2.10	AMIDO	70

2.10.1	Características e Propriedades	70
2.10.2	Hidrólise do amido	73
2.10.3	Amidos modificados.....	74
2.11	AMIDO: UM PROMISSOR AGENTE TENSOATIVO	75
3	MATERIAIS E MÉTODOS	81
3.1	MATERIAIS	81
3.2	EQUIPAMENTOS, ACESSÓRIOS E VIDRARIAS.....	82
3.3	MÉTODOS E PROCEDIMENTOS	83
3.3.1	Síntese e purificação do homopolímero de ϵ -caprolactona	83
3.3.2	Cromatografia de Permeação em Gel, GPC	84
3.3.3	Espectroscopia no Infravermelho, IR	84
3.3.4	Ressonância Magnética Nuclear, RMN.....	85
3.3.5	Calorimetria Exploratória Diferencial, DSC	85
3.3.6	Caracterização do amido de mandioca	85
3.3.6.1	Umidade	85
3.3.7	Hidrólise enzimática dos amidos modificados	86
3.3.8	Purificação das amostras dos hidrolisados	86
3.3.8.1	Preparação das soluções aquosas dos amidos hidrolisados	87
3.3.9	Cromatografia de permeação em gel, GPC	87
3.3.10	Medidas de tensão superficial.....	87
3.3.11	Preparação das nanocápsulas poliméricas	88
3.3.11.1	Preparo das suspensões de NC contendo amidos hidrolisados: planejamento de misturas	89
3.3.11.2	Extração líquido-líquido da BZ-3 não encapsulada.....	90
3.3.11.3	Determinação do percentual de encapsulação por espectroscopia no ultravioleta	91
3.3.11.4	Determinação do diâmetro médio de partículas e polidispersidade.....	92
3.3.11.5	Medidas de pH	93
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	95
4.1	SÍNTESE DA POLI(ϵ -CAPROLACTONA), PCL	95
4.1.1	Cinética de polimerização	95
4.1.2	Caracterização do lote final de PCL	98
4.2	HIDRÓLISE DOS AMIDOS	106
4.2.1	Caracterização dos lotes de amido hidrolisado.....	110

4.3	FORMULAÇÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO AMIDOS HIDROLISADOS	112
4.3.1	Caracterização físico-química das formulações	114
4.3.1.1	Análise macroscópica.....	114
4.3.1.2	Análises de pH	115
4.3.1.3	Avaliação do diâmetro médio de partículas	116
4.3.1.4	Avaliação da polidispersidade:.....	120
4.3.1.5	Avaliação do percentual de encapsulação	123
5	CONCLUSÃO	127
	REFERÊNCIAS.....	129
	ANEXO A	139
	ANEXO B	143

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas nanoestruturados, tais como nanopartículas poliméricas, lipossomas e nanopartículas lipídicas sólidas são propostos como carreadores para a liberação modificada de fármacos e moléculas ativas, com o intuito de alterar e controlar seus perfis de liberação e permeação (POHLMANN et al., 2008). Estes sistemas exibem características vantajosas, tornando-os promissores veículos para aplicação cosmética. Dentre estas características destaca-se a potencial ação como bloqueadores das radiações UV, atuando como filtros físicos e podendo ser combinados a filtros químicos melhorando a fotoproteção (WISSING; MULLER, 2003; PAESE, 2008). Estes sistemas carreadores apresentam um tamanho reduzido, o qual possibilita um maior contato das moléculas ativas com o estrato córneo, além de facilitar sua formulação em produtos dermatológicos e propiciar confortável aplicação cutânea (ALVES et al., 2007; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; PAESE, 2008).

Considerando que os filtros solares são, em sua grande maioria, constituídos por formas cosméticas emulsionadas, contendo substâncias que reagem com a radiação solar e são usados, geralmente, em condições distantes das ideais (alta incidência de calor e luz), torna-se um desafio para a comunidade científica manter estas emulsões estáveis por muito tempo. Esta instabilidade pode ser contornada, por exemplo, através da seleção adequada dos componentes da formulação. Além disso, atualmente, estudos propõem a inclusão destes filtros solares em nanocápsulas ou ciclodextrinas, diminuindo assim este processo de fotodegradação (MILESI; GUTERRES, 2002).

De acordo com Sinha et al. (2004), a liberação do ativo, a degradação e estabilidade físico-química das nanopartículas podem ser moduladas com a escolha adequada de seus componentes, potencializando suas aplicações.

Dentre os componentes de uma formulação de nanopartículas poliméricas, os tensoativos são fundamentais para impedir sua agregação, após o preparo e durante o armazenamento por promoverem a estabilização física e/ou química da suspensão. Os tensoativos mais utilizados são os de alta hidrofília não iônicos como os polisorbatos (Tween[®]) e, de acordo com o método empregado para obtenção de nanopartículas, também são utilizados tensoativos de baixa hidrofília não iônicos como os ésteres de sorbitana (Span[®]) (BOUCHEMAL et al., 2004; MORAES, 2009).

Em alguns sistemas de emulsão O/A, polissacarídeos ou proteínas atuam como emulsificantes e estabilizantes. Segundo Tesch, Gerhards e Schubert (2002), amido

modificado com anidrido octenil succínico (OSA) foi utilizado para estabilizar emulsões O/A. Baseado nos resultados dos testes de tensão superficial, os autores verificaram que este amido modificado é um agente ativo de superfície, pois o mesmo adsorve na interface evitando o processo de coalescência pelo fato de estabilizar o sistema por impedimento estérico.

Neste contexto, amidos hidrolisados foram testados como agentes estabilizantes nos sistemas de nanopartículas poliméricas para aplicação em formulações fotoprotetoras.

1.1 OBJETIVOS DA PESQUISA

A proposta deste trabalho é introduzir amidos hidrolisados, catiônicos e aniônicos, como tensoativo na encapsulação da benzofenona-3 em uma matriz polimérica de poli(ϵ -caprolactona), avaliando a influência deste tensoativo nas características físico-químicas das nanopartículas, preparadas mediante a técnica de deposição interfacial do polímero pré-formado, empregando-se um planejamento experimental de misturas.

Previamente serão avaliadas as condições da hidrólise enzimática, via planejamento de experimentos, para verificar quais parâmetros (concentração de enzima e tempo de hidrólise) maximizariam este processo reduzindo de maneira satisfatória a massa molar do amido para posterior aplicação como agente tensoativo.

Após obtenção dos amidos hidrolisados, preparar formulações de nanopartículas poliméricas, nas quais o tensoativo da fase aquosa (neste caso Tween 80[®]) seja substituído por amidos hidrolisados, mantendo-se a quantidade total de tensoativos da formulação. Por fim, avaliar a adição dos amidos hidrolisados e seus efeitos, mediante variações nas características físico-químicas das nanopartículas: diâmetro, polidispersão e percentual de encapsulação.

1.1.1 Objetivos específicos

- Sintetizar a matriz polimérica, poli(ϵ -caprolactona), e caracterizá-la;
- Hidrolisar enzimaticamente os amidos catiônicos e aniônicos;
- Empregar amidos catiônicos e aniônicos hidrolisados como agentes tensoativos nas formulações de nanocápsulas poliméricas de benzofenona-3.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PELE: UMA ROTA PARA ADMINISTRAÇÃO TÓPICA

A pele é uma via atrativa e acessível para administração de substâncias, quando comparada com as vias parenteral e oral, devido aos problemas relacionados com as outras rotas. A via cutânea, por ser uma rota alternativa, apresenta como vantagens o mínimo efeito sistêmico e a possibilidade de vetorização somente para áreas afetadas por patógenos, quando o efeito tópico ou transdérmico é desejado (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2001; ASBILL; MICHNIAK, 2000; PAESE, 2008).

A pele é o maior órgão do corpo humano, constituída de três camadas: epiderme, derme e hipoderme (camada mais interna de tecido adiposo), segundo a Figura 1. Este órgão atua como uma barreira protetora, prevenindo a perda de água e bloqueando a entrada de agentes exógenos, além de possuir funções sensoriais e imunológicas (POHLMANN et al., 2008).

Figura 1 – Representação esquemática da pele: a) epiderme; b) derme e c) hipoderme (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

A epiderme é constituída por várias camadas de queratinócitos em diferentes estágios de diferenciação celular, além de conter melanócitos, células de Langerhans (importantes na resposta imune) e células de Merkel (envolvidas na percepção sensorial). As camadas que compõem a epiderme são denominadas como basal (a mais interna delas),

espinhosa, granulosa e córnea (ASBILL; MICHNIAK, 2000; POHLMANN et al., 2008; PAESE, 2008).

A camada mais externa da epiderme é o estrato córneo composto por 10-15 camadas de corneócitos envolvidos por lipídeos extracelulares com uma espessura de 10 a 20 μm . O estrato córneo representa a principal barreira para a penetração de substâncias aplicadas topicamente, devido a sua elevada organização estrutural e hidrofobicidade, podendo atuar também como um reservatório para formulações aplicadas via cutânea (FOLDVARI, 2000; FERNANDEZ et al., 2000; PAESE, 2008).

A derme é um tecido resistente e elástico, o qual proporciona resistência física ao corpo frente às agressões e fornece nutrientes à epiderme. Devido à presença de vasos sanguíneos e linfáticos, fármacos ou moléculas ativas aplicados via cutânea, precisam permear até a derme para serem absorvidos pelo sistema circulatório e conduzidos até o sítio de ação. Entretanto, para a ação tópica ou regional estes compostos ativos não devem ser absorvidos pela corrente sanguínea, permanecendo majoritariamente na epiderme (FOLDVARI, 2000; POHLMANN et al., 2008).

A hipoderme, por sua vez, é a camada mais profunda do tecido sobre a qual repousam as outras camadas. É constituída por tecido adiposo denso, com espessura bastante variável. A hipoderme une a derme e a epiderme ao resto do corpo, permitindo que as duas primeiras deslizem livremente sobre as outras estruturas do organismo. É também conhecida como tecido subcutâneo e atua como reserva energética, na proteção contra choques mecânicos, sendo também considerada um isolante térmico (ROGGIA, 2009).

Muitos fatores são capazes de comandar a liberação das moléculas ativas dentro da pele após a administração de formulações tópicas. Estes fatores incluem massa molecular e lipofilicidade da substância, tipo de formulação, presença de um melhor composto para penetração e estado físico do estrato córneo (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

A eficácia de um produto para aplicação cutânea depende da correlação entre os coeficientes de permeabilidade no estrato córneo e as características químicas da droga. Logo, o grau de absorção da droga através da estrutura cutânea é influenciado pelas características físico-químicas de ambos, substância e veículo. Com relação a cosméticos e formulações dermatológicas, a absorção sistêmica deve ser evitada e somente a permeação cutânea pela difusão de substâncias ativas na epiderme é necessária (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

2.2 RADIAÇÃO SOLAR

O espectro solar que atinge a superfície da Terra é composto principalmente por radiações ultravioletas (100-400 nm), visíveis (400–800 nm) e infravermelhas (acima de 800 nm). Considerando estes intervalos, somente uma faixa de radiação interessa clinicamente à fotoproteção, a radiação ultravioleta (100-400 nm) (PAESE, 2008).

A Figura 2 apresenta o espectro eletromagnético com as principais radiações e suas respectivas frequências.

Figura 2 – Representação esquemática do espectro de radiações.

A presença da radiação solar é perceptível ao nosso organismo por diferentes maneiras. A radiação infravermelha (IV), por exemplo, é percebida sob a forma de calor; a radiação visível (Vis), através das diferentes cores detectadas pelo sistema óptico e a radiação ultravioleta (UV) através de reações fotoquímicas. Estas reações podem estimular a produção de melanina cuja ação é visível a partir do bronzeamento da pele, ou podem causar desde a produção de simples inflamações até graves queimaduras. Há também a possibilidade de ocorrerem mutações genéticas e comportamentos anormais das células (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007; PAESE, 2008).

Da radiação solar que atinge a Terra, 38,9 % consiste de luz visível, 54,3 % são raios infravermelhos e o restante, radiação ultravioleta. Deste restante, 5 % são radiações UVB e 95 % UVA (MAIER; KORTING, 2005).

A radiação UV estimula reações fotoquímicas que têm efeitos importantes sobre a pele humana, dependendo do comprimento de onda e da quantidade de energia e pode ser dividida em UVA, UVB e UVC, de acordo com as regiões no espectro (THORNHIL, 1993).

Os raios UVA (320-400 nm) são responsáveis pelo bronzeado direto ou imediato, os quais penetram na pele alcançando a derme (MILESI; GUTERRES, 2002). Seus efeitos biológicos são acumulativos interferindo nos fenômenos do fotoenvelhecimento e na gênese de determinados cânceres, decorrentes da exposição frequente e prolongada ao sol de forma inadequada (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007; PAESE, 2008). Quando comparada à radiação UVB, sua capacidade em induzir eritema na pele humana é aproximadamente mil vezes menor, porém penetra mais profundamente na derme. A radiação UVA também pode agir de maneira indireta, formando radicais livres (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007).

A radiação UVB (280-320 nm), por outro lado, provoca o bronzeado indireto, porém é mais nociva potencializando os efeitos da radiação UVA (MILESI; GUTERRES, 2002). A exposição frequente e intensa à radiação UVB pode causar lesões no DNA, assim como suprimir a resposta imunológica da pele. Desta forma, além de ser a causadora do envelhecimento precoce, aumenta o risco de mutações fatais, manifestando-se sob a forma de câncer de pele (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007).

Já a radiação UVC (100-280 nm) é portadora de elevadas energias, característica que a torna extremamente lesiva aos seres vivos. Possui potencial carcinogênico e mutagênico, porém são retidas na camada de ozônio. São consideradas letais (germicidas), entretanto não são efetivas na estimulação da pigmentação da pele podendo causar eritema (MILESI; GUTERRES, 2002).

A energia da radiação solar aumenta com a redução do comprimento de onda, logo a radiação UV por apresentar menor comprimento de onda é a mais energética e propensa a induzir reações fotoquímicas. Outro fator importante é a capacidade desta radiação permear a camada da pele (Figura 3). A radiação UVA penetra mais profundamente nas camadas da pele, comparada à radiação UVB, atingindo a derme e causando o fotoenvelhecimento (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007). Apesar da radiação IV

penetrar mais que as radiações UVA e UVB, o resultado será apenas um aquecimento corpóreo, como dito anteriormente.

Figura 3 – Penetração cutânea das radiações (ENGELSTEIN, 2006).

Os danos à saúde, relacionados à radiação UV, podem ser minimizados pelo emprego de protetores solares, os quais estão no mercado há mais de 60 anos. Baseado neste contexto, diversas pesquisas vem sendo desenvolvidas para aumentar a proteção da pele contra os efeitos da radiação solar.

2.3 FILTROS SOLARES

Os filtros solares, ou fotoprotetores, têm sido utilizados por muitos anos para proteger a pele humana contra diversos efeitos da radiação solar, sejam eles agudos ou crônicos (CHISVERT; SALVADOR; PASCUAL-MARTÍ, 2001; YESUDIAN, 2002; GONZÁLEZ et al., 2006; PAESE, 2008).

Inicialmente os filtros solares eram empregados somente para proteger a pele contra o desenvolvimento de eritemas, mas atualmente são utilizados para evitar o envelhecimento precoce (fotoenvelhecimento), fotossensibilidade, câncer de pele e danos

causados por radicais livres (SCHULZ et al., 2002; GONZÁLEZ et al., 2006; PAESE, 2008).

No contexto histórico, sabe-se que os povos antigos (gregos e egípcios) usavam roupas de algodão, além de chapéus, luvas e até mesmo sombrinhas. Já os tibetanos, cobriam o corpo com uma mistura de ervas, o que atualmente poderia ser considerado um filtro solar (URBACH, 2001; MILESI; GUTERRES, 2002).

Por volta de 1800, os efeitos da radiação solar já eram estudados e Sir William Herschel descreveu o eczema solar. Posteriormente, vários estudos foram propostos, como o de Windmarr, o qual provou que o eritema solar era causado pela radiação ultravioleta, por meio de um experimento com solução ácida de sulfato de quinina. Somente anos depois Hammer indicou a solução ácida de quinina como filtro solar, descrevendo as doenças causadas pela fotossensibilização. Em seguida, Paul Unna também sugeriu um tipo de fotoprotetor, o extrato de *Aesculus*, o qual foi comercializado com os nomes de Zeozon[®] e Ultrazeozon[®]. E neste mesmo período Leopold Freund descobriu que as ondas de menor comprimento (< 325 nm) são a principal causa do eritema (URBACH, 2001; MILESI; GUTERRES, 2002).

O primeiro registro do uso popular de filtros solares no mundo ocorreu nos Estados Unidos (EUA) em 1928. O produto em si, uma emulsão, era composto por duas substâncias capazes de absorver a radiação UV, o salicilato de benzila e o cinamato de benzila (SANTOS, 2007).

O fotoprotetor mais famoso do início do século XX, “*Ambre Solaire*”, foi lançado em 1935 por Eugene Schueller, contendo o salicilato de benzila como filtro UV em um veículo oleoso. A partir daí, Schueller fundou a companhia atualmente conhecida como L’Oreal (URBACH, 2001).

Com o aumento dos efeitos provocados pela radiação UV, as pesquisas em torno dos protetores solares continuaram evoluindo, assim como as formas de proteção. E, durante a II Guerra Mundial, foi desenvolvido o filtro que, por muitos anos manteve-se no mercado como favorito nos EUA, o ácido *p*-aminobenzóico (PABA) e seus derivados, os quais absorvem na faixa de 260 a 313 nm (WOLF et al., 2001; URBACH, 2001; MILESI; GUTERRES, 2002). Este filtro solar é insolúvel em água e dificilmente removido, entretanto mostrou-se alergênico e possivelmente cancerígeno sendo praticamente retirado do mercado na década de 80, gerando uma busca por novos produtos denominados PABA-free (WOLF et al., 2001; MILESI; GUTERRES, 2002).

Em 1962, a benzofenona (ácido 3-benzil,4-hidroxi,6-metoxi-benzeno-sulfônico) foi introduzida como filtro solar por absorver na região UVA (WOLF et al., 2001; MILESI; GUTERRES, 2002).

Nas duas últimas décadas, com o conhecimento e a divulgação dos efeitos nocivos do sol, o mito da pele bronzeada e saudável foi abalado. Hoje, sabe-se que a radiação solar é benéfica, porém uma exposição direta e excessiva pode provocar danos graves, como o câncer de pele. Com isso, houve um aumento da conscientização populacional assim como a procura pela fotoproteção e a busca por novos produtos que possam atender as necessidades do consumidor, fornecendo a proteção ideal.

Após o PABA foram desenvolvidos diversos filtros solares mais modernos como a oxibenzona, octocrileno, salicilatos, antranilatos, cinamatos, dióxido de titânio e óxido de zinco. Desde os anos 90 tornaram-se mais populares devido ao desenvolvimento da forma micronizada (transparente) (WOLF et al., 2001; MILESI; GUTERRES, 2002). Atualmente, estes filtros são encontrados no mercado em uma grande variedade de formas cosméticas, entretanto as pesquisas prosseguem em busca de produtos mais eficientes (PAOLA, 2001; MILESI; GUTERRES, 2002).

Os filtros solares podem ser divididos em duas categorias: filtros físicos e filtros químicos. Os filtros físicos ou inorgânicos são agentes opacos, os quais refletem e espalham a radiação UV e visível, formando um filme sobre a pele. Os mais utilizados são: dióxido de titânio, TiO_2 , e óxido de zinco, ZnO . Uma desvantagem na utilização desses filtros é a formação de uma película branca sobre a pele, diminuindo sua aceitabilidade. As preparações farmacêuticas modernas utilizam versões microparticuladas desses filtros, cujas partículas são reduzidas durante o processo de obtenção até dimensões que não absorvem e espalham radiação visível, mas somente radiação UV, permitindo que os produtos não formem películas perceptíveis sobre a pele, aumentando assim sua aceitabilidade (LAUTENSCHLAGER; WULF; PITTELKOW, 2007; PAESE, 2008).

Os filtros químicos ou orgânicos, de uma maneira geral, apresentam grupos cromóforos em sua estrutura química, os quais absorvem a radiação UV transformando-a em radiações de menor energia, como calor e radiação fluorescente, inofensivas ao organismo humano. Estes filtros podem ser representados por substâncias aromáticas com grupos carboxílicos que, em sua maioria, possuem um grupo doador de elétrons na posição *orto* ou *para* do anel. O mais utilizado é a oxibenzona ou benzofenona-3 (MILESI; GUTERRES, 2002; PAESE, 2008).

A Resolução - RDC nº 47 de 16 de março de 2006 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define a “lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes” que abrange 38 compostos. Portanto, o uso e a concentração de substâncias para formulação de fotoprotetores no Brasil são restritos a esta lista. A Figura 4 exibe alguns exemplos de moléculas presentes nos filtros solares.

Figura 4 – Compostos utilizados nas principais associações de fotoprotetores comercializadas no Brasil (adaptado de GUARATINI et al., 2009).

Os filtros solares são utilizados topicamente e alguns efeitos adversos como fotossensibilidade e irritação cutânea podem ocorrer com o emprego de filtros químicos (SCHULZ et al., 2002; PAESE, 2008). Para evitar este efeito, o filtro deve ser fotoquimicamente estável, quando exposto a luz solar; dissolver ou dispersar facilmente e

permanentemente no veículo; e permanecer na pele após transpiração ou natação. Além disso, não deve ser tóxico ou causar irritação/alergia após o contato (LAUTENSCHLAGER; WULF; PITTELKOW, 2007; FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007; PAESE, 2008).

A eficácia de um filtro solar é expressa através do fator de proteção solar (FPS), o qual indica a capacidade de proteção à pele contra a queimadura causada pela radiação UV. O FPS é a razão do tempo necessário para que a radiação UV produza um eritema perceptível (dose eritematosa mínima; DEM) com a pele protegida pelo filtro em relação à DEM sem a proteção deste filtro. Na prática, significa quantas vezes mais uma pessoa pode ficar exposta ao sol com filtro solar sem se queimar em relação ao tempo que queimaria sem filtro (MILESI; GUTERRES, 2002; PAESE, 2008).

Além do FPS, a eficácia dos protetores solares está diretamente correlacionada com sua formulação. Isto é, praticamente todos os componentes podem interferir no produto final, aumentando ou diminuindo este fator. Por este motivo, uma seleção criteriosa das matérias-primas empregadas é imprescindível, pois características como espalhabilidade e resistência à água, são decorrentes da escolha adequada destes componentes (MILESI; GUTERRES, 2002).

Considerando que os filtros solares são, em sua grande maioria, constituídos por formas cosméticas emulsionadas, contendo substâncias que reagem com a radiação solar e são usados, geralmente, em condições distantes das ideais (alta incidência de calor e luz), torna-se um desafio para a comunidade científica manter estas emulsões estáveis por muito tempo. Esta instabilidade pode ser contornada, por exemplo, através da seleção adequada dos componentes da formulação. Além disso, atualmente, estudos propõem a inclusão destes filtros solares em nanocápsulas ou ciclodextrinas, diminuindo assim este processo de fotodegradação (MILESI; GUTERRES, 2002).

2.4 NANOTECNOLOGIA

Ciência e tecnologia sempre andam lado a lado e dependem do desenvolvimento técnico dos instrumentos de medida, observação, análise e de produção utilizados de maneira integrada para desenvolver novos produtos. Porém, com o aperfeiçoamento e evolução constante da instrumentação, principalmente a partir de meados do século

passado, tornou-se possível o estudo dos materiais em escalas cada vez menores, chegando à escala nano (ARAKI, 2007).

Com isso, houve uma revolução na ciência e tecnologia desde o entendimento que os materiais em escala nanométrica (0,1 a 100 nm) poderiam apresentar novas características (comportamentos e/ou propriedades) diferentes daquelas apresentadas em escala macroscópica. A este ramo da ciência, o qual estuda esses novos materiais/características, foi atribuído o nome de nanociência, ou, mais comumente, nanotecnologia (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006). Pode-se dizer ainda, que a nanotecnologia é o conjunto de ações, o qual envolve pesquisa, desenvolvimento e inovação obtidos graças às especiais propriedades intrínsecas da matéria organizada a partir de estruturas de dimensões nanométricas (BARRIOS, 2010).

Considerando que a redução das dimensões das estruturas seja feita de maneira controlada, atingindo a escala nanométrica, estes materiais terão propriedades únicas. E essas novas formas de dispositivos e materiais serão precursoras de uma idade revolucionária para a ciência e tecnologia (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006).

A Tabela 1 apresenta os eventos históricos mais importantes na era da nanotecnologia de maneira cronológica.

Tabela 1 – Eventos históricos importantes da nanotecnologia (adaptada de DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006).

Ano	Fato importante na nanotecnologia
1959	Richard Feynman proferiu a palestra “ <i>There’s a plenty of room at the bottom</i> ” para a <i>American Chemical Society</i> , no Instituto de Tecnologia da Califórnia (EUA).
1974	O pesquisador da Universidade de Tóquio, Norio Taniguchi, atribuiu o nome nanotecnologia ao campo da Engenharia em escala submicrométrica.
1981	O microscópio de varredura por tunelamento (STM) foi inventado pelos pesquisadores da IBM, Gerd Binnig e Henrich Röhrer.
1981	Primeiro artigo científico publicado sobre nanotecnologia por K. Eric Drexler, pesquisador do Instituto de Tecnologia de Massachusetts – MIT.
	O Instituto Foresight é estabelecido para auxiliar no desenvolvimento e promoção da nanotecnologia.
	Publicação do livro <i>The engines of creation</i> por K. Eric Drexler, com teorias que ainda continuam revolucionando a nanotecnologia.
1986	Richard Smalley, da Universidade de Rice, descobre os <i>buckminsters</i> fulerenos ou <i>buckyballs</i> .
	Invenção do microscópio de força atômica (FM), também pelos pesquisadores da IBM, Gerd Binnig e Henrich Röhrer.
1996	Richard Smalley desenvolve um método de produção de nanotubos de diâmetros uniformes.
1997	A primeira empresa em nanotecnologia é criada – a Zyvex.
1997	Primeiro dispositivo nanomecânico baseado na estrutura da molécula de DNA é criticado por Ned Seeman.
1999	Os cientistas Mark Reed e James M. Tour criam um interruptor (chave) do “computador molecular” usando uma única molécula.
2000	Pesquisadores da Universidade de Rice desenvolveram métodos de transformação de nanotubos de carbono em estruturas rígidas multicomponentes.
2001	Pesquisadores da IBM desenvolvem métodos para o crescimento de nanotubos.

Por ser um setor de pesquisa e desenvolvimento muito vasto e interdisciplinar, a nanotecnologia baseia-se nos mais diversificados tipos de materiais (polímeros, cerâmicas, metais, semicondutores, compósitos e biomateriais), estruturados em escala nanométrica (nanoestruturados) de modo a formar blocos de construção (*building blocks*) como nanopartículas, nanotubos e nanofibras, que por sua vez são formados a partir de átomos ou moléculas (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006).

De uma maneira específica, quando a nanotecnologia é aplicada às ciências da vida, recebe o nome de nanobiotecnologia. Nessa área, as principais nanoestruturas estudadas são as nanopartículas (lipídicas e/ou poliméricas), os lipossomas, os dendrímeros e os nanotubos de carbono (VAUTHIER et al., 2003). Devido ao crescente número de publicações e pesquisas envolvendo nanotecnologia, a produção de micro e nanopartículas tem sido relatada como uma alternativa promissora, pois estas nanoestruturas promovem um direcionamento a sítios específicos, garantindo um melhor controle de liberação dos ativos, bem como o seu efeito terapêutico.

Em 2007, foi verificado um crescimento substancial na disponibilidade de nanoprodutos ao consumidor, sendo essencial a busca pela normatização desses produtos, a fim de que as vantagens desta tecnologia inovadora sejam ressaltadas.

2.4.1 Nanocarreadores

A história dos nanocarreadores iniciou-se no começo do século 20, quando Paul Ehrlich propôs o modelo conhecido como “bala mágica”, no qual um fármaco seria ligado ao transportador e direcionado ao alvo específico, exibindo sua atividade característica. Entre 1950 e 60, um dos pioneiros no desenvolvimento de sistemas miniaturizados (nano e micropartículas) como sistemas de liberação foi o Dr. Peter Paul Speiser. Porém, somente no final da década de 70 foi dada uma maior atenção ao desenvolvimento de nanopartículas como carreadores para liberação de fármacos (SANTOS; CASTANHO, 2002; KAYSER; LEMKE; HERNÁNDEZ-TREJO, 2005; KREUTER, 2007; MORAES, 2009).

Atualmente, ainda é um grande desafio desenvolver novos sistemas transportadores (nanocarreadores) que possibilitem o direcionamento da molécula ativa ao alvo específico (órgão, tecido, célula), para que as necessidades terapêuticas dos pacientes sejam atingidas (RAWAT et al., 2006; MORAES, 2009).

Os nanocarreadores podem ser definidos como materiais ou dispositivos nanométricos compostos de diferentes materiais biodegradáveis naturais ou sintéticos (lipídeos, polímeros e até mesmo compostos organometálicos). A Figura 5 destaca os principais sistemas de nanocarreadores, dentre os diversos tipos existentes (RAWAT et al., 2006; MORAES, 2009).

Figura 5 – Principais nanocarreadores empregados em sistemas nanoparticulados. (adaptado de RAWAT et al., 2006).

Nesta dissertação serão abordadas somente as nanopartículas poliméricas, assim como suas diversas características e aplicações.

2.5 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Nanopartículas poliméricas biodegradáveis possuem um grande interesse na comunidade científica, em relação aos lipossomas, devido às suas potencialidades terapêuticas e à maior estabilidade nos fluídos biológicos e durante o armazenamento (SOPPIMATH et al., 2001; SCHAFFAZICK et al., 2003).

As nanopartículas poliméricas (NP) são sistemas carreadores de fármacos e moléculas ativas que apresentam diâmetro de 10 a 1000 nm. De acordo com sua

composição/organização estrutural e método de preparação, as NP podem ser classificadas em nanocápsulas (NC) e nanoesferas (NE).

As NC (Figura 6) são compostas por uma matriz polimérica disposta ao redor de um núcleo oleoso, podendo o ativo (droga) estar dissolvido neste núcleo oleoso e/ou adsorvido à parede polimérica. Já as NE (Figura 7), por sua vez, não apresentam óleo em sua composição e são constituídas por um invólucro polimérico, no qual o ativo pode ficar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Figura 6 – Representação esquemática de nanocápsulas poliméricas: a) ativo dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) ativo adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas (adaptado de SCHAFFAZICK et al., 2003).

Figura 7 – Representação esquemática de nanoesferas poliméricas: a) ativo retido na matriz polimérica das nanoesferas; b) ativo adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas (adaptado de SCHAFFAZICK et al., 2003).

Nestes sistemas nanoparticulados as moléculas ativas são liberadas por meio de mecanismos que podem envolver a dessorção do composto ativo, difusão através dos poros na matriz ou parede polimérica, difusão através da matriz ou parede polimérica, desintegração, dissolução ou erosão do polímero (SONAJE et al., 2007; MORAES, 2009).

Os sistemas nanoparticulados têm sido desenvolvidos visando inúmeras aplicações terapêuticas, sendo projetados, principalmente, para a administração parenteral, oral ou oftálmica (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Devido às suas características promissoras, nanopartículas também são propostas como veículos tópicos, principalmente para fotoprotetores, com a intenção de prolongar o tempo de resistência dos filtros no estrato córneo, assim como evitar o processo de fotodegradação mantendo sua estabilidade (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004; JIMÉNEZ et al., 2004; WEIS-ANGELI, 2007; PAESE, 2008).

De acordo com Sinha et al. (2004), a liberação do ativo, a degradação e estabilidade físico-química das NP podem ser moduladas com a escolha adequada de seus componentes, potencializando suas aplicações.

2.6 COMPONENTES DAS NANOPARTÍCULAS

Geralmente, as NP são compostas por polímero, tensoativo, óleo (nanocápsulas) e ativo, além do solvente orgânico utilizado no método de preparação, o qual é posteriormente eliminado (SCHAFFAZICK et al., 2003; MORAES, 2009).

Para a preparação de NP como carreadores de ativos são impostas algumas restrições físico-químicas e biológicas em relação à escolha do polímero empregado. A via de administração, por exemplo, é um dos fatores mais importantes na escolha do polímero a ser empregado na formulação. No caso da administração parenteral, o polímero deve ser biodegradável; para administração oral ou local o polímero não precisa ser necessariamente biodegradável, porém deve ser biocompatível (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006; MORAES, 2009).

2.6.1 Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis

Os polímeros biocompatíveis podem ser definidos como materiais que, ao serem implantados/administrados no organismo não provocam qualquer reação adversa após o contato com tecidos ou órgãos. Estes materiais biocompatíveis, assim como seus produtos de degradação, não devem provocar resposta inflamatória ou tóxica (NAIR; LAURENCIN, 2007; MORAES, 2009). Por outro lado, os polímeros biodegradáveis são materiais que

sofrem degradação total ou parcial em contato com elementos biológicos (tecidos, células, enzimas etc.) (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006; MORAES, 2009).

Vários polímeros são utilizados para a preparação de NP, porém os poliésteres alifáticos são os mais atrativos devido à sua biodegradabilidade, disponibilidade, biocompatibilidade, ausência de toxicidade e pela facilidade de incorporar uma ampla variedade de ativos (PICOS et al., 2000; MORAES, 2009). A degradação das NP, resultado da ação enzimática e/ou hidrólise da ligação éster, pode ser afetada pelas propriedades do próprio polímero, tais como: composição química, massa molar, solubilidade, hidrofobicidade/hidrofiliicidade, temperatura de transição, estrutura (cristalina ou amorfa), entre outras (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006; NAIR; LAURENCIN, 2007; MORAES, 2009).

Os polímeros mais utilizados, dentre os poliésteres alifáticos existentes, são o poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico-*co*-ácido-glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), polihidroxivalerato (PHV) e polihidroxibutirato (PHB); e os mesmo são exibidos na Figura 8 (MORAES, 2009).

Há também os polímeros naturais, como quitosana, ácido algínico (alginato) e gelatina, os quais também são empregados na preparação de NP (REIS et al., 2006; MORAES, 2009). Considerando que a velocidade de degradação destes polímeros é um fator importante mediante sua aplicação, esta velocidade pode ser regulada por variações na composição, na massa molar do polímero e nos métodos de preparação das nanopartículas (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006).

Figura 8 – Principais poliésteres alifáticos utilizados no preparo de nanopartículas poliméricas (adaptado de FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

Os poliésteres alifáticos, de uma maneira geral, apresentam boa aplicabilidade, porém, quando administrados intravenosamente, por exemplo, são identificados pelo organismo como corpos estranhos e eliminados quase que instantaneamente da circulação sanguínea antes de exercerem sua função. Devido a essa limitação, muitos esforços estão sendo realizados para desenvolver materiais capazes de não sofrerem qualquer tipo de rejeição (MORAES, 2009). Os copolímeros constituem uma boa estratégia para incorporação de ativos para administração intravenosa. No entanto, a incorporação de substâncias ativas com elevada solubilidade em água nestes copolímeros é baixa, devido a perda da molécula ativa na porção aquosa durante a formação da nanopartícula. Portanto, estes casos requerem o desenvolvimento de técnicas mais sofisticadas de incorporação (GOVENDER et al., 2000; AVGOUSTAKIS et al., 2003; MORAES, 2009).

Dos poliésteres alifáticos citados, um que merece destaque é a poli(ϵ -caprolactona) (PCL). Sua biodegradabilidade associada à inocuidade de seu produto de degradação e alta permeabilidade a várias moléculas tem motivado o interesse para o desenvolvimento de diversos sistemas de liberação controlada. Outra propriedade da PCL, a qual tem estimulado várias pesquisas, é sua excepcional habilidade em formar blendas com outros polímeros (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006). Devido às suas características, a poli(ϵ -caprolactona) será abordada separadamente, evidenciando suas propriedades físico-químicas, mecanismos de polimerização e aplicações.

2.6.1.1 Poli(ϵ -caprolactona), PCL

A poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é um poliéster sintético de grande interesse para a área de biomateriais, devido, principalmente, à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade (SINHA et al., 2004; ALVES, 2008).

A PCL (Figura 9) é um polímero semicristalino, com temperatura de transição vítrea (T_g) de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e temperatura de fusão cristalina (T_m) entre 59 e $64\text{ }^{\circ}\text{C}$, dependendo de sua natureza cristalina. É um polímero passível de processamento através de formas convencionais de transformação de termoplásticos, como extrusão e injeção. À temperatura ambiente, a PCL é solúvel em clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexanona e 2-nitropropano. Possui baixa solubilidade em acetona, 2-butanona, acetato de etila, dimetilformamida e acetonitrila e é insolúvel em álcool, éter de petróleo e dietil éter (SINHA et al., 2004).

Figura 9 – Estrutura da poli(ε-caprolactona), PCL (adaptado de FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

Este poliéster pode ser usado em combinação com outros polímeros tais como, propionato de celulose, acetato butirato de celulose, poli(ácido lático), poli(ácido lático-co-ácido glicólico), formando blendas poliméricas. A compatibilidade dessas blendas depende das proporções dos polímeros empregados, sendo este um critério usado para controlar a permeabilidade dos sistemas de liberação (SINHA et al., 2004).

Na década de 30 a polimerização por abertura de anel (*Ring-Opening Polymerization* - ROP) da PCL foi estudada por Van Natta, Hill e Carothe (1934). Já a sua biodegradabilidade foi primeiramente identificada em 1973 (SINHA et al., 2004).

A PCL, geralmente, é sintetizada pelas técnicas de polimerização em massa, solução ou suspensão (BARAKAT et al., 2001; CASTRO, 2006). Em todas estas técnicas é empregado um iniciador organometálico na presença ou ausência de um co-iniciador contendo hidrogênio ativo (CASTRO, 2006). A Figura 10 ilustra, de maneira esquemática, a síntese da PCL.

Figura 10 – Representação esquemática da síntese da PCL.

Os metais ativos com baixa toxicidade, presentes nos compostos orgânicos, mais utilizados como catalisadores são: estanho (KRICHELDORF; KREISER-SAUNDERS, 2000), alumínio (BARAKAT et al., 2001), ítrio (CHAMBERLAIN et al., 2000), zinco (CHISHOLM et al., 2000), lítio (XIE et al., 1999) e ferro (O'KEEFE et al., 2001). Estes catalisadores são empregados na polimerização da ε-caprolactona (CL) com o objetivo de

controlar a microestrutura do polímero, já que esta afeta as propriedades mecânicas e a taxa de biodegradabilidade (CASTRO, 2006).

De acordo com FDA, somente dois sais de estanho são mais utilizados para sintetizar polímeros destinados às aplicações biomédicas, cloreto de estanho e 2-etilhexanoato de estanho. Este último, também conhecido como octanoato de estanho, SnOct_2 , (BENDIX, 1998; KRICHELDORF, 2001; CASTRO, 2006) é o mais empregado pois, além de ser aceito pelo FDA, apresenta boa solubilidade em solventes orgânicos e em monômeros de ésteres cíclicos, facilitando, assim, a síntese (RYNER et al., 2001; CASTRO, 2006).

Os estudos sobre a polimerização por abertura de anel (ciclo-adição) da CL foram concentrados principalmente na determinação de estruturas de centros ativos e nas relações entre as cinéticas de propagação e reações secundárias (como transesterificação inter ou intramolecular) (SLOMKOWSKI; SOSNOWSKI; GADZINOWSKI, 1998; CASTRO, 2006).

A ϵ -caprolactona pode ser polimerizada por processo catiônico, aniônico e inserção por coordenação (pseudoaniônico). As estruturas químicas dos centros ativos catiônico, aniônico e inserção por coordenação estão representadas nas Figuras 11, 12 e 13 respectivamente.

Figura 11 – Polimerização catiônica da ϵ -caprolactona (adaptado de SLOMKOWSKI; SOSNOWSKI; GADZINOWSKI, 1998).

Figura 12 – Polimerização aniônica da ϵ -caprolactona (adaptado de SLOMKOWSKI; SOSNOWSKI; GADZINOWSKI, 1998).

Figura 13 – Polimerização por inserção por coordenação da ϵ -caprolactona (adaptado de SLOMKOWSKI; SOSNOWSKI; GADZINOWSKI, 1998).

A PCL sofre degradação microbiana e enzimática (COULEMBIER et al., 2006; ALVES, 2008) devido à hidrólise de suas ligações ésteres. Entretanto, sua taxa de degradação é bastante lenta (de 2 a 3 anos), quando comparada a outros polímeros biodegradáveis, como o PHB.

O fato de a PCL possuir uma taxa de hidrólise química muito baixa costuma ser uma desvantagem para aplicações médicas, exceto para uso na liberação controlada de drogas específicas (COULEMBIER et al., 2006).

2.6.2 Ativos

De uma forma geral, moléculas lipofílicas possuem uma maior afinidade com a matriz polimérica e com o núcleo oleoso das NC, exibindo assim uma maior eficiência de incorporação em relação aos ativos hidrofílicos (MORAES, 2009).

As benzofenonas são a única classe de filtros solares formadas por cetonas aromáticas. A deslocalização por ressonância é acrescida pela presença de um grupamento doador de elétrons nas posições *orto* e/ou *para*. Já o grupamento carbonila atua como receptor de elétrons (COSTA NETO, 2009).

2.6.2.1 *Benzofenona-3, BZ-3*

A benzofenona-3, (BZ-3) (2-hidroxi-4-metoxi benzofenona), também conhecida como oxibenzona, Eusolez 4360[®], metanona e difenilcetona é o filtro solar químico mais amplamente empregado em todo o mundo, desde o final da década de 50. Para aplicações tópicas, necessita ser adequadamente solubilizada em emulsões, a fim de evitar sua recristalização e/ou perda de efetividade (COSTA NETO, 2009).

A BZ-3 é considerada um filtro químico de amplo espectro, pois possui a capacidade de absorver pequenas faixas das radiações UVA (320 a 360 nm), UVB (290 a 320 nm) e UVC (250 a 290 nm), apresentando uma excelente estabilidade. Seus picos de absorção máxima situam-se nos comprimentos de onda (λ) de 288 e 325 nm. Possui massa molar de 228,2 g/mol, ponto de fusão entre 62 e 64 °C, dose letal (DL₅₀) (oral) menor que 5 g/kg. É solúvel em acetona, álcool etílico, acetonitrila, hexano e insolúvel em água e óleo mineral (YESUDIAN, 2002; FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007; PAESE, 2008).

A Figura 14 apresenta a fórmula estrutural da BZ-3.

Figura 14 – Fórmula estrutural da 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (benzofenona-3, BZ-3).

De uma maneira geral, as benzofenonas são fotoquimicamente estáveis frente às radiações UV, porém esta estabilidade tem sido questionada devido à oxidação de seus derivados, formando compostos intermediários reativos (MAIER et al, 2001; MAIER et al., 2005; SIQUEIRA, 2008).

Embora conhecida por seu caráter alergênico, a ocorrência de urticária causada por BZ-3 é rara (YESUDIAN, 2002). Apesar da atividade de foto-absorção da BZ-3 ocorrer na superfície da pele, este filtro químico pode também ser absorvido e acumular-se no organismo (SIQUEIRA, 2008). Neste contexto, foram realizados alguns estudos para avaliar a penetração cutânea da BZ-3. Estes estudos demonstram que a BZ-3 pode penetrar através da barreira epidérmica, após sua aplicação por fricção na superfície do corpo e,

posteriormente, ser detectada na urina (PAESE, 2008). Portanto, para a determinação da severidade de possíveis reações alérgicas, os seguintes fatores tornam-se extremamente importantes: extensão da área de superfície corporal na qual a BZ-3 foi aplicada, quantidade de BZ-3 e número de aplicações (YESUDIAN, 2002; GONZÁLEZ et al., 2006).

Baseado neste contexto, Okereke, Barat e Abdel-Rahman (1995), verificaram a segurança da BZ-3 incorporada em uma pomada. As aplicações foram realizadas em ratos, duas vezes por semana por um período de quatro semanas, na dose de 100 mg/Kg de peso corpóreo. Após avaliação dos parâmetros bioquímicos, hematológicos e patológicos, nenhuma alteração foi observada nos animais tratados com BZ-3.

Da mesma maneira, Hayden, Benson e Roberts (1997) avaliaram a absorção sistêmica da BZ-3 em filtros solares aplicados topicamente. Após 12 horas de ensaio, de 1 a 2 % da quantidade de BZ-3 aplicada na pele foi detectada na urina. Embora esta absorção seja considerada pequena, os autores sugeriram que este filtro não seja utilizado em grandes áreas da pele, por um período prolongado e repetitivo.

Outro estudo também demonstrou que 0,5 % da quantidade total de BZ-3 aplicada topicamente sobre a pele de voluntários foi detectada na urina após 48 horas (GONZÁLEZ; FARBROT; LARKO, 2002).

A ANVISA aprova o uso da BZ-3 como filtro solar em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes, na concentração máxima de 10 %. Porém para concentrações maiores que 0,5 % ressalta que deve ser incluída a seguinte advertência na rotulagem: contém oxibenzona (ROGGIA, 2009; FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007).

O FDA aprova o uso da BZ-3 em cosmetologia, como protetor solar; na agricultura, em filmes utilizados como fotoestabilizantes e; na indústria, para fabricação de tintas (OKEREKE; BARAT; ABDEL-RAHMAN, 1995; ROGGIA, 2009).

De uma maneira geral, a fotoproteção dos filtros solares, sob a forma livre, é perdida mediante absorção sistêmica ou fotodegradação. Uma alternativa empregada para evitar estes processos é a veiculação destes compostos em sistemas nanoestruturados como, por exemplo, as nanopartículas poliméricas (CASWELL, 2001; MILESI; GUTERRES, 2002).

2.6.3 Óleos

Alguns critérios para a escolha do núcleo oleoso das NC são relevantes, tais como ausência de toxicidade, elevada estabilidade físico-química, incapacidade de solubilizar o polímero e alta afinidade pelo ativo (MORAES, 2009).

Os óleos mais comumente utilizados são os triacilgliceróis com cadeia média ou longa como, por exemplo, a mistura de triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico, α -tocoferol, laurato de hexila, etc. Propriedades como densidade e viscosidade podem interferir significativamente no diâmetro médio das nanopartículas (BOUCHEMAL et al., 2004; MORAES, 2009).

Dos núcleos oleosos citados, o mais utilizado é a mistura de triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico, conhecida comercialmente como Mygliol 810[®]. As Figuras 15 e 16 apresentam as estruturas dos triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico, respectivamente, os quais constituem o Mygliol 810[®].

Figura 15 – Fórmula estrutural do triglicerídeo do ácido cáprico.

Figura 16 – Fórmula estrutural do triglicerídeo do ácido caprílico.

O Miglyol[®] apresenta algumas vantagens em relação aos óleos naturais como alta estabilidade contra oxidação; excelente penetração e ação emoliente, isto é, hidrata a pele e restaura a oleosidade perdida devido ao ressecamento. Estas características tornam o Miglyol[®] o núcleo oleoso mais utilizado na preparação de nanocápsulas, sendo este considerado um óleo padrão para aplicações cosméticas e farmacêuticas.

2.6.4 Solventes

Os solventes orgânicos empregados no preparo de NP são classificados de acordo com a Conferência Internacional de Harmonização (ICH) em função dos possíveis riscos a saúde:

- Classe 1: solventes que devem ser evitados (benzeno, tetracloreto de carbono, etc.);
- Classe 2: solventes que devem ser limitados (tolueno, clorofórmio, acetonitrila, cicloexano, etc.);
- Classe 3: solventes com baixa toxicidade potencial (acetato de etila, acetona, ácido acético, etanol, etc.).

O critério para a escolha do solvente orgânico, além da menor toxicidade, é a capacidade de solubilizar o fármaco, o polímero e o método, já que alguns métodos exigem utilização de solventes orgânicos miscíveis em água e outros não (REIS et al., 2006; MORAES, 2009).

2.6.5 Tensoativos

Os tensoativos são fundamentais para impedir agregação das NP após o preparo e durante o armazenamento por promoverem a estabilização física e/ou química da suspensão. Segundo o Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico (EHL), os tensoativos podem ser classificados em tensoativos de alta hidrofília (hidrofílicos) ou de baixa hidrofília (lipofílicos).

2.6.5.1 Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico, EHL

A noção de Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico foi introduzida por Griffin (1949), o qual estabeleceu um sistema para classificar numericamente determinados compostos, de acordo com suas características de hidrofília e lipofília.

Cada tensoativo possui um determinado número de EHL, podendo variar de 0 (totalmente lipofílico) a 20 (totalmente hidrofílico), de acordo com sua estrutura química. Ou seja, quanto maior o valor de EHL, maior o número de grupos hidrofílicos na molécula em relação ao número de grupos lipofílicos e vice-versa. Este valor de EHL pode ser calculado sabendo-se o número e o tipo dos grupos lipofílicos e hidrofílicos presentes na molécula, segundo a Equação 1 apresentada por Griffin (1949):

$$EHL = 7 + (\sum \text{grupos hidrofílicos} - \sum \text{grupos lipofílicos}) \quad (\text{Equação 1})$$

O valor numérico do EHL indica a solubilidade do tensoativo em qualquer fase óleo e/ou água, podendo ser usado para prever o tipo de emulsão que poderia ser formada. A Tabela 2 apresenta a classificação e aplicação do tensoativo, conforme seu valor de EHL.

Tabela 2 – Classificação e características dos tensoativos de acordo com o EHL (adaptada de DAVIS, 1994; JENSEN, 2007).

Valor de EHL	Caráter dos tensoativos	Características dos tensoativos	Tipo de emulsão formada
3-6	Hidrofóbicos	Dissolvem em óleo e formam micelas reversas.	A/O
8-18	Hidrofílicos	Dissolvem e formam micelas em água.	O/A
6-8	Não apresentam afinidade pela água ou pelo óleo.	Formam emulsões instáveis. Coalescência do sistema. Baixa tensão superficial.	Não há formação de emulsão.
< 3 e EHL >18	Não são ativos de superfície.	Acumulam-se tanto na fase aquosa, quanto na fase oleosa.	Não há formação de emulsão.

A maior desvantagem do conceito de EHL é que este não leva em consideração as propriedades funcionais da molécula de tensoativo, quando estas são alteradas mediante mudanças de temperatura ou condições da solução (DAVIS, 1994; JENSEN, 2007).

Para o preparo de NP os tensoativos mais utilizados são os de alta hidrofília não iônicos como os polisorbatos (Tween[®]) e, de acordo com o método empregado para obtenção da NP, também são utilizados tensoativos de baixa hidrofília não iônicos como os ésteres de sorbitana (Span[®]) (BOUCHEMAL et al., 2004; MORAES, 2009). As Figuras 17 e 18 exibem as estruturas do Tween 80[®] e Span 60[®], respectivamente.

Figura 17 – Fórmula estrutural do polisorbato 80, Tween 80[®] (COSTA NETO, 2009).

Figura 18 – Fórmula estrutural do monoestearato de sorbitana, Span 60[®] (adaptada de COSTA NETO, 2009).

2.7 MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

Na literatura são relatados diversos métodos para a preparação de nanopartículas poliméricas. Dependendo das características físico-químicas do ativo é possível escolher método e polímero adequados para obter uma boa eficiência de encapsulação (REIS et al., 2006). Estes métodos podem ser divididos em duas categorias principais: métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formados (SOPPIMATH et al., 2001; REIS et al., 2006; MORAES, 2009).

Os métodos de polimerização *in situ* envolvem a formação do polímero no momento da preparação das NP e podem ser divididos em polimerização em emulsão ou polimerização interfacial.

As Figuras 19 e 20 apresentam, esquematicamente, as principais etapas dos métodos de polimerização em emulsão e polimerização interfacial, respectivamente.

a) Polimerização em emulsão

Figura 19 – Método de polimerização em emulsão (adaptado de GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

b) Polimerização interfacial

Figura 20 – Método de polimerização interfacial (adaptado de GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

As limitações destes métodos são a exigência de solventes orgânicos tóxicos e a dificuldade de purificação, acarretando a presença de moléculas residuais tóxicas (monômeros) decorrentes da polimerização incompleta (REIS et al., 2006).

Devido a estas limitações dos métodos de polimerização *in situ*, foi proposto o uso de polímeros pré-formados para o preparo de NP, sendo este o mais empregado atualmente (REIS et al., 2006; MORAES, 2009).

Os métodos referentes à precipitação de polímeros pré-formados mais utilizados são: nanoprecipitação, deposição interfacial de polímero pré-formado, emulsificação/difusão do solvente, emulsificação/evaporação do solvente, dupla emulsificação e *salting-out* (SCHAFFAZICK et al., 2003; REIS et al., 2006; MORAES, 2009).

As formulações do presente trabalho foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, descrito por Fessi et al. (1989), por ser de fácil execução, rápido e transponível para a escala industrial (MORAES, 2009). Além disso, não exige homogeneização de alta energia (sonificação, homogeneização a alta pressão ou homogeneização a alta velocidade), quando comparado aos métodos de emulsificação/difusão e emulsificação/evaporação do solvente (REIS et al., 2006; BUDHIAN; SIEGEL; WINEY, 2007; MORAES, 2009).

A Figura 21 apresenta, de maneira simplificada, as principais etapas do método empregado.

Figura 21 – Método de deposição interfacial do polímero pré-formado (adaptado de GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

O método de deposição interfacial do polímero pré-formado é uma adaptação do método de nanoprecipitação (FESSI; PUISIEUX; DEVISSAGUET, 1988), sendo estes similares, pois baseiam-se na emulsificação espontânea da fase orgânica interna contendo o polímero na fase aquosa externa. Entretanto, a nanoprecipitação produz apenas nanoesferas, enquanto que a deposição interfacial forma nanocápsulas ou nanoesferas.

A nanoprecipitação envolve a precipitação de um polímero pré-formado, a partir de uma solução orgânica com a difusão do solvente orgânico no meio aquoso na presença ou ausência de um surfatante (FESSI; PUISIEUX; DEVISSAGUET, 1988). Já a deposição interfacial não é uma técnica de polimerização, mas de emulsificação/solidificação. Neste procedimento, além de polímero, ativo e solvente, são introduzidos à fase orgânica, um óleo natural (miscível com o solvente, porém imiscível com a mistura) e um tensoativo de baixa hidrofília (FESSI et al., 1989).

Na deposição interfacial do polímero pré-formado ocorre a formação e precipitação de partículas coloidais. Estas partículas, constituídas por uma fase oleosa na qual o ativo encontra-se disperso, são revestidas por uma camada polimérica em um ambiente externo aquoso. A técnica, em si, consiste na lenta adição da fase orgânica composta por: solvente miscível com água, óleo, tensoativo hidrofóbico, polímero insolúvel no óleo e na água e ativo lipofílico sobre a fase aquosa contendo tensoativos hidrofílicos. Após a mistura de ambas as fases, o polímero deposita-se na interface pela redução da sua solubilidade na mistura de solventes. A difusão mútua dos solventes fornece uma energia favorável para a formação de nanogotas de óleo, as quais atuam como núcleo para a precipitação do polímero e meio disperso para o ativo. Imediatamente, ocorre o surgimento de uma suspensão leitosa, com elevada opalescência, devido à formação espontânea das nanocápsulas. Em seguida, o solvente é removido sob pressão reduzida e a suspensão concentrada através da evaporação de água (FESSI et al., 1989).

Dependendo das características físico-químicas do ativo é possível escolher o método de preparo que levará a uma associação eficiente e estabilidade satisfatória. O método escolhido deve minimizar a perda da molécula ativa e garantir sua atividade específica. Além disso, as propriedades físico-químicas, como diâmetro de partículas, evolução do pH, por exemplo, devem ser sempre investigadas para acompanhamento da estabilidade das NP (MORAES, 2009).

2.8 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS

As técnicas comumente empregadas para a caracterização de nanopartículas incluem: cromatografia por exclusão de tamanho (SEC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ultrafiltração/centrifugação e ultracentrifugação, espalhamento de luz (LS), mobilidade por eletroforese, potenciometria, difração de raios X (DRX), calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia de força atômica (AFM) e microscopias eletrônicas de transmissão (MET) e varredura (MEV) (SCHAFFAZICK et al., 2003; POHLMANN et al., 2007; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007).

2.8.1 Avaliação morfológica

As microscopias eletrônicas de varredura, MEV, (JEON et al., 2000; HORISAWA et al., 2002) ou de transmissão, MET, (YOO et al., 1999; JEON et al., 2000) são comumente empregadas na avaliação morfológica de NP para obtenção de informações referentes à forma e tamanho das mesmas (SCHAFFAZICK et al., 2003). A MET, por exemplo, pode fornecer a distinção entre NC e NE e possibilitar a determinação da espessura da parede polimérica, no caso das NC (MOSQUEIRA et al., 2000).

Outra técnica também empregada para caracterizar a morfologia de superfície das nanopartículas é a microscopia de força atômica (FENG; HUANG, 2001; MU; FENG, 2002), a qual fornece informações com alta resolução em três dimensões, em escala nanométrica, sendo capaz ainda de resolver detalhes de superfície em nível atômico (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Considerando os diferentes métodos de obtenção, as nanopartículas, de uma forma geral, apresentam uma distribuição unimodal com baixo índice de polidispersão após o seu preparo. Os métodos usualmente empregados para a determinação da distribuição de tamanho das NP consistem nas técnicas de espectroscopia de correlação de fótons, MEV ou MET, além da técnica de espalhamento de luz (SCHAFFAZICK et al., 2003).

De acordo com a formulação empregada, algumas diferenças com relação ao tamanho das partículas podem ser verificadas, conforme o método utilizado na sua determinação. Por exemplo, a microscopia eletrônica fornece uma imagem da partícula isolada do meio, enquanto a espectroscopia de correlação de fótons possibilita a determinação do raio hidrodinâmico (R_h) das partículas em suspensão (HOFFMANN et al., 1997). No espalhamento de luz (LS) diversas propriedades podem ser medidas, tais como, massa molar ponderal média ($\overline{Mw}$), raio hidrodinâmico, etc. Diâmetro médio de partículas, assim como sua distribuição e índice de polidispersão são as medidas mais importantes obtidas pela técnica de LS para a caracterização das NP.

É importante ressaltar que a tendência à agregação e sedimentação das nanopartículas dispersas, em função do tempo, pode ser monitorada pela determinação das mudanças na distribuição de tamanho de partículas, utilizando-se as técnicas citadas acima (SCHAFFAZICK et al., 2003).

2.8.2 Massa molar e distribuição de massa molar do polímero

A determinação da distribuição de massa molar do polímero, após o preparo das nanopartículas, pode fornecer as seguintes informações: influência de componentes da formulação sobre o processo de polimerização, ocorrência de reações químicas entre o ativo e o polímero e, degradação do polímero, em função do tempo (SCHAFFAZICK et al., 2003).

A técnica geralmente utilizada para determinação da distribuição de massa molar do polímero é a cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) (GUTERRES et al., 1995; SOMA et al., 2000). Outra técnica também utilizada é o espalhamento de luz estático (LSE), mediante a análise da intensidade de luz espalhada pelas partículas, porém o mesmo só determina $\overline{M}_w$ (SCHAFFAZICK et al., 2003).

2.8.3 Potencial zeta

A determinação do potencial zeta reflete o potencial da superfície das partículas, sendo este influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, devido a dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. Este parâmetro é determinado por meio de técnicas de eletroforese.

O potencial zeta também pode ajudar na elucidação do mecanismo de associação do ativo às nanopartículas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

2.8.4 pH das suspensões

A estabilidade das suspensões de nanopartículas pode ser determinada pelo monitoramento do pH em função do tempo (SCHAFFAZICK et al., 2003). Por exemplo, a alteração do pH pode ser um indício da degradação do polímero.

2.8.5 Determinação da taxa de associação e da forma de associação do ativo

A determinação da quantidade de ativo associado às nanopartículas é feita mediante a técnica de HPLC. Porém, além de ser uma metodologia onerosa, os processos de

separação são muito complexos devido ao tamanho reduzido das nanopartículas, o qual dificulta a separação da fração do ativo livre da fração associada (SOPPIMATH et al., 2001).

A técnica de separação mais comumente utilizada é a ultracentrifugação (SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000). Nesta técnica, a quantidade de ativo livre contida na suspensão é determinada no sobrenadante, após a centrifugação. Já a concentração total de ativo é, geralmente, determinada pela completa dissolução das nanopartículas em um solvente adequado. A diferença entre as concentrações de ativo livre e associado é a concentração do ativo associado às nanopartículas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Outra técnica também empregada é a ultrafiltração-centrifugação (SCHAFFAZICK et al., 2002), na qual uma membrana (10 kDa) é utilizada para separar parte da fase aquosa dispersante da suspensão coloidal. A concentração livre do ativo é determinada no ultrafiltrado e a fração de ativo associada às nanoestruturas é calculada também pela subtração das concentrações total e livre (SCHAFFAZICK et al., 2003).

2.8.6 Outras técnicas

A técnica de DSC, uma metodologia termo-analítica, é de grande utilidade para a determinação das mudanças nos estados de transição de materiais poliméricos. Em formulações de micro e nanopartículas pode ser empregada para investigar as interações entre a matriz polimérica e o ativo; a morfologia de um polímero cristalino; o estado de dispersão sólida ou molecular do ativo associado; reações de polimerização, depolimerização e degradação; e potenciais incompatibilidades físicas ou químicas entre o ativo e os outros componentes (SCHAFFAZICK et al., 2003).

A difração de raios X também pode ser empregada em nanopartículas, para caracterizar o estado físico do ativo associado às mesmas. Isto é, se este ativo está ou não disperso molecularmente à matriz polimérica.

Já a espectroscopia no infravermelho verifica a presença ou ausência de reações químicas entre o ativo e polímero.

2.9 NANOCARREADORES E A PELE

Os sistemas nanoestruturados, tais como nanopartículas poliméricas, lipossomas e nanopartículas lipídicas sólidas são propostos como carreadores para a liberação modificada de fármacos e moléculas ativas, com o intuito de alterar e controlar seus perfis de liberação e permeação (POHLMANN et al., 2008). Estes sistemas exibem características vantajosas, tornando-os promissores veículos para aplicação cosmética. Dentre estas características destaca-se a potencial ação como bloqueadores das radiações UV, atuando como filtros físicos e podendo ser combinados a filtros químicos melhorando a fotoproteção (WISSING; MULLER, 2003; PAESE, 2008). Estes sistemas carreadores apresentam um tamanho reduzido, o qual possibilita um maior contato das moléculas ativas com o estrato córneo, além de facilitar sua formulação em produtos dermatológicos e propiciar confortável aplicação cutânea (ALVES et al., 2007; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; PAESE, 2008).

Devido às suas características promissoras, nanopartículas são propostas como veículos tópicos, principalmente para fotoprotetores, com a intenção de prolongar o tempo de resistência dos filtros no estrato córneo, assim como evitar o processo de fotodegradação mantendo sua estabilidade (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004; JIMÉNEZ et al., 2004; PAESE, 2008).

Alvarez-Román et al. (2001), prepararam nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) contendo o filtro solar *p*-metoxicinamato de octila (MCO), pelo método de deslocamento do solvente. Neste estudo, foi avaliado o perfil de liberação *in vitro* das nanocápsulas de MCO incorporadas a um gel em contato com pele de porco, assim como a capacidade destas cápsulas em proteger a pele contra a radiação UVB. Por esta técnica, foram obtidas nanocápsulas com uma faixa de tamanho entre 255-427 nm. Os perfis de liberação da formulação contendo MCO encapsulado e MCO livre foram similares e, em ambos os casos, os perfis foram moderados. Este fenômeno pode ser explicado pela alta hidrofobicidade e cristalinidade do polímero (PCL) e pela alta lipofilicidade do filtro solar, a qual contribui para a diminuição de sua difusão para o meio receptor. Devido a esta baixa difusão, o ativo (MCO) encontra-se encapsulado e não apenas adsorvido na superfície externa das nanocápsulas. Com relação à eficiência de proteção contra o eritema provocado por radiação UVB, os autores observaram que a formulação contendo nanocápsulas de MCO exibiu uma eficácia de proteção muito maior quando comparada ao gel contendo o ativo livre. Este aumento indica que o ativo aderiu à pele formando um

filme protetor. Com estes resultados, foi possível confirmar que as nanopartículas podem ser utilizadas como inibidoras de um eritema causado por radiação UV.

Diferentes propriedades físico-químicas e funcionais podem ser obtidas em nanopartículas poliméricas, de acordo com a natureza química do polímero empregado (GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007). Neste contexto, Luppi et al. (2003), estudaram a permeação de nanoesferas de álcool polivinílico (PVA), ligado a diferentes ácidos graxos com dois graus de substituição (40 e 80 %), contendo benzofenona-3 (BZ-3). O objetivo do estudo foi criar uma formulação que limitasse a permeação do ativo através da pele até a circulação sistêmica. Os autores concluíram que a natureza dos substituintes e o grau de substituição influenciaram no tamanho de partículas (312 a 440 nm) e na habilidade de interação da BZ-3 com a pele. Observaram também que as nanoesferas contendo BZ-3 produzidas com PVA substituído com ácidos graxos limitaram a absorção percutânea; isto é, quanto menor o grau de substituição, melhor a localização do ativo na epiderme. Entretanto, as nanoesferas contendo PVA com alto grau de substituição impediram a absorção da BZ-3.

Em outro estudo, Alvarez-Román et al. (2004), investigaram como a encapsulação de um filtro solar altamente lipofílico (MCO) em nanopartículas poliméricas de poli(ϵ -caprolactona) é capaz de melhorar a liberação tópica na pele. Neste trabalho foi avaliada a penetração do filtro solar no estrato córneo de pele suína através de “*tape stripping in vitro*”. Os autores concluíram que a quantidade de MCO retida no estrato córneo foi 3,4 vezes maior quando associado à nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) ao invés de sua forma livre.

A absorção percutânea *in vitro*, em pele de porco, de nanocápsulas de PCL contendo MCO também foi avaliada por Jiménez et al. (2004). Primeiramente foi feita uma comparação entre emulsões óleo/água (O/A) e água/óleo (A/O) contendo o ativo encapsulado e livre, a fim de verificar a penetração do filtro solar na pele. De acordo com os autores, as formulações contendo MCO nanoencapsulado exibiram menor penetração no estrato córneo, em relação às mesmas emulsões contendo o filtro solar livre; e que a formação de um filme protetor sobre a superfície da pele contribui para esta penetração diferenciada. Ou seja, a inclusão de MCO nanoencapsulado às formulações de protetores solares reduziu o acúmulo de MCO na pele.

Já Olvera-Martínez et al. (2005), optaram avaliar o método de preparação de nanocápsulas/nanoemulsões e sua penetração cutânea, utilizando como matriz polimérica o ftalato de acetato de celulose (FAC) e MCO como filtro solar. Adotando-se a técnica de

emulsificação-difusão do solvente foram obtidas nanocápsulas com diâmetros entre 400 e 615 nm e nanoemulsões com 160 nm. Após a caracterização dos sistemas nanoestruturados e a avaliação da penetração cutânea do filtro solar na pele de porco, a quantidade de ativo retido no estrato córneo também foi determinada. A incorporação do MCO às nanoemulsões aumentou a penetração cutânea, em relação ao ativo incorporado às nanocápsulas ou emulsão convencional. Com isso, os autores puderam concluir que a profundidade da penetração do MCO está diretamente ligada ao tamanho coloidal das partículas e também à sua flexibilidade.

Por outro lado, Weiss-Angeli (2007), propôs avaliar o local de liberação do filtro solar MCO a partir de nanocápsulas de PCL incorporadas em um gel hidrofílico de hidroxietilcelulose, assim como sua penetração cutânea. O principal objetivo foi desenvolver uma nova técnica para extrair o ativo retido na pele nos ensaios de penetração cutânea. Neste estudo foram empregadas duas rotas. Na primeira rota o ativo foi extraído das diferentes camadas da pele com um solvente comumente utilizado para extrações (acetonitrila), e que também solubilizasse o polímero para posterior quantificação do ativo livre e encapsulado. Ao contrário da primeira, a segunda rota empregou como solvente para extração um não solvente do polímero (miristato de isopropila), porém solvente do filtro solar livre para que, por meio do processo de ultracentrifugação, as nanocápsulas presentes no sistema pudessem ser separadas e o ativo livre quantificado. Segundo o autor, não houve diferença entre as quantidades de ativo dosadas nas duas rotas. Contudo, foi observado que a incorporação do filtro solar em nanocápsulas reduziu drasticamente a quantidade do mesmo nas camadas da pele, isto é, sua profundidade de penetração, quando comparada às formulações de hidrogel contendo o ativo livre. Este fato deve-se ao tamanho das nanocápsulas (263,5 nm) e a hidrofobicidade do polímero, fatores os quais contribuem para o acúmulo de nanocápsulas na superfície da pele.

Outro estudo na área de filtros solares foi proposto por Paese (2008), com o objetivo de avaliar a permeação cutânea in vitro da BZ-3 a partir de nanocápsulas de PCL em diferentes formulações semi-sólidas. Neste trabalho, a BZ-3 foi incorporada em formulações de hidrogel, creme-gel e de emulsão água em silicone. Após caracterização das formulações, a permeação cutânea deste filtro solar foi avaliada. As formulações contendo BZ-3 encapsulada apresentaram maior quantidade e tempo de resistência no estrato córneo, quando comparadas às formulações contendo o ativo livre. Também foi avaliada a fotoestabilidade do filtro solar encapsulado e livre mediante radiação UVA, a qual demonstrou que a nanoencapsulação aumentou a fotoestabilidade da BZ-3. Outro

fator importante avaliado foi o caráter alergênico deste filtro químico, sendo que em nenhuma das formulações preparadas foi observada qualquer sensibilização cutânea. Com isso, o autor concluiu que estas formulações são promissoras para aplicação cutânea de filtros solares.

Uma vez que a maioria das formulações nanoestruturadas apresenta potencial de superfície negativo, uma alternativa tem sido revesti-las com materiais que invertam este potencial, fornecendo um potencial de superfície positivo às nanopartículas a fim de melhorar a interação dos nanocarreadores com as superfícies biológicas, as quais apresentam um potencial negativo, como é o caso da pele (POHLMANN et al., 2008).

Com o intuito de aumentar o tempo de residência do filtro solar na pele, Siqueira (2008) preparou nanocápsulas de PCL contendo BZ-3 revestidas com quitosana. Neste trabalho, foi avaliada tanto a influência da carga de superfície positiva sobre as características físico-químicas das nanopartículas quanto à penetração cutânea *in vitro* da BZ-3 a partir das nanocápsulas incorporadas a hidrogéis. O teor de encapsulação foi de aproximadamente 100% em todas as formulações, após a preparação e decorridos 30 dias. A partir dos testes de penetração cutânea, o autor concluiu que as nanocápsulas contendo BZ-3 revestidas com quitosana foram eficazes em prolongar o tempo de permanência do filtro solar nas camadas mais superficiais da pele. Os resultados evidenciam que estas nanopartículas contendo BZ-3 revestidas com quitosana são sistemas promissores para aplicação cutânea do filtro solar estudado.

No decorrer dos últimos anos, devido à maior incidência dos raios UV, novas formulações de filtros solares são constantemente desenvolvidas para aumentar o fator de proteção solar e a segurança, além de superar as necessidades do consumidor. O filtro solar, por sua vez, deve permanecer retido na superfície da pele (estrato córneo) para ser efetivo, deve formar um filme sobre a pele (estrato córneo) e permear o mínimo possível para a circulação sistêmica (MILESI; GUTERRES, 2002). Já sua eficácia está diretamente relacionada ao fator de proteção solar (FPS), o qual indica quantas vezes o tempo de exposição ao sol, sem o risco de eritema, pode ser aumentado com o uso do protetor (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007).

Mediante este panorama, Monteiro (2008) avaliou a eficácia e a segurança de quatro nanocosméticos desenvolvidos sob a forma de creme-gel, contendo o filtro solar MCO (8 % livre) e incluso nos diferentes sistemas nanoestruturados, β -ciclodextrina e lipossoma. Nesta pesquisa, foram desenvolvidas quatro formulações diferentes: creme-gel contendo MCO livre; β -ciclodextrina/MCO; lipossoma/MCO e β -ciclodextrina/MCO

juntamente com lipossoma/MCO. A eficácia das formulações foi avaliada através de testes de FPS *in vivo* a seco e após a imersão em água. Os testes de liberação, penetração e/ou permeação *in vitro*, empregando membrana sintética (acetato de celulose) e membrana natural (pele suína) verificaram a segurança destes nanocosméticos. Com estes resultados, o autor concluiu que o sistema nanoestruturado lipossoma/MCO é o mais vantajoso, pois é capaz de aumentar a quantidade de ativo na epiderme e aumentar o FPS da formulação.

Assim como Paese, Roggia (2009) realizou um estudo para avaliar a liberação e permeação cutânea *in vitro* da BZ-3 em nanopartículas poliméricas, incorporadas em diferentes formulações semi-sólidas. Além dos ensaios de liberação e permeação, as nanopartículas foram caracterizadas em relação a sua estabilidade físico-química, características organolépticas, avaliações reológicas e determinação do prazo de validade. Foi observado que a concentração de BZ-3 em todas as formulações semi-sólidas diminuiu no decorrer dos experimentos, tanto para o ativo incorporado na forma livre, como na forma encapsulada. As características organolépticas e pH mantiveram-se os mesmos no decorrer dos experimentos. Já as formulações contendo BZ-3 nanoencapsulada apresentaram um prazo de validade maior, quando comparadas às formulações contendo o ativo livre. Para os ensaios de liberação e permeação cutânea *in vitro* foram utilizadas, respectivamente, membrana de acetato de celulose e pele abdominal humana. Nestes ensaios o autor verificou que o fluxo de liberação do ativo foi maior para as formulações de hidrogel, comparadas às formulações de creme-gel e nanoencapsulada; porém a permeação cutânea da BZ-3 foi maior para as formulações de nanopartículas, resultando em uma maior concentração deste ativo no estrato córneo. Comparando-se os resultados com os apresentados por Paese (2008), o autor concluiu que a permeação cutânea em pele abdominal humana foi similar à permeação em pele de porco podendo ser intercambiáveis, apesar da pele de porco apresentar uma maior permeabilidade.

Costa Neto (2009) também desenvolveu sistemas micro e nanoestruturados na área de filtros solares. Neste trabalho foram preparadas micro e nanopartículas de quitosana reticulada por 4,4'-difênol metano diisocianato (MDI) pela técnica de policondensação interfacial combinada com emulsificação espontânea para encapsulação da BZ-3. As cápsulas formadas foram menores que 2 μm e maiores 900 nm com uma larga polidispersidade e uma elevada eficiência de encapsulação (superior a 99 %). Foi observado também que a técnica de policondensação interfacial combinada com emulsificação espontânea foi eficiente na formação das cápsulas de quitosana/MDI e que a concentração de MDI influenciou no diâmetro de partículas das cápsulas de quitosana. O

autor concluiu que as formulações de micro e nanopartículas contendo BZ-3 são sistemas promissores para aplicação em filtros solares.

O emprego de nanocápsulas é relatado para a proteção de diferentes sistemas aplicados às linhas cosméticas e/ou farmacêuticas, principalmente para ativos que degradam em temperaturas superiores a 40 °C ou que são sensíveis à oxidação em presença de água, por variação de pH ou ainda pela ação da radiação ultravioleta (MULLER et al., 2004; KÜLKAMP et al., 2009).

Considerando o campo farmacêutico, porém relacionado à aplicação cutânea, Lboutounne et al. (2002) avaliaram o tempo de contato do antisséptico clorexidina com a pele. Nanocápsulas de poli(ε-caprolactona) foram preparadas pelo método de deposição interfacial, as quais proporcionaram uma liberação contínua do antisséptico por pelo menos 8 horas com uma alta taxa de encapsulação. Os autores observaram que a concentração residual de clorexidina no estrato córneo foi três vezes maior utilizando a suspensão de nanocápsulas comparada à formulação contendo o ativo livre. Com isso, concluíram que foi possível obter uma atividade antimicrobiana tópica prolongada contra *Staphylococcus epidermidis*.

Alves et al. (2007) estudaram a penetração cutânea do anti-inflamatório nimesulida incorporado em diferentes sistemas coloidais: nanoesferas, nanocápsulas e nanoemulsões. Estes sistemas coloidais, incorporados a hidrogéis, foram preparados com o intuito de verificar a influência da composição e do tipo de carreador na penetração cutânea. Os carreadores contendo poli(ε-caprolactona), neste caso, nanocápsulas e nanoesferas apresentaram uma maior retenção do anti-inflamatório no estrato córneo. Já para o carreador que não continha o polímero, nanoemulsão, o ativo foi encontrado somente na derme. Foi observado também que a concentração de nimesulida foi maior nas camadas mais profundas da pele para as nanocápsulas, quando comparadas às formulações de nanoesferas e nanoemulsões. Os autores concluíram que a presença do polímero e o tipo de nanocarreador influenciaram a penetração do anti-inflamatório na pele.

Já na área cosmética, Kulkamp et al. (2009) desenvolveram um trabalho que consiste na preparação de nanocápsulas poliméricas de ácido lipoico para aplicação cutânea. Este ativo atua como um agente terapêutico para diversos distúrbios, como isquemia cerebral e do miocárdio, intoxicação por metais pesados, diabetes, síndrome de imunodeficiência adquirida e distúrbios neurodegenerativos, como mal de Alzheimer e demências relacionadas (HOLMQUIST et al., 2007). Além de todas estas aplicações, o ácido lipoico tem sido proposto como antioxidante para uso dermatológico e cosmético na

prevenção do envelhecimento precoce da pele (RONA; VAILATI; BERARDESCA, 2004). O objetivo dos autores foi desenvolver nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) contendo ácido lipoico para aumentar a estabilidade deste ativo frente à oxidação. A estabilidade físico-química das nanocápsulas foi verificada por meio de análises de pH, diâmetro de partículas e polidispersidade, potencial zeta e taxa de associação do ativo. O acompanhamento da estabilidade demonstrou que as nanocápsulas exercem um efeito protetor sobre o ácido lipoico, aumentando assim sua estabilidade físico-química em comparação às formulações contendo o ativo livre. Com isso, os autores concluíram que as nanocápsulas poliméricas de ácido lipoico desenvolvidas podem ser empregadas na criação de formas farmacêuticas semi-sólidas para veiculação do ácido lipoico.

Outro trabalho com âmbito cosmético foi elaborado por Barrios (2010), o qual preparou nanocápsulas poliméricas de adapaleno. O adapaleno é um retinóide tópico aprovado para o tratamento da acne desde a introdução da tretinoína em 1972 (MILLIKAN, 2001; ROSSO, 2002). Dentre os diversos fármacos utilizados para o tratamento da acne, o adapaleno destaca-se por não causar efeitos adversos à pele, seja na sua forma livre ou encapsulada.

Neste estudo, a proposta do autor foi preparar nanocápsulas poliméricas de adapaleno através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado utilizando diferentes núcleos oleosos (Miglyol[®] e óleo de melaleuca). A estabilidade físico-química das suspensões foi caracterizada de acordo com medidas de pH, diâmetro de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e taxa de associação do fármaco. Além dos ensaios de liberação *in vitro*, as nanocápsulas foram avaliadas em diferentes condições de temperatura e luz UVA. As nanocápsulas de adapaleno com óleo de mameluca apresentaram pH ácido, diâmetro de partícula inferior a 300 nm e potencial zeta negativo. A taxa de associação do adapaleno nas nanocápsulas com óleo de malaleuca foi de 95,4 % enquanto nas cápsulas preparadas com Miglyol[®] foi de 84,1 %. Nos testes com radiação UVA a nanoencapsulação com óleo de melaleuca aumentou a estabilidade do ativo, protegendo-o contra degradação. Com estes resultados, o autor concluiu que a suspensão contendo nanocápsulas de adapaleno preparadas com óleo de malaleuca apresentou melhores características físico-químicas e de estabilidade, representando melhor viabilidade tecnológica para a área farmacêutica.

Além dos sistemas nanoestruturados, outras estratégias foram propostas para diminuir a absorção percutânea dos filtros solares químicos, como: o emprego de diferentes tipos de veículos, o aumento da viscosidade das formulações ou a complexação

com ciclodextrinas. As ciclodextrinas (CDs) podem ser definidas como oligossacarídeos cíclicos compostas de uma superfície externa hidrofílica e um núcleo não polar, o qual pode acomodar componentes hidrofóbicos formando complexos de inclusão não covalentes. A liberação de substâncias para aplicação tópica, presentes na cavidade das CDs, pode ser modificada aumentando ou diminuindo sua absorção percutânea.

Neste contexto, Biloti et al. (1999) testaram o comportamento do Parsol 1789[®] complexado com β -ciclodextrinas (β -CD). Os autores observaram que o processo de fotodegradação do Parsol[®] complexado foi similar a sua fotodegradação sob a forma livre. Contudo, o aumento significativo da concentração dos produtos inclusos (após 2000 minutos) indica que os mesmos mantiveram-se totalmente encapsulados por β -CD devido às suas pequenas dimensões. Como o ativo é uma substância alergênica, a inclusão deste ativo em β -CD pode evitar o contato com a pele, minimizando possíveis reações tóxicas.

Assim como Biloti et al. (1999), Citeresi (2001) realizou alguns ensaios com diferentes filtros solares complexados com β -CD. Neste estudo o autor pode concluir que os filtros solares que foram encapsulados molecularmente com β -CD apresentaram uma fotoestabilidade superior do que estes mesmo filtros em sua forma livre ou associada à fosfolipídeos, os quais parecem aumentar a fotodegradação. Este estudo não foi realizado para uma formulação cosmética específica, mas sim para as substâncias ativas isoladas (*p*-metoxicinamato de octila, butilmetóxi-dibenzoilmetano e benzofenona-3) sob as formas complexada ou livre, avaliando somente a degradação destes ativos, sem considerar o FPS. Foi observado também que o aumento da estabilidade pela encapsulação está relacionado à inclusão do filtro solar na cavidade (núcleo) da CD. Outra possibilidade seria o fato de a β -CD apresentar uma ação redutora da radiação UV.

Da mesma maneira, Simeoni et al. (2006) verificaram a influência da complexação da BZ-3 com hidropopil- α -ciclodextrina (HP- α -CD) e sulfobutiléter- β -ciclodextrina (SBE- β -CD) na penetração cutânea. O perfil de penetração não foi alterado com a complexação da BZ-3 em HP- α -CD; contudo a complexação com SBE- β -CD diminuiu significativamente a penetração cutânea, reduzindo o contato do filtro químico com a pele e os seus riscos toxicológicos. Os autores concluíram que este aspecto é muito importante em formulações comercializadas contendo BZ-3, já que as mesmas contêm elevadas concentrações do filtro químico e são aplicadas repetidas vezes em grandes extensões da pele permanecendo por um longo período de tempo.

2.10 AMIDO

2.10.1 Características e Propriedades

O amido é a principal substância de reserva nas plantas superiores, o qual fornece de 70 % a 80 % das calorias consumidas pelo homem. É uma matéria-prima renovável, biodegradável e não tóxica. Dentre as principais matérias-primas para a sua extração destacam-se as raízes e tubérculos, como a mandioca e a batata, e os cereais como o milho, o trigo e o arroz (SILVA et al., 2006).

Estruturalmente, pode ser definido como um polissacarídeo composto basicamente por cadeias de amilose e amilopectina. A amilose é formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4, originando uma cadeia linear, a qual é insolúvel em água. Já a amilopectina também é formada por unidades de glicose, porém unidas em ligações α -1,4 e α -1,6, formando uma estrutura ramificada (DENARDIN; SILVA, 2009). A maioria dos amidos contém 20-30 % de amilose e 70-80 % de amilopectina, variando conforme a fonte botânica (mandioca, arroz, milho, etc.).

As Figuras 22 e 23 apresentam as estruturas da amilose e da amilopectina, respectivamente.

Figura 22 – Fórmula estrutural da amilose (adaptada de CEREDA, 2002).

Figura 23 – Fórmula estrutural da amilopectina (adaptada de CEREDA, 2002).

As propriedades do amido são muito estudadas e diversos estudos estão direcionados às suas propriedades intrínsecas oriundas de diferentes fontes botânicas, ao seu processamento (indústria alimentícia) e a ampliação de novas aplicações no mercado.

De acordo com Cereda (2002), as propriedades dos amidos podem ser divididas em químicas, físicas e funcionais. A Tabela 3 apresenta estas propriedades.

Tabela 3 – Propriedade químicas, físicas e funcionais do amido (CEREDA, 2002).

Químicas	Físicas	Funcionais
Composição bioquímica	Estrutura	Tratamentos hidro-térmicos
Amilose	Cristalinidade	Solubilidade
Amilopectina	Aparência	Gelatinização
Outros	Condutividade térmica e elétrica; Atividade óptica.	Retrogradação e hidrólise

O estabelecimento das propriedades do amido é feito em laboratório, a partir de condições padronizadas e equipamentos específicos. As propriedades apresentadas são aferidas isoladamente e, quando utilizadas para avaliar o amido em processamento ou na aplicação final, todo o conjunto deve ser considerado, pois nas condições de processo e aplicação, as propriedades são solicitadas de forma simultânea (CEREDA, 2002).

A complexação é uma transição hidro-térmica reversível que consiste na formação de complexos da amilose com substâncias apolares, como ácidos graxos, iodo, lipídios e outros.

O estado de gel, por sua vez, apresenta uma separação de fases, na qual a fase contínua é polimérica e a fase dispersa solvente.

E a geleificação é o ponto no qual ocorre a separação de fases, mudança nas propriedades funcionais e aumento da susceptibilidade ao fenômeno da retrogradação (CEREDA, 2002).

2.10.2 Hidrólise do amido

Quando o amido é tratado por ácidos minerais ou enzimas específicas, o resultado é um fracionamento do polímero, originando moléculas menores (CEREDA, 2002). Este processo é denominado hidrólise e pode ser classificada como química ou enzimática.

A via química é bastante utilizada devido ao seu baixo investimento. Nesta rota, vários compostos induzem a hidrólise do amido, sejam eles sozinhos ou com o auxílio de catalisadores. O tratamento mais utilizado emprega ácidos minerais, por exemplo, ácido clorídrico (HCl) concentrados ou diluídos. O processo de hidrólise baseia-se no desdobramento total das moléculas de amilose ou amilopectina que ao se romperem, transformam-se em dextrinas cada vez mais simples e finalmente em glicose. Quanto maior o poder ionizante do ácido, mais rápida será a hidrólise (CEREDA, 2002).

Já na via enzimática empregam-se, especificamente para o amido, as chamadas enzimas amilolíticas (α -amilase, β -amilase, amiloglicosidase e pululanase). As enzimas, por definição, são compostos de origem proteica, as quais atuam como catalisadores biológicos em todas as reações metabólicas energeticamente possíveis e aceleram essas reações por ativação específica. As enzimas permitem também alcançar o estado de equilíbrio da reação, por diminuir a energia de ativação e aumentar assim a velocidade. Além disso, não sofrem modificação durante a reação e ao final de cada ciclo voltam a apresentar a mesma atividade (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995). Os produtos obtidos pela hidrólise enzimática vão de glicose a dextrinas de alta massa molecular (CEREDA, 2002).

2.10.3 Amidos modificados

Amidos naturais são utilizados principalmente para o preparo de alimentos e na indústria de papel e cartonagem. As indústrias farmacêutica, química e cosmética são responsáveis por uma pequena parcela do consumo de amido.

Com o crescimento e aperfeiçoamento do mercado de amidos nos últimos anos, houve um aumento na busca de produtos com características específicas que atendam às exigências da indústria. A produção de amidos modificados é uma alternativa que vem sendo desenvolvida há algum tempo com o objetivo de superar uma ou mais limitações dos amidos nativos, e assim, aumentar a utilidade deste polímero nas aplicações industriais (SILVA et al., 2006).

A modificação dos amidos nativos é um fator importante para proporcionar propriedades funcionais de espessamento, gelificação, adesão e/ou formação de filmes (CEREDA, 2002).

Alterações nas propriedades tecnológicas dos amidos podem ser obtidas por processos físicos tais como tratamento térmico, exposição a radiações ou por processos químicos nos quais são empregados reagentes específicos para alterar a estrutura das macromoléculas componentes do amido. Há também a possibilidade de modificações enzimáticas (SILVA et al., 2006).

O amido precisa ser modificado para aumentar a sua utilidade e seu valor e a probabilidade em obter novos derivativos é muito remota (CEREDA, 2002).

As propriedades e composição diferencial dos vários amidos nativos estão claramente presentes nos seus respectivos amidos modificados, como: composição química, temperatura de pasta, transparência da pasta, tendência a retrogradação, propriedades de filmes, solubilidade, adesividade e propriedades de aplicação (CEREDA, 2002).

Os amidos modificados mais comuns são: pré-gelatinizados, pirodextrinas, ácido-modificados, catiônicos, oxidados e com ligações cruzadas e reticulados (CEREDA, 2002).

2.11 AMIDO: UM PROMISSOR AGENTE TENSOATIVO

A presença de macromoléculas em dispersões coloidais pode fornecer tanto um efeito de estabilização quanto de desestabilização. A estabilização ocorre devido ao aumento da viscosidade da fase contínua causada pela presença destas macromoléculas, mas também pode ser atribuída a adsorção das macromoléculas na superfície das partículas coloidais. Por outro lado, a desestabilização pode ocorrer se a camada superficial adsorvida é insuficiente. As macromoléculas não adsorvidas ficarão, então, nas proximidades da superfície da fase dispersa, causando a floculação (NILSSON; BERGENSTÅHL, 2006). Compostos de alta massa molecular, por exemplo, polissacarídeos podem proporcionar uma estabilização estérica em sistemas dispersos.

Um abundante polissacarídeo, que desperta o interesse como agente estabilizante, é o amido. Porém, as aplicações dos amidos nativos são limitadas devido a sua instabilidade no armazenamento. Por esta razão, foram desenvolvidas técnicas para modificá-los, aumentando assim suas propriedades e aplicações. A atividade surfatante dos amidos, por exemplo, é obtida através de modificação química, a qual introduz grupos hidrofóbicos em sua estrutura polimérica. Uma das técnicas de modificação química é o tratamento destes amidos com anidrido octenil succínico, obtendo assim os chamados amidos OSA (BHOSALE; SINGHAL, 2006). Esta modificação fornece um caráter anfifílico a molécula de amido e, conseqüentemente, propriedades ativas de superfície. Devido ao seu alto peso molecular e estrutura ramificada, o amido modificado adsorvido à interface é capaz de estabilizar emulsões e outros sistemas dispersos por impedimento estérico a baixas concentrações (TESCH; GERHARDS; SCHUBERT, 2002).

Baseado neste contexto, Tesch, Gerhards e Schubert (2002) investigaram a possibilidade de produzir emulsões bem dispersas utilizando amido OSA como estabilizante. Para a preparação das emulsões foram empregados dois amidos OSA comerciais, os quais se diferem principalmente em relação à viscosidade de suas soluções aquosas. Nos experimentos, o conteúdo da fase dispersa, a concentração de amido, assim como os valores de pH e a influência da dissolução dos sais de diferentes forças iônicas foram investigados. Também foram realizadas medidas de tensão interfacial, as quais demonstraram que os amidos OSA são substâncias ativas de superfície. Os resultados de emulsificação demonstraram a independência em relação ao tipo e concentração de amido OSA, assim como em relação aos valores de pH e do íon de valência. Com isso, os autores concluíram que o impedimento estérico é o principal mecanismo de estabilização dos

amidos OSA, comprovando que os amidos são capazes de adsorver à interface, e assim estabilizar as gotas da emulsão contra coalescência.

Já Zoldáková et al. (2005) prepararam derivados do *o*-(caboximetil) amido (CMS) solúveis em água, contendo grupos ésteres de cadeia longa pela reação com laurato de vinila, a fim de obter surfatantes poliméricos com propriedades emulsificantes e detergentes. A modificação do amido foi realizada pela esterificação com dodecanato de vinila (laurato de vinila, LV) a várias condições de reação. Os derivados foram caracterizados por espectroscopia no infravermelho, tensão superficial, eficiência de emulsificação e ação detergente. Os resultados sugeriram que a pré-ativação do CMS com DMF (N, N'-dimetilformamida) ou DMSO (dimetil sulfóxido) foi essencial para melhorar a reação de esterificação e preparar derivados CMS solúveis em água a baixas frações mássicas de VL e CMS. E que os derivados obtidos com baixo grau de esterificação caracterizaram-se como novos biosurfatantes aniônicos, exibindo habilidades emulsificantes para sistemas do tipo óleo/água (O/A), bem como propriedade detergente (poder de limpeza). Os autores verificaram que estes derivados produziram emulsões O/A com excelente estabilidade, comparável às emulsões preparadas com o emulsificante comercial Tween 20[®], enfatizando o emprego de macromoléculas como agentes ativos de superfície.

Em outro trabalho envolvendo a aplicação de macromoléculas como agentes emulsificantes, Nilsson e Bergenståhl (2006) estudaram a adsorção do amido OSA nas gotas de emulsão. O amido nativo, proveniente da cevada, foi previamente modificado com anidrido octenil succínico e diferentes amidos OSA com diferentes graus de substituição (DS) e massa molar foram obtidos. Os resultados mostraram que a adsorção foi comandada pela relação entre área interfacial e concentração de amido OSA, sendo estes resultados similares para os diferentes amidos OSA preparados. Segundo os autores, estes resultados forneceram uma razoável explanação de que moléculas maiores, como amidos OSA, podem ser eficientes emulsificantes.

Outro estudo desenvolvido por Nilsson e Bergenståhl (2007) avaliou a adsorção do amido de batata, previamente modificado com anidrido octenil succínico (OSA), nas gotas de uma emulsão O/A. O objetivo dos autores foi investigar a influência do grau de substituição (DS) para três amidos OSA diferentes na adsorção e sua interação com outros parâmetros físicos, tais como massa molar. Os resultados desta pesquisa evidenciaram que o amido OSA pode atuar como um emulsificante e fornecer uma estabilidade coloidal nas emulsões. As medidas de tensão interfacial mostraram que a pressão interfacial é mais alta

na interface óleo/água do que na interface ar/água, as quais indicam que a adsorção na interface óleo/água é comandada por interações mais fortes quando comparada a fraca solubilidade dos amidos em água. O resultado da pesquisa indicou que dois, de três amidos OSA estudados, foram eficientes emulsificantes comprovando o uso de amidos OSA como agentes ativos de superfície.

O amido é amplamente utilizado em diversos produtos devido à sua propriedade funcional e valor nutricional. Sua principal aplicação é como agente espessante, pois, após ser disperso em água quente, seus grânulos intumescem irreversivelmente e formam uma pasta viscosa (KRSTONOSIC; DOKIC; MILANOVIC, 2011).

Com o intuito de utilizar fontes renováveis, Lehmann et al. (2008) sintetizaram e caracterizaram um espessante baseado em amido, o qual pode ser aplicado a um sistema de surfatantes contendo alquil poliglicosídeos não iônicos (APG; C₁₄-C₁₈). Este novo derivado de amido foi obtido a partir da hidroxialquilação do amido de milho ceroso e, em seguida, o produto intermediário foi submetido a uma carboximetilação, dando origem ao 2-hidroxialquil carboximetil amido. Para a realização do estudo foram utilizadas formulações contendo 14 % em massa de APG e de 0,5 a 2 % em massa de 2-hidroxialquil carboximetil amido como espessante. A caracterização do amido modificado foi feita por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹³C para determinação do grau de substituição. Já as formulações contendo os novos espessantes foram caracterizadas por espalhamento estático de luz (LSE) e medidas de viscosidade. Os autores constataram que o uso de 0,5 % em massa de amido nas formulações aquosas contendo APG mostrou que a transparência aumenta com o aumento do comprimento da cadeia alquil para graus de substituição similares. Com isso, concluíram que a viscosidade e a transparência dos sistemas de surfatantes podem ser controladas pela variação da taxa de grupos funcionais hidrofóbicos e hidrofílicos dos amidos modificados.

Varona, Martín e Cocero (2009), por sua vez, testaram quatro diferentes amidos OSA, a fim de selecionar qual destes polímeros seria o mais adequado para a formulação do óleo essencial de lavandin em emulsões O/A. A distribuição do tamanho de gota, assim como a estabilidade das emulsões obtidas com cada um dos supostos surfatantes foram avaliadas. Para efeito de comparação, também foram preparadas emulsões contendo surfatantes sintéticos não iônicos (Tween 20[®] e Span 20[®]). Além disso, também foi avaliada a adsorção dos amidos OSA nas gotas de óleo de lavandin. Os resultados demonstraram que as emulsões foram estáveis podendo ser preparadas com todos os tipos de amido OSA testados neste trabalho, exibindo resultados muito similares. Já as gotas de

óleo apresentaram um tamanho na faixa de 0,5-1,4 μm e aproximadamente 80 % do óleo manteve-se estável na emulsão após 50 dias de armazenamento a 5 °C. Os autores afirmam que, para esta aplicação, os amidos OSA apresentam capacidades surfatantes similares aos surfatantes sintéticos (Tween 20[®] e Span 20[®]) empregados neste estudo. Isto é, os amidos OSA podem ser usados como efetivos agentes surfatantes para a formulação de biocidas naturais.

Já Santander-Ortega et al. (2010) preparam nanopartículas feitas a partir de derivados de amido. O objetivo deste estudo foi aplicar, em uma formulação de nanopartículas, dois diferentes derivados do propil-amido, designados como PS-1 e PS-1,45, com altos graus de substituição de 1,05 e 1,45, respectivamente. A técnica de emulsificação/difusão do solvente foi escolhida para a preparação das nanopartículas com os diferentes amidos. As propriedades de encapsulação e liberação transdérmica para três diferentes ativos (ácido flufenâmico, testosterona e cafeína) foram avaliadas. Os autores verificaram que ambos os sistemas de nanopartículas, PS-1 e PS-1,45, mostraram altas eficiências de encapsulação para as diferentes drogas empregadas. E que a liberação foi conduzida pelo caráter hidrofóbico tanto do polímero quanto da droga, exibindo uma liberação próxima ao modelo linear, nos dois sistemas, para os ativos hidrofóbicos. Finalmente, concluíram que as nanopartículas de PS-1 e PS-1,45 mostraram um efeito notável para o ácido flufenâmico, quanto à liberação transdérmica.

Como os amidos OSA são moléculas anfifílicas, sua concentração micelar crítica (CMC) é um dos parâmetros mais importantes para designar sua aplicação como emulsificante. Baseado neste contexto, Krstonosic, Dokic e Milanovic (2011) determinaram a CMC de dois diferentes amidos de milho OSA a 25 °C e verificaram a possibilidade de interações com goma xantana em solução aquosa. Soluções de amido OSA e goma xantana foram preparadas, assim como as blends destas soluções. A CMC dos amidos OSA e sua interação com a goma xantana foram determinadas por viscosimetria, condutimetria, tensão superficial e colorimetria. Os valores da CMC para os dois amidos OSA (OS1 e OS2) variaram de 0,050 a 0,088 g/100cm³ e de 0,041 a 0,081 g/100cm³, respectivamente, dependendo da técnica aplicada. E a adição de goma xantana diminuiu a viscosidade específica e aumentou a tensão superficial e os valores de CMC comparados às soluções individuais de amido OSA. Os autores concluíram que há interação entre os componentes estudados e que esta interação alterou as características da solução final, como a viscosidade e tensão superficial.

De todas as partículas sólidas insolúveis presentes em materiais alimentícios, os grânulos de amido são os mais difundidos. Contudo, os grânulos de amido nativo não são hidrofóbicos e atuam como agentes ativos de superfície e, por isso, tendem a ser maiores que os particulados utilizados como estabilizantes em emulsões de Pickering. Estas emulsões, denominadas emulsões de Pickering, são estabilizadas por partículas sólidas (sílica coloidal, por exemplo) as quais adsorvem sobre a interface óleo-água, estabilizando assim o sistema (YUSOFF; MURRAY, 2011).

Neste contexto, Yusoff e Murray (2011) prepararam emulsões óleo/água (O/A) a 20 % v/v de *n*-tetradecano contendo amidos hidrofóbicos particulados como emulsificante primário. Os objetivos dos autores neste estudo foram criar amidos hidrofóbicos particulados a partir dos grânulos de amido, assim como testar sua habilidade de estabilizar emulsões do tipo O/A, otimizando a modificação requerida para a formação de novos e melhores agentes ativos de superfície. Os amidos particulados foram preparados quimicamente a partir de ligações cruzadas entre os grânulos (que não intumescem em contato com a água) e, em seguida, foram modificados hidrofobicamente pela reação com anidrido octenil succínico. Os experimentos foram conduzidos usando três amidos comerciais modificados e um amido hidrofóbico feito em laboratório. As propriedades físicas (tamanho de partícula e atividade de superfície) e propriedade de emulsificação (microestrutura da emulsão e estabilidade) dos amidos particulados foram investigadas. Os autores observaram que as gotas de emulsão produzidas utilizando de 1-3 % em massa de amido como emulsificante foram muito grandes (de 1 a 20 μm). E que as emulsões foram estáveis contra coalescência sem qualquer mudança significativa na distribuição do tamanho das gotas por um período acima de três meses. Mais testes de tensão superficial destas dispersões de amido homogeneizadas e não homogeneizadas confirmaram a hipótese de que as emulsões O/A foram estabilizadas por amidos particulados e não por moléculas de amido.

Baseado nestes trabalhos, o objetivo desta presente dissertação é introduzir amidos modificados (catiônico e aniônico), previamente hidrolisados, como agentes tensoativos no sistema de nanopartículas poliméricas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados no presente trabalho não sofreram qualquer tipo de tratamento ou purificação prévia. Os reagentes e solventes utilizados eram de grau puramente analítico (PA). A parte experimental desta dissertação foi realizada com os seguintes reagentes e solventes:

- Acetato de cálcio, grau de pureza 99 % - Synth;
- Acetato de etila, grau analítico - Synth;
- Acetona, grau analítico - Synth;
- Acetonitrila, grau analítico - Merck;
- Ácido acético glacial, grau analítico – Synth;
- Água MilliQ[®];
- Água deionizada;
- Alkest TW 80 K[®] (polissorbato 80) - Oxitenio;
- Amido catiônico de mandioca, Superion 250, com grau de substituição 0,027 mol/mol - Novo Horizonte;
- Amido aniônico de mandioca, Superion 3050, com grau de substituição 0,045 mol/mol - Novo Horizonte;
- Benzofenona-3 (2-hidróxi-4-metóxi-benzofenona), grau de pureza 98 % - Aldrich;
- Biocida Acticide (solução aquosa de isotiazolonas e bronopol) - Basf;
- Diclorometano, grau analítico - Isofar;
- Enzima Aquazym[®] 120L (α -amilase – *Bacillus sp.*), densidade 1,1 g/mL - Novozymes;
- ϵ -caprolactona, grau de pureza 99 %, densidade 1,030 g/cm³ - Aldrich;
- Etanol anidro, grau de pureza 99,5 % - Aldrich;
- Hexano, grau analítico - Isofar;
- Miglyol 810[®] (mistura de triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico) - Delaware;
- Octanoato de estanho (2-etil-hexanoato de estanho) (SnOct₂), 95 % de pureza - Sigma-Aldrich;

- Span 60[®] (monoestearato de sorbitano), grau de pureza 99 % - Aldrich;
- Sulfato de sódio anidro, 99 % - Merck;
- Tetrahidrofurano, grau espectroscópico – J. T. Baker.

3.2 EQUIPAMENTOS, ACESSÓRIOS E VIDRARIAS

Além dos equipamentos comuns usados nos laboratórios de pesquisa, foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Agitador mecânico, com velocidade máxima de trabalho de 500 rpm - Nova Ética;
- Balança analítica, com precisão de 0,0001g, BL2200H – Shimadzu;
- Bomba de vácuo Gold Sun;
- Banho termostático - Ophtherm;
- Calorímetro exploratório diferencial (DSC), Exstar 600 – Seiko, locado no Laboratório de Novos Materiais no Departamento de Engenharia Química – EEL/USP;
- Cromatógrafo de permeação em gel (GPC) - Waters-Breeze, locado no Laboratório de Polímeros do Departamento de Engenharia Química – EEL/USP;
- Cromatógrafo de permeação em gel (GPC) – BASF;
- Espectrômetro de Espalhamento de Luz, Zetasizer 1000 - Malvern Instruments, locado no Laboratório de Polímeros do Departamento de Engenharia Química – EEL/USP;
- Espectrômetro de Infravermelho (IR), Spectrum GX FTIR - Perkin Elmer, locado no Laboratório de Conversão de Biomassa Vegetal do Departamento de Engenharia Bioquímica – EEL/USP;
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Mercury, 300 MHz – Varian, locado no Laboratório de Espectroscopia do Departamento de Engenharia Química – EEL/USP;
- Espectrômetro de UV/VIS - Perkin Elmer, locado no Laboratório de Conversão de Biomassa Vegetal do Departamento de Biotecnologia – EEL/USP;
- Placa de agitação magnética/aquecimento, com controlador de temperatura - Ika;

- pHmetro - Mettler Toledo FE20/EL20, locado no Laboratório de Processos de Separação do Departamento de Engenharia Química – EEL/USP;
- Reator e acessórios: reator de vidro encamisado com capacidade de 250 mL, contendo um capilar para nitrogênio e condensador;
- Rotavapor – Fisaton

3.3 MÉTODOS E PROCEDIMENTOS

3.3.1 Síntese e purificação do homopolímero de ϵ -caprolactona

O polímero foi sintetizado via polimerização em massa, segundo metodologia apresentada por Castro e Wang (2003). Segundo os autores, nesta técnica de polimerização é necessário empregar uma proporção de iniciador de 0,5 % em massa, em relação à quantidade de monômero.

A síntese do homopolímero de ϵ -caprolactona (CL) foi realizada pela adição de 3,0000 g de monômero e 0,0150 g de iniciador, com o auxílio de seringa, em tubos de ensaio, os quais foram vedados com septo de borracha. Os tubos foram mantidos sob atmosfera de argônio para evitar umidade e/ou a presença de oxigênio livre no meio reativo. Em seguida, foram homogeneizados manualmente e posteriormente imersos em um banho de silicone a uma temperatura de 120 °C.

Primeiramente foram efetuados ensaios para a determinação das condições de síntese para o homopolímero, isto é, qual o tempo necessário para obtenção de uma massa molar ponderal média ($\overline{M}_w$) de 75000 g/mol. Nestes ensaios, foi realizada uma cinética de polimerização para várias amostras nos seguintes tempos pré-determinados: 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos, mantendo-se a temperatura constante em 120 °C.

O polímero obtido foi solubilizado, a temperatura ambiente, em cloreto de metileno (diclorometano) e posteriormente precipitado em etanol anidro de acordo com o procedimento descrito por Castro e Wang (2003). Este processo foi repetido por mais duas vezes para cada amostra. Após precipitação, as amostras foram filtradas a vácuo e secas a temperatura ambiente, para posterior análise da respectiva massa molar.

Após a determinação da condição de síntese do homopolímero, foram preparados lotes a fim de obter a quantidade necessária de PCL para a realização das encapsulações. Foram preparados, separadamente, lotes de PCL a partir da síntese de 20,6000 g de

monômero e 0,1030 g de iniciador nas mesmas condições descritas anteriormente. Cada um dos lotes obtidos foi analisado via GPC e, os que continham a mesma faixa de $\overline{M}_w$, foram unidos dissolvendo-se os mesmos em diclorometano com posterior eliminação do solvente por exaustão em capela. Este lote final, por sua vez, foi caracterizado via GPC, infravermelho (IR), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e ressonância magnética nuclear (RMN).

3.3.2 Cromatografia de Permeação em Gel, GPC

As massas molares médias e as distribuições das massas molares dos homopolímeros de ϵ -caprolactona foram determinadas por GPC, em um equipamento Waters Breeze System. Este equipamento é composto por uma bomba isocrática (Waters 1515), injetor automático (Waters 717 Plus Autosampler) e detector de índice de refração (Waters 2414) acoplado a um Duo Detector TDA 302 (Viscotek). Foi utilizado um set de colunas cromatográficas da marca Phenomenex contendo pré-coluna Phenogel (5 μ m), coluna Phenogel (5 μ m - 500 Å) e coluna Phenogel (5 μ m - 104 Å).

As amostras de PCL foram diluídas na razão de 12 mg/mL de tetrahidrofurano grau espectroscópico e depois mantidas em repouso durante 20 horas para garantir a total dissolução do polímero. Em seguida, as soluções foram filtradas com filtro de politetrafluoretileno (PTFE), com diâmetro de poro 0,45 μ m (Millex LCR). O volume de injeção foi de 100 μ L, sob fluxo constante de 1,0 mL/min do eluente na temperatura de 30 °C. Os padrões usados no método de calibração universal foram os de poliestireno (PS).

3.3.3 Espectroscopia no Infravermelho, IR

O polímero do lote final foi caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho, a fim de identificar seu principal grupo funcional, isto é, a carbonila característica de um éster.

A análise foi realizada em um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier Spectrum GX FTIR (Perkin Elmer). Para a análise, um pequeno filme polimérico foi depositado entre duas pastilhas de cloreto de sódio (NaCl), acopladas a um suporte e posteriormente inseridas no equipamento. A leitura foi realizada por transmissão na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} com 32 scans.

Para efeito de comparação, o monômero ϵ -caprolactona também foi identificado na região do infravermelho, empregando-se o mesmo procedimento descrito para a PCL.

3.3.4 Ressonância Magnética Nuclear, RMN

A técnica de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C) e de próton (RMN ^1H) foi utilizada, assim como a análise de infravermelho, como uma caracterização qualitativa do polímero. Com esta técnica RMN ^{13}C e RMN ^1H foi possível confirmar a estrutura do polímero sintetizado em laboratório.

Os espectros de RMN ^{13}C e RMN ^1H foram obtidos utilizando um espectrômetro de ressonância magnética nuclear Mercury (Varian) a 300 MHz. Para as análises de RMN ^{13}C e RMN ^1H o polímero e o monômero foram dissolvidos, separadamente, em 0,5 mL de clorofórmio deuterado contendo tetrametilsilano (TMS) como referência de escala, colocados no tubo específico para a análise.

3.3.5 Calorimetria Exploratória Diferencial, DSC

Para a determinação da temperatura de transição vítrea (T_g) e temperatura de fusão cristalina (T_m) do lote final de PCL empregou-se a técnica DSC. A análise foi realizada em um equipamento Exstar 600 (Seiko). As amostras de polímero, com massa em torno de 7,0 mg, foram mantidas sob atmosfera de nitrogênio, com o aumento programado de temperatura na faixa de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, no intervalo de temperatura de -100 a 100 $^{\circ}\text{C}$, empregando nitrogênio líquido.

3.3.6 Caracterização do amido de mandioca

3.3.6.1 Umidade

O amido foi seco em estufa a 100-105 $^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 8 horas para remoção da água presente em seu meio (CEREDA, 2002).

Primeiramente tarou-se um cadinho de porcelana numa temperatura de 100-105 $^{\circ}\text{C}$ durante duas horas. O cadinho foi resfriado em dessecador e posteriormente pesado. Em

seguida, pesou-se 3,0000 g da amostra e este cadinho foi levado novamente a estufa por 8 horas. Após este período, o cadinho foi resfriado em dessecador e o seu peso anotado. Este procedimento foi repetido até peso constante.

3.3.7 Hidrólise enzimática dos amidos modificados

O amido foi hidrolisado enzimaticamente, segundo a metodologia apresentada por Kühn e Schuhmacher (2004), utilizando um planejamento de experimentos do tipo Taguchi. Neste planejamento experimental foram variados o tempo de hidrólise e a quantidade de enzima, a fim de verificar qual seria a melhor condição para a redução da massa molar dos amidos modificados, a partir de uma formulação referência. A Tabela 4 apresenta as quantidades dos reagentes empregados no processo de hidrólise.

Tabela 4 – Formulação referência para a hidrólise dos amidos (KÜHN; SCHUHMACHER, 2004).

Item	% Fórmula	Massa a ser pesada
Amido	31,746%	36,552 g
Acetado de Ca	0,088%	0,349 g
Enzima	0,180%	15,000 g
Água	67,986%	48,098 g
Total	100,000%	100,000 g

O amido úmido foi colocado em um reator de vidro encamisado juntamente com água deionizada e esta mistura foi mantida sob agitação durante 10 minutos a temperatura constante de 70 °C. Após este período, foi adicionada uma quantidade de solução aquosa de acetato de cálcio a 25 % em massa assim como uma solução a 1 % em massa da enzima comercial α -amilase. Após o tempo desejado, segundo a matriz experimental, a hidrólise foi interrompida com a adição 5,0 mL de ácido acético glacial.

3.3.8 Purificação das amostras dos hidrolisados

O amido hidrolisado foi precipitado, na proporção de 1:10 mL, em acetato de etila, a temperatura ambiente, e as fases separadas por decantação. Este processo foi realizado por mais uma vez para cada amostra. Após a separação das fases, as amostras dos amidos hidrolisados foram secas em estufa a 50 °C.

3.3.8.1 Preparação das soluções aquosas dos amidos hidrolisados

Para facilitar a pesagem das amostras dos amidos hidrolisados devidamente purificados, foram preparadas soluções aquosas. Primeiramente, toda a massa purificada e seca de amido foi solubilizada em 250,0 mL de água MilliQ® e posteriormente o teor de sólidos foi calculado.

A determinação do teor de sólidos foi realizada por gravimetria pela secagem de um cadinho contendo 2,0000 g de amostra, em estufa a 100 °C durante 2 horas. Após este período, o cadinho foi resfriado em dessecador e o seu peso anotado. Este procedimento foi repetido até peso constante para todas as amostras de amido. O teor de sólidos (TS) foi determinado a partir da razão entre a diferença do peso do cadinho vazio (CV) e o peso do cadinho seco (CS) e a amostra de amido (AA), multiplicada por 100 (Equação 2):

$$TS = \frac{CS-CV}{AA} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

3.3.9 Cromatografia de permeação em gel, GPC

As massas molares médias e as distribuições das massas molares dos amidos catiônico e aniônico hidrolisados foram determinadas por GPC (BASF). Foi utilizado um set de colunas cromatográficas da marca Agilent Technologies contendo as seguintes colunas PL Aquagel-OH (8 µm), PL Aquagel-OH (40,8 µm) e PL Aquagel-OH (30,8 µm).

Os amidos hidrolisados foram diluídos na razão de 10 mg/mL de NaNO₃ 0,1M. O volume de injeção foi de 100 µL, sob fluxo constante de 1,0 mL/min do eluente na temperatura de 35 °C. Os kits de padrões utilizados no método de calibração foram os de óxido de polietilenoglicol (Agilent), contendo em cada kit os seguintes padrões: Red (620, 11840, 124700 e 1250450 g/mol); Blue (194, 4120, 58400 e 965000 g/mol) e Green (106, 1470, 25820 e 460000 g/mol).

3.3.10 Medidas de tensão superficial

A tensão superficial das amostras de amidos hidrolisados foi avaliada utilizando-se um tensiômetro de anel 2-Hamburg 39 (Kruss), conforme o método do anel (Du Noüy), ASTM D 1331-56. O tensiômetro de anel de Du Noüy é um equipamento de precisão

empregado para determinação das medidas de tensão superficial ou interfacial de um líquido. Os valores medidos são reprodutíveis dentro de $\pm 0,05$ dina/cm e podem ser obtidos pela leitura direta na escala do próprio equipamento. O tensiômetro é constituído por uma balança de torção, a qual utiliza um fio para aplicar a força necessária para remover um anel de platina da superfície do líquido a ser testado.

A solução aquosa de amido hidrolisado foi colocada no recipiente do equipamento, extremamente limpo, e levada à plataforma do tensiômetro. A altura da solução aquosa de amido foi ajustada de maneira que o anel ficasse na superfície desta solução e centrado em relação às paredes do frasco. O motor do equipamento foi acionado, o qual torcionou o anel e forneceu o valor da tensão superficial em m.N.m^{-1} . Foram realizadas medidas, em triplicata, nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,50 e 1,0 % m/m.

3.3.11 Preparação das nanocápsulas poliméricas

As suspensões de nanopartículas poliméricas contendo BZ-3 foram preparadas de acordo com o método de deposição interfacial de polímeros pré-formados, desenvolvido por Fessi et al. (1989). A Tabela 5 apresenta a formulação empregada com suas respectivas quantidades.

Tabela 5 – Formulação referência para o preparo das nanocápsulas poliméricas (KÜLKAMP et al., 2009)

Fase	Componente	Quantidade (mg)
Orgânica	PCL	100
	Miglyol 810 [®]	313,5
	Span 60 [®]	76,6
	BZ-3	50
	Acetona	31600
Aquosa	Água MilliQ [®]	53300
	Tween 80 [®]	76,6

Os componentes da fase orgânica foram pesados, transferidos para um béquer e mantidos sob agitação magnética até completa dissolução. Paralelamente, a fase aquosa também permaneceu sob agitação magnética. Após dissolução de todos os componentes de

ambas as fases, a fase orgânica foi vertida lentamente, com auxílio de um funil de adição, sobre a fase aquosa. A suspensão resultante manteve-se sob agitação por 10 minutos e, em seguida, a acetona foi eliminada em um evaporador rotativo a uma temperatura de 35 °C. A suspensão foi transferida para um balão volumétrico de 100,0 mL, completando-se o volume com água MilliQ®.

3.3.11.1 Preparo das suspensões de NC contendo amidos hidrolisados: planejamento de misturas

Para avaliar os efeitos quantitativos da adição de amidos hidrolisados como agentes tensoativos da fase aquosa na obtenção de NC, foi utilizado um planejamento experimental de misturas do tipo simplex.

O planejamento simplex (*Simplex Lattice Design*) consiste em uma modelagem estatística para a determinação dos efeitos isolados e das interações entre os componentes de uma mistura. Este planejamento é muito utilizado, pois permite trabalhar com um número reduzido de experimentos, quando comparado aos outros tipos de planejamentos de mistura (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

O planejamento de mistura permite a criação de um modelo estatístico no qual uma resposta desejada ($\hat{y}$) torna-se previsível a partir da fração molar de cada componente da formulação (x_i) e seus respectivos efeitos (b_i). Além disso, o planejamento possibilita a avaliação das interações entre componentes (x_i e x_j), a partir de efeitos combinados (b_{ij}). Deste modo, a resposta desejada é representada pela Equação 3.

$$\hat{y} = \sum_{i=1}^n b_i \cdot x_i + \sum_{i=1}^{n-1} \left(\sum_{j>i}^n b_{ij} \cdot x_i \cdot x_j \right) \quad (\text{Equação 3})$$

Os experimentos consistiram em variar a fração molar do tensoativo hidrofílico (Tween 80®) substituindo-o por amidos hidrolisados, mantendo-se constante o número de mols final de tensoativos da fase aquosa (0,058 mmol, equivalente a 76,6 mg de Tween 80®).

A matriz experimental (Tabela 6) apresenta as proporções dos componentes da fase aquosa referente a cada experimento.

Tabela 6 – Matriz experimental das frações molares de tensoativo na fase aquosa nas formulações de NC poliméricas.

EXP	TWEEN	AABMM	ACBMM	AAAMM	ACAMM
1	1	0	0	0	0
2	0	1	0	0	0
3	0	0	1	0	0
4	0	0	0	1	0
5	0	0	0	0	1
6	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
7	0,6	0,1	0,1	0,1	0,1
8	0,1	0,6	0,1	0,1	0,1
9	0,1	0,1	0,6	0,1	0,1
10	0,1	0,1	0,1	0,6	0,1
11	0,1	0,1	0,1	0,1	0,6

Onde,

AABMM = amido aniônico de baixa massa molecular;

AAAMM = amido aniônico de alta massa molecular;

ACBMM = amido catiônico de baixa massa molecular;

ACAMM = amido catiônico de alta massa molecular.

As respostas obtidas a partir do planejamento de misturas foram avaliadas em relação ao diâmetro de partículas, polidispersão e teor de encapsulação da BZ-3 nas NC de PCL. As formulações referentes a cada ensaio foram preparadas em duplicata, segundo o item 3.3.11.

Os cálculos efetuados para determinação da influência dos fatores variados sob as propriedades das NC foram realizados utilizando-se o *software* Minitab 15.

3.3.11.2 Extração líquido-líquido da BZ-3 não encapsulada

A BZ-3 não encapsulada (livre) foi removida da suspensão a partir da técnica de extração líquido-líquido, empregando-se hexano como solvente. Nesta técnica foi

necessário escolher criteriosamente o solvente, já que este deveria solubilizar apenas a BZ-3 livre e não as nanocápsulas de PCL.

A partir da suspensão de nanocápsulas, já avolumada no balão de 100,0 mL, foi retirada uma alíquota de 10,0 mL a qual foi transferida para um funil de separação. No funil foram adicionados 15,00 mL de hexano e este foi homogeneizado manualmente. Após decantação, as fases foram separadas e a fase contendo BZ-3 dissolvida em hexano foi tratada com sulfato de sódio anidro para remoção de vestígios de água. Esta solução foi filtrada em algodão e recolhida em um vidro limpo e seco para posterior caracterização.

3.3.11.3 Determinação do percentual de encapsulação por espectroscopia no ultravioleta

Para a determinação do comprimento de onda (λ) da BZ-3 foi realizada uma varredura no espectro na faixa de 200 a 500 nm, utilizando um espectrômetro de UV/VIS (Perkin Elmer). O comprimento de onda é identificado através do pico de maior absorção, isto é, o pico mais intenso exibido no espectro. Este λ , portanto, foi adotado para a determinação da curva de calibração da BZ-3 e sua eficiência de encapsulação nas formulações de nanopartículas.

Após a identificação do comprimento de onda da BZ-3, uma curva de calibração foi construída, a fim de determinar a faixa de concentração da BZ-3 no comprimento de onda específico. Primeiramente foi preparada uma solução padrão de 100 $\mu\text{g/mL}$, pela dissolução de 250 mg de BZ-3 em acetonitrila (ACN) em um balão volumétrico de 250,0 mL. A partir desta solução foram feitas várias diluições, conforme Tabela 7. Para a construção da curva, foram plotadas no eixo das ordenadas as absorbâncias e, no eixo das abscissas, as concentrações.

A equação da reta foi determinada por regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Os valores experimentais foram tratados estatisticamente com o auxílio do *software* Minitab 15.

Tabela 7 – Soluções de BZ-3/ACN em diferentes concentrações.

Balão (50,0 mL)	Solução Padrão 100 µg/mL (mL)	Diluyente (mL)	Concentração final (µg/mL)
1	1,0	49,0	2,0
2	2,0	48,0	4,0
3	3,0	47,0	6,0
4	4,0	46,0	8,0
5	5,0	45,0	10,0
6	6,0	44,0	12,0
7	7,0	43,0	14,0
8	8,0	42,0	16,0

Para a quantificação da BZ-3 livre, as soluções de BZ-3 em hexano foram secas no rotavapor para total eliminação do solvente. Em seguida, toda a massa contida no frasco foi dissolvida com ACN e, posteriormente, transferida para um balão volumétrico de 50,0 mL. Após a preparação das soluções de BZ-3/ACN, a quantidade do ativo não encapsulado foi determinada por espectroscopia no ultravioleta no comprimento de onda de 289 nm. O percentual de encapsulação (E) foi determinado a partir da razão entre a diferença da concentração total de benzofenonas-3 na suspensão (CT) e a concentração de benzofenonas-3 livre (CL) e a concentração total, multiplicada por 100 (Equação 4).

$$E = \frac{CT-CL}{CT} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

3.3.11.4 Determinação do diâmetro médio de partículas e polidispersidade

O diâmetro médio e a polidispersidade das nanopartículas em suspensão foram determinados através de espalhamento dinâmico de luz utilizando-se um equipamento Zetasizer 1000 (Malvern Instruments). A diluição das suspensões foi feita a partir da suspensão contida no balão volumétrico de 100,0 mL, transferindo-se uma alíquota de 1,0 mL da suspensão para um balão volumétrico de 50,0 mL, completando-se este volume com água MilliQ®.

3.3.11.5 Medidas de pH

As medidas de pH foram efetuadas diretamente nas amostras utilizando-se um pHmetro FE20/EL20 (Mettler Toledo), previamente calibrado com soluções tampão para calibração pH 4,0 e 7,0 (Merck).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 SÍNTESE DA POLI(ϵ -CAPROLACTONA), PCL

4.1.1 Cinética de polimerização

Para a determinação das condições de síntese para o homopolímero, isto é, qual o tempo necessário para obtenção de uma massa molar ponderal média ($\overline{M}_w$) de 75000 g/mol foi realizada uma cinética de polimerização nos seguintes tempos pré-determinados: 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. Em todas as amostras, foi realizada a síntese repetindo-se o procedimento descrito no item 3.3.1. A massa molar ponderal média ($\overline{M}_w$) dos polímeros sintetizados foi avaliada via cromatografia de permeação em gel (GPC). O método foi validado e os dados foram tratados utilizando-se o *software* Minitab 15.

A Figura 25 apresenta um cromatograma típico da PCL. Os demais resultados encontram-se no Anexo A.

Figura 25 – Cromatograma da Amostra de 60 minutos – Síntese PCL.

A Tabela 8 exibe os valores da massa molar numérica média ($\overline{Mn}$), da massa molar ponderal média ($\overline{Mw}$) e da polidispersidade $\overline{Mw}/\overline{Mn}$, obtidos via GPC, da cinética de polimerização da PCL.

Tabela 8 – Dados obtidos na cinética da PCL.

Tempo (min)	$\overline{Mn}$ (g/mol)	$\overline{Mw}$ (g/mol)	$\overline{Mw}/\overline{Mn}$
45	13717	15874	1,1573
60	26010	32890	1,2645
90	34454	54107	1,5704
120	45094	87003	1,9294
150	62116	141060	2,2709
180	70287	162207	2,3078

A análise preliminar dos dados mostrou que os mesmos estão de acordo com a curva de distribuição de massa molar, ou seja, que os valores encontrados para $\overline{Mw}$ são superiores aos respectivos de $\overline{Mn}$ (CANEVAROLO, 2007).

As amostras de 15 e 30 minutos não foram caracterizadas via GPC, pois no processo de purificação, não houve a precipitação da PCL comparadas às outras amostras de polímero. A Figura 26 confirma a formação do polímero a partir de 45 minutos (terceiro tubo, da esquerda para direita) devido à opacidade do produto. De acordo com Sinha et al. (2004), a PCL, a temperatura ambiente, apresenta-se como um sólido branco.

Figura 26 – Amostras de PCL, da esquerda para direita, nos tempo de 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos.

Primeiramente, foi determinado o erro experimental através do teste F (Análise de Variância). Os resultados são demonstrados na Figura 27.

Figura 27 – Distribuição de massa molar versus tempo de polimerização para a PCL.

De acordo com os resultados, a massa molar (MM) da PCL pode ser representada por um modelo linear no intervalo de 45 a 180 minutos. Isto é, com esta cinética de polimerização pode-se prever qual será o valor de $\overline{Mw}$ da PCL, nas condições experimentais adotadas, com um intervalo de confiança de 95 % (representado pelas linhas pontilhadas vermelhas no gráfico).

Já a avaliação do coeficiente de determinação (R^2 ou R-Sq) mostrou que neste intervalo 98,2 % da massa molar pode ser prevista pela variação do tempo de síntese, sendo que os 1,8 % restantes são atribuídos às outras condições, inclusive o erro experimental. A Tabela 9 apresenta os resultados da Análise de Variância.

Tabela 9 – Análise de variância.

Fonte de informação	Regressão Linear	Resíduo (Erro)	Total Corrigido
Grau de Liberdade (GL)	1	4	5
Soma de Quadrados (SQ)	$1,71950 \cdot 10^{10}$	$3,13547 \cdot 10^8$	$1,75085 \cdot 10^{10}$
Quadrados Médios (QM)	$1,71950 \cdot 10^{10}$	$7,83868 \cdot 10^7$	---
Teste F	219,36	---	---
p-valor (teste de hipótese)	0,000	---	---

O valor encontrado pelo teste F confirma que os resultados foram significativos, pois para uma probabilidade de erro de 5 %, e para os graus de liberdade 4 e 1 (resíduo e regressão linear, respectivamente) tem-se um valor do limite de significância do teste F de 7,71. Isto prova a significância do modelo calculado, pois $F_{\text{calc}} \gg F_{\text{tab}}$.

Juntamente com o teste F foi realizado um teste de hipótese (teste t) no qual é verificado se os valores encontrados nas amostras podem descrever, com uma certeza de 5 %, os dados da população. O valor deste teste, menor que 0,05, evidencia que a hipótese assumida pode ser dita como verdade (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

De acordo com os trabalhos de Guterres (adotada como formulação referência) o valor de $\overline{Mw}$ mais utilizado para a preparação de nanopartículas de PCL encontra-se entre 65.000 e 80.000 g/mol. Baseado nos resultados da cinética da PCL, esta faixa situa-se em aproximadamente 98,9 minutos de polimerização, resultando em uma massa molecular entre 62000 e 84000 g/mol para o intervalo de confiança de 95 %.

4.1.2 Caracterização do lote final de PCL

Após a determinação da condição de síntese da PCL, foram sintetizados três lotes com o objetivo de obter a quantidade necessária de polímero para as posteriores encapsulações. De acordo com a cinética de polimerização, o tempo necessário para

obtenção de um $\overline{Mw}$ de 75000 g/mol foi de 100 minutos, o qual foi adotado para a síntese dos lotes. Na síntese de todos os lotes as proporções de monômero e iniciador, a temperatura e o processo de purificação mantiveram-se os mesmos, como descrito no item 3.3.1.

Com os lotes devidamente purificados e secos, foram realizadas análises de GPC para a determinação de $\overline{Mw}$. A Tabela 10 apresenta estes valores, assim como os valores de $\overline{Mn}$ e a polidispersão, $\overline{Mw}/\overline{Mn}$, obtidos via GPC.

Tabela 10 – Dados obtidos nos lotes de PCL.

LOTE	$\overline{Mn}$ (g/mol)	$\overline{Mw}$ (g/mol)	$\overline{Mw}/\overline{Mn}$
1	45892	70293	1,5317
2	46536	75473	1,6218
3	62771	88319	1,4070

Como pode ser observado na Tabela 10, os lotes 1 e 2 apresentaram valores de $\overline{Mw}$ bem próximos ao teórico de 75000 g/mol. Portanto, estes lotes foram unidos a fim de que a quantidade de polímero fosse suficiente para as posteriores encapsulações.

Da mesma maneira que os lotes individuais, o valor de $\overline{Mw}$ do lote final foi determinado, assim como sua polidispersão. A Figura 28 apresenta o cromatograma do lote final.

Figura 28 – Cromatograma do lote final da PCL.

Como o polímero do lote final foi uma junção de dois lotes individuais, ambos sintetizados em laboratório, tornou-se necessário realizar algumas caracterizações, para verificar a pureza deste lote e determinar algumas propriedades físicas como, T_g e T_m .

Primeiramente, foi realizada a identificação do polímero sintetizado por meio da técnica de espectroscopia no infravermelho (IR). O polímero foi identificado pelo grupo característico típico de um éster, ou seja, seu principal grupo funcional carbonila ($C=O$) e a ligação do tipo ($C-O$). A Figura 29 exhibe o espectro de infravermelho da PCL sintetizada com seus principais grupos funcionais.

Figura 29 – Espectro de infravermelho da poli(ε-caprolactona), PCL, sintetizada em laboratório.

De acordo com Silverstein, Webster e Kiemle (2006), a carbonila de um éster é identificada na região de 1735 cm⁻¹, enquanto a ligação (C — O) é identificada na região de 1200cm⁻¹, conforme exibido no espectro da Figura 29.

Para efeito de comparação também foi realizada a mesma análise para o monômero ε-caprolactona, conforme a Figura 30.

Figura 30 – Espectro de infravermelho do monômero ε-caprolactona, CL.

O espectro do monômero também apresentou os mesmos grupamentos nas mesmas regiões, já que ambos possuem a função éster.

Analogamente, também foram realizadas análises de RMN ^{13}C e RMN ^1H do monômero e polímero de forma que ambos fossem identificados. As Figuras 31 e 32 apresentam o espectro de próton da ϵ -caprolactona e poli(ϵ -caprolactona), respectivamente.

Figura 31 – Espectro de RMN ^1H da ϵ -caprolactona.

Figura 32 – Espectro de RMN ^1H da poli(ϵ -caprolactona) sintetizada em laboratório (lote final).

Baseado nos espectros de RMN ^1H , pode-se perceber que ambos são iguais, já que monômero e polímero possuem o mesmo número de hidrogênios em suas estruturas (no caso do polímero, da unidade de repetição), não ocorrendo mudança significativa quando estes espectros são comparados.

Já os espectros de RMN ^{13}C (apt) de monômero e polímero são exibidos nas Figuras 33 e 34, respectivamente. O carbono apt é uma variante do espectro de carbono 13 que especifica os grupos presentes na cadeia, ou seja, apresenta o sinal dos grupos CH_2 e do carbono quaternário para cima; diferente dos sinais dos grupos CH_3 e CH os quais são voltados para baixo (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

Figura 33 – Espectro de RMN ^{13}C (apt) da ϵ -caprolactona.

Figura 34 – Espectro de RMN ^{13}C (apt) da poli(ϵ -caprolactona) sintetizada em laboratório.

Como ambas as estruturas, do monômero e do polímero, são constituídas pelos mesmos grupos, isto é, CH_2 e carbonila, os espectros de carbono 13 (apt) só apresentam sinais para cima da linha de base. Portanto, neste caso, os espectros de carbono 13 do monômero e do polímero também são iguais sem qualquer mudança significativa.

Apesar de apresentarem os mesmo grupos funcionais, o mesmo número de hidrogênios (no caso do polímero, da unidade de repetição) diferenciando-se somente no momento da síntese pelo mecanismo por abertura de anel, monômero e polímero possuem estados físicos diferentes. Isto é, o monômero é um líquido transparente a temperatura ambiente, e o polímero, na mesma condição, é um sólido branco. A Figura 35 apresenta as características físicas destes componentes para distingui-los.

Figura 35 – Estados físicos de monômero e polímero.

Outra caracterização também realizada foi a análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) do polímero do lote final. Esta técnica permite medir a entalpia de fusão (ΔH_f), temperatura de fusão cristalina (T_m), temperatura de transição vítrea (T_g) e temperatura de cristalização (T_c). Além disso, detecta mudanças físicas e químicas em um material acompanhadas pela liberação ou absorção de calor. Dependendo do produto a ser analisado por DSC, utiliza-se atmosfera inerte para evitar a degradação termo oxidativa (CANEVAROLO, 2007).

Neste caso, as temperaturas de transição vítrea e de fusão cristalina do polímero do lote final foram determinadas. A Figura 36 apresenta a curva de DSC.

Figura 36 – Curva de DSC do polímero do lote final.

A curva de DSC da PCL apresenta uma temperatura de fusão cristalina (T_m) de 63 °C. Entretanto, para determinar a temperatura de transição vítrea, foi necessário restringir a escala. Segundo a curva, a T_g encontra-se em -63 °C. De acordo com Sinha et al. (2004), os valores teóricos para a T_g e T_m da PCL são, respectivamente, de -60 °C e 60 °C.

4.2 HIDRÓLISE DOS AMIDOS

Com o intuito de definir as condições quantitativas ideais para a obtenção dos amidos hidrolisados com diferentes massas moleculares, um planejamento fatorial 2^2 , com réplicas no ponto central, foi aplicado ao método de hidrólise enzimática.

Segundo a matriz do planejamento fatorial 2^2 os amidos foram hidrolisados em 5 condições experimentais, nas quais 4 são periféricas (valores máximos e mínimos dos fatores) e uma é central, realizada em triplicata para a determinação do erro experimental. Os fatores, variados em 2 níveis cada, foram as concentrações de enzima (α -amilase) e tempo de hidrólise. A escolha da variação dos níveis baseou-se em testes preliminares e em

pesquisa na literatura. Os efeitos dos fatores foram avaliados sobre uma única variável resposta: massa molar ponderal média ($\overline{Mw}$) para cada tipo de amido empregado (aniônico e catiônico).

Os resultados absolutos obtidos com o planejamento, aplicado a hidrólise dos amidos modificados estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11 – Matriz experimental e resultados obtidos com a hidrólise dos amidos modificados.

Experimento	Tempo (min)	Quant. Enzima (m/m)	Massa molecular ponderal média – $\overline{Mw}$ (g/mol)	
			Catiônico	Aniônico
1	30	0,02 %	1832,9	2952,2
2	180	0,02 %	1193,3	2218,5
3	30	0,18 %	1112,5	2090,2
4	180	0,18 %	880,3	1650,5
5	105	0,10 %	1006,4	1901,0
6	105	0,10 %	995,9	1910,2
7	105	0,10 %	1026,0	1906,3

Os valores de $\overline{Mw}$ dos amidos hidrolisados foram determinados pela técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC), como descrito no item 3.3.9. As curvas de GPC de todos os amidos hidrolisados encontram-se no Anexo B.

Para avaliar a influência da variação dos fatores sobre $\overline{Mw}$ foram construídos gráficos de pareto, a partir dos resultados das massas molares descritos na Tabela 11.

A Figura 37 apresenta os contrastes dos fatores tempo e quantidade de enzima sobre $\overline{Mw}$.

Figura 37 – Efeitos padrões sobre a massa molécula ponderal média, $\overline{Mw}$.

Para testar a significância estatística dos efeitos causados pelas variações nos fatores estudados, realizou-se análise de variância (ANOVA). A Tabela 12 descreve os valores estimados dos efeitos sobre $\overline{Mw}$ e o resultado do teste de significância com os valores de p.

Tabela 12 – Matriz experimental e resultado (hidrólise dos amidos modificados).

Termo	Amido aniônico		Amido catiônico	
	Efeito	p (*)	Efeito	p (*)
Tempo de hidrólise	-435,9	0,001	-586,7	0,000
Quant. Enzima	-516,7	0,001	-715,0	0,000
Tempo* Quant. Enzima	203,7	0,006	147	0,001

(*) probabilidade de não significância

Segundo os resultados descritos na Figura 36 e na Tabela 12 todos os efeitos (inclusive as interações) exibiram $p < 0,01$, indicando que estes efeitos foram significativos, para um nível de confiança de 95,0 %, na hidrólise dos dois amidos modificados avaliados. Os valores numéricos estimados para os efeitos do tempo de hidrólise e quantidade de enzima sobre $\overline{Mw}$ foram de -435,9 e -516,7 respectivamente, para o amido aniônico; e -586,7 e -715,0 respectivamente, para o amido catiônico. Ou seja, quanto maior o tempo de hidrólise e a quantidade de enzima menor será o valor de $\overline{Mw}$ para ambos os amidos.

Apesar do fator tempo apresentar um efeito significativo no processo de hidrólise, o efeito da quantidade de enzima foi preponderante. Isso se deve às condições ótimas do meio (pH, temperatura e íon metálico adicionado) para a enzima α -amilase, adotadas no procedimento de hidrólise.

Para a hidrólise realizada em laboratório estas condições ótimas foram: pH 7,0 (neutro); temperatura de 70 °C e solução aquosa de acetato de cálcio (íon metálico empregado). De acordo com Cordeiro, Martins e Luciano (2002), a enzima α -amilase produzida por *Bacillus sp.* termofílico apresentou atividade máxima para valores de pH igual a 7,5 e temperatura de 70 °C, com uma baixa inibição de sua atividade catalítica utilizando-se os íons metálicos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Sr^{2+} e Mn^{2+} . Ou seja, trabalhando-se nas condições ótimas da enzima, é possível garantir sua atividade máxima. Portanto, quanto maior a atividade catalítica da enzima, maior a capacidade de hidrolisar, reduzir as cadeias do amido, e consequentemente o valor de $\overline{Mw}$. Além disso, segundo Cereda (2002) os amidos de mandioca, dentre os amidos de outras fontes botânicas exceto cereais, são menos resistentes a degradação enzimática.

A interação obtida apresentou valores positivos para os dois amidos, mostrando que o efeito combinado entre o tempo de hidrólise e a quantidade de enzima é menor do que o esperado, comparado aos valores dos efeitos individuais.

Neste contexto, foram escolhidos 4 lotes de amidos hidrolisados, 2 aniônicos e 2 catiônicos, para serem utilizados nas formulações de nanoencapsulação. A Tabela 13 mostra as condições destes lotes.

Tabela 13 – Condições de hidrólise dos lotes utilizados nas formulações de nanocápsulas.

Lote	Descrição	Nomenclatura	Condição de hidrólise	
			Tempo (min)	Quant. Enzima (%m/m)
1	Amido Aniônico de Baixa Massa Molar	AABMM	180	0,18 %
2	Amido Catiônico de Baixa Massa Molar	ACBMM	180	0,18 %
3	Amido Aniônico de Alta Massa Molar	AAAMM	30	0,02 %
4	Amido Catiônico de Baixa Massa Molar	ACAMM	30	0,02 %

4.2.1 Caracterização dos lotes de amido hidrolisado

O emprego de amidos modificados como agente tensoativos/estabilizantes em emulsões O/A tem sido estudado por diversos autores, assim como o estudo de suas características tensoativas.

Um dos parâmetros mais importantes para designar a aplicação de um determinado composto como agente tensoativo/emulsificante é sua tensão superficial. Pode-se dizer que a maioria das propriedades dos agentes tensoativos depende de sua capacidade em reduzir a tensão superficial, pois é a relação entre a estrutura química, a velocidade e o grau de adsorção na interface ou superfície, que diferencia os vários tipos de tensoativos e, consequentemente, determina sua aplicação.

Para os lotes finais de amidos hidrolisados, foram realizados testes de tensão superficial para avaliar a capacidade tensoativa de cada amido. Esta capacidade tensoativa

foi avaliada plotando-se gráficos de concentração versus tensão superficial para todos os amidos hidrolisados. As Figuras 38a, 38b, 38c e 38d apresentam os gráficos de tensão superficial para os amidos ACBMM, ACAMM, AABMM e AAAMM, respectivamente.

Figura 38 – Tensão versus concentração para os amidos hidrolisados.

Baseado nos resultados de tensão superficial, os amidos AABMM e ACBMM reduziram significativamente a tensão superficial, comparados aos amidos AAAMM e ACAMM. Ou seja, somente os dois primeiros apresentaram capacidade tensoativa, os quais podem atuar como agentes estabilizantes/tensoativos no sistema de nanopartículas poliméricas.

Krstonosic, Dokic e Milanovic (2011) determinaram a CMC de dois diferentes amidos modificados (OSA) por viscosimetria, condutimetria, tensão superficial e colorimetria. Os valores da CMC para os dois amidos OSA (OS1 e OS2) variaram de 0,050 a 0,088 g/100cm³ e de 0,041 a 0,081 g/100cm³, respectivamente, dependendo da técnica aplicada. Nos testes de tensão foi observada a capacidade dos amidos OSA em diminuir significativamente a tensão superficial da água, isto é, a capacidade tensoativa da molécula. Os autores concluíram que os amidos OSA estudados podem atuar como agentes tensoativos em um sistema de emulsão O/A.

De acordo com os resultados obtidos os amidos hidrolisados AABMM e ACBMM podem atuar como agentes tensoativos nos sistemas de emulsão O/A.

4.3 FORMULAÇÕES DE NANOCÁPSULAS CONTENDO AMIDOS HIDROLISADOS

As NC poliméricas foram preparadas de acordo com o método de deposição interfacial de polímeros pré-formados (FESSI et al., 1989), descrito no item 3.3.11.

Os fenômenos que regem a formação de NC pelos métodos de nanoprecipitação e deposição interfacial de polímeros pré-formados são turbulência interfacial, difusão e efeitos de superfície (efeito Marangoni). A turbulência interfacial é causada pela diminuição da tensão interfacial, quando a fase orgânica é vertida sobre a fase aquosa. Logo, o solvente orgânico difunde pela fase aquosa arrastando as cadeias poliméricas, formando nanogotículas as quais se agregam em NP espontaneamente, devido à contínua difusão do solvente orgânico na presença de água (GALINDO-RODRIGUES et al., 2004; MORAES, 2009). Ao redor destas nanogotículas ocorre a deposição do polímero, formando um invólucro que contém um núcleo oleoso, originando assim as nanocápsulas poliméricas (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998).

Durante a preparação das NP, vários fatores são determinantes para avaliação de suas propriedades, tais como concentração, composição e massa molar do polímero; tipo e volume do solvente orgânico; tipo e concentração do tensoativo/estabilizante; volume da fase aquosa; temperatura; velocidade, tempo e tipo de agitação (no caso de métodos que envolvem emulsificação) (MORAES, 2009).

A composição quali e quantitativa das formulações de micro ou nanopartículas poliméricas são fatores decisivos para garantir propriedades adequadas e estabilidade das formulações. Por isso, planejar o preparo destas formulações por meio de planejamento de experimentos tem sido uma alternativa muito empregada, a fim de estimar os contrastes dos parâmetros envolvidos na etapa de preparação sobre as propriedades físico-química das NP, como diâmetro, eficiência de associação do fármaco, entre outras (BHAVSAR; TIWARI; AMIJL, 2006; DERAKHSHANDEH; ERFAN; DADASHZADEH, 2007; MONDAL et al., 2008; MORAES, 2009).

Para definir as condições quantitativas de amidos hidrolisados ideais para manter a estabilidade das suspensões de NC, um planejamento de misturas foi aplicado ao preparo de NC de PCL contendo BZ-3.

De acordo com o planejamento de misturas foram preparadas, utilizando-se o método de deposição interfacial de polímeros pré-formados, 11 formulações em duplicata de maneira aleatória. Os fatores variados foram as frações molares de Tween 80[®], amidos aniônicos (alta e baixa massa molar) e amidos catiônicos (alta e baixa massa molar), mantendo-se sempre a quantidade total de agente tensoativo da formulação. Os efeitos dos fatores foram avaliados sobre as respostas: diâmetro de partículas (DP), polidispersidade (Poli) e percentual de encapsulação (E).

Os resultados absolutos obtidos com o planejamento de misturas aplicado ao preparo de suspensões de NC de PCL contendo BZ-3 com amidos hidrolisados estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultados experimentais.

EXP	Diâmetro de Partículas (nm)		Polidispersidade		Percentual de Encapsulação	
1	122	116	0,934	0,977	99,9%	99,9%
2	158	59	0,896	0,733	99,2%	98,5%
3	332	99	0,931	0,664	99,1%	98,6%
4	370	204	0,862	0,816	99,2%	99,9%
5	1458	1500 (*)	1,000	0,583	17,6%	22,1%
6	241	373	1,000	0,924	99,8%	99,3%
7	176	265	0,999	0,965	99,9%	99,9%
8	538	230	1,000	0,672	99,9%	99,0%
9	115	387	0,928	0,831	99,2%	98,7%
10	222	103	0,738	0,843	99,6%	97,5%
11	850 (*)	850 (*)	0,885	0,631	64,0%	57,7%

(*) Valor atribuído, devido à separação de fases das amostras.

A seguir, serão feitas algumas análises com relação às características físico-químicas e aos resultados obtidos com o planejamento experimental.

4.3.1 Caracterização físico-química das formulações

4.3.1.1 *Análise macroscópica*

Após o preparo, as suspensões de nanocápsulas apresentaram aparência macroscópica homogênea, aspecto leitoso, branco e opalescente. As suspensões exibiram reflexo azulado, devido ao movimento browniano das nanopartículas em suspensão. O aspecto visual das suspensões de nanocápsulas foi semelhante ao descrito na literatura para diferentes sistemas de nanocápsulas obtidas pelo método de deposição interfacial de polímeros pré-formados (SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000; SCHAFFAZICK et al., 2002; PAESE, 2008; KÜLKAMP et al., 2009; ROGGIA, 2009).

A Figura 39 apresenta o aspecto final das suspensões de nanocápsulas poliméricas.

Figura 39 – Suspensão de nanocápsulas poliméricas de PCL/BZ-3 contendo amidos hidrolisados.

De todas as formulações, somente a formulação 5 (e sua duplicata) apresentou decantação da fase orgânica sem a formação de uma suspensão estável, devido à quantidade nula do tensoativo hidrofílico da formulação referência (Tween 80[®]) e também a baixa capacidade de estabilização do ACAMM, apresentada nos testes de tensão descritos no item 4.2.1. A Figura 40 mostra a decantação da fase orgânica da formulação 5 e sua duplicata.

Figura 40 – Suspensão de NC de PCL/BZ-3 contendo 100 % m/m de ACAMM e 0 % m/m de Tween 80®.

Apesar de não apresentar visível decantação da fase orgânica, a formulação 11 também exibiu baixa estabilidade coloidal, pois esta contém 60 % do ACAMM. A estabilidade coloidal das suspensões de nanocápsulas e seu diâmetro serão discutidos no item 4.3.1.3.

4.3.1.2 Análises de pH

Todas as formulações de poli(ϵ -caprolactona) apresentaram pH ácido, devido à presença do grupo éster, o qual sofrerá hidrólise ao longo do tempo, reduzindo ainda mais o valor de pH (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006). Suspensões de nanocápsulas de PCL contendo outros ativos também exibiram caráter ácido (KÜLKAMP et al., 2009; MORAES, 2009; BARRIOS, 2010). A Tabela 15 demonstra os valores de pH obtidos logo após o preparo das suspensões.

Tabela 15 - Medidas de pH das suspensões de NC de PCL/BZ-3 contendo amidos hidrolisados.

Formulação	pH	
1	5,09	4,96
2	4,55	4,55
3	4,54	4,60
4	4,26	4,34
5	4,13	4,12
6	4,35	4,34
7	4,54	4,47
8	4,54	4,40
9	4,47	4,45
10	4,27	4,42
11	4,25	4,19

De acordo com Alves et al. (2007), as suspensões produzidas encontram-se coerentes para este tipo de sistema e na faixa de pH adequada para formulações de uso tópico (3 a 10), não interferindo nas características de permeação de moléculas lipofílicas, como é o caso da BZ-3.

4.3.1.3 Avaliação do diâmetro médio de partículas

Vários componentes da formulação podem influenciar no diâmetro médio de partículas, tais como: polímero (concentração e natureza), tensoativos, óleo e solvente orgânico.

Um parâmetro muito importante que afeta as propriedades das nanopartículas é a característica (natureza e concentração) do agente tensoativo empregado na formulação. O aumento da concentração deste componente pode tanto aumentar, quanto diminuir o diâmetro das nanopartículas, dependendo de sua natureza (BOUCHEMAL et al., 2004).

A Tabela 16 apresenta os efeitos de cada fator (amidos hidrolisados e Tween 80[®]) de forma isolada (b_i), assim como suas interações (b_{ij}), em relação ao diâmetro médio de partículas para cada condição experimental.

Tabela 16 – Efeitos sobre o diâmetro médio de partícula.

Fator	Efeito			Probabilidade de não significância (p)
	Símbolo	Valor (nm)	Erro ($\pm$ nm)	
TWEEN	b_1	113	75	*
AABMM	b_2	103	75	*
ACBMM	b_3	210	75	*
AAAMM	b_4	281	75	*
ACAMM	b_5	1487	75	*
TWEEN*ACAMM	b_{15}	-625	1530	0,690
AABMM*ACAMM	b_{25}	2737	1530	0,097
ACBMM*ACAMM	b_{35}	-982	1530	0,532
AAAMM*ACAMM	b_{45}	-3464	1530	0,041

A análise da Tabela 16 mostra que a menor contribuição para o aumento do diâmetro médio de partículas foi devido aos componentes AABMM (103 ± 75 nm), TWEEN (113 ± 75 nm) e ACBMM (210 ± 75 nm), pois estes possuem os menores coeficientes. Entretanto, o ACAMM apresentou uma maior contribuição para o aumento do DP (1487 ± 75 nm), comprovando o que foi obtido experimentalmente: separação de fase nas amostras contendo este amido. Isto é, a perda da estabilidade coloidal da suspensão, fato comprovado pelos testes de tensão superficial, os quais demonstraram sua baixa capacidade tensoativa.

Bouchemal et al. (2004) avaliaram o diâmetro de partículas em nanoemulsões em função de diferentes tipos de óleos, tensoativos e solventes. O efeito do tensoativo foi avaliado correlacionando-se os valores do diâmetro médio de partículas e o valor final do EHL da emulsão. Os resultados demonstraram que partículas menores foram obtidas com a combinação dos tensoativos Lipoid S75 e Pluronic F68 (EHL = 21,23) e maiores com os tensoativos Span 85[®] e Tween 20[®] (EHL = 10,98). Ou seja, à medida que o valor de EHL aumenta, maior será sua hidrofiliicidade e consequentemente, menor o diâmetro de partículas.

Neste presente trabalho não houve uma correlação entre a variação dos valores do diâmetro de partículas com os valores de EHL, uma vez que não foi possível determinar os EHL's dos amidos hidrolisados devido à indisponibilidade de caracterizações necessárias para estas medidas.

Entretanto, foi possível avaliar a capacidade dos amidos hidrolisados em reduzir a tensão superficial da água, ou seja, a característica típica de um agente tensoativo por meio de testes de tensão superficial, já discutidos no item 4.2.1. Estes testes apenas confirmam os valores dos diâmetros de partículas obtidos com a adição dos amidos hidrolisados. Isto é, os amidos que reduziram significativamente a tensão superficial (AABMM e ACBMM) foram os que menos contribuíram para o aumento do diâmetro de partículas. Assim como AAAMM que, apesar de reduzir pouco a tensão superficial, não contribuiu de maneira significativa para o aumento de DP. Ao contrário do ACAMM, o qual não demonstrou capacidade em reduzir a tensão superficial, causando assim a decantação da fase orgânica e consequente desestabilização do sistema de NC.

De acordo com Nilsson e Bergenståhl (2006), a presença de macromoléculas em dispersões coloidais pode causar tanto a estabilização quanto a desestabilização do sistema. A estabilização ocorre devido ao aumento da viscosidade da fase contínua causada pela presença destas macromoléculas, mas também pode ser atribuída a adsorção das macromoléculas na superfície das partículas coloidais. Por outro lado, se a camada superficial adsorvida é insuficiente, pode ser causado um efeito de desestabilização; e as macromoléculas não adsorvidas ficarão, então, nas proximidades da superfície da fase dispersa, causando a floculação.

Segundo Tesch, Gerhards e Schubert (2002), macromoléculas, como amidos, podem proporcionar uma estabilização estérica em sistemas dispersos. No sistema de emulsão O/A, empregando-se amidos OSA, foi verificado que o impedimento estérico é o principal mecanismo de estabilização, e que estes amidos foram capazes de adsorver à interface, estabilizando as emulsões contra coalescência.

Como o erro experimental destes coeficientes foi de ± 75 nm não há diferença significativa entre eles. Já em relação às interações, dentre as quatro testadas, nenhuma foi significativa ($p > 0,01$). A Figura 41 mostra os efeitos dos amidos modificados hidrolisados sobre o diâmetro médio de partículas.

Figura 41 – Efeito sobre o diâmetro médio de partículas.

Assim como para a determinação do efeito, foi realizado o cálculo para a validação do modelo. O resultado demonstrou que a variação da fração molar do tensoativo da fase aquosa representa 92,9 % do efeito sobre o DP obtido experimentalmente. Já os 7,1 % restantes são atribuídos ao erro experimental e ao fato de que a técnica de espalhamento de luz é uma metodologia semi-quantitativa, pois seria necessário outro tipo de caracterização morfológica para determinar um valor mais preciso de DP, como por exemplo, microscopias eletrônicas de varredura ou de transmissão.

Os experimentos, por sua vez, foram validados por meio do teste da Análise de Variância (ANOVA). O valor de F obtido foi igual a 68,2 para o modelo linear e 2,48 para o modelo quadrático, descartando a validade das interações. A probabilidade de não significância (p) do modelo também foi determinada, obtendo-se um valor de 0,000, demonstrando também que este modelo foi significativo ($p < 0,01$). A Figura 42 mostra a validade do modelo em relação aos dados experimentais.

Figura 42 – Dados experimentais versus calculados para o diâmetro de partículas.

De acordo com os resultados apresentados, os diâmetros das nanocápsulas de PCL/BZ-3 contendo amidos hidrolisados foram adequados para aplicação de produtos tópicos, visto que os diâmetros recomendados para este objetivo são inferiores a 600 nm (PAESE, 2008).

4.3.1.4 Avaliação da polidispersidade:

Analogamente, a análise dos dados obtidos para a polidispersidade também foi realizada em relação aos efeitos de cada tensoativo de forma isolada (b_i), bem com as interações entre os componentes (b_{ij}), os quais são mostrados na Tabela 17.

Tabela 17 – Efeitos sobre a polidispersidade.

Fator	Coeficiente			Probabilidade de não significância (p)
	Símbolo	Valor	Erro ($\pm$)	
TWEEN	b_1	0,972	0,099	*
AABMM	b_2	0,832	0,099	*
ACBMM	b_3	0,815	0,099	*
AAAMM	b_4	0,856	0,099	*
ACAMM	b_5	0,769	0,099	*
TWEEN*ACAMM	b_{15}	1,259	2,021	0,544
AABMM*ACAMM	b_{25}	-0,262	2,021	0,899
ACBMM*ACAMM	b_{35}	0,780	2,021	0,706
AAAMM*ACAMM	b_{45}	-1,407	2,021	0,499

A análise da Tabela 17 mostra que todos os amidos modificados hidrolisados contribuem da mesma forma para o aumento da polidispersidade. Quanto as interações, dentre as 4 testadas, nenhuma foi significativa ($p > 0,01$). A Figura 43 mostra os efeitos dos amidos hidrolisados sobre a polidispersidade.

O índice de polidispersão, calculado pelo equipamento, reflete o perfil de homogeneidade no tamanho das nanopartículas. De acordo com Kulkamp et al. (2009), um índice de polidispersão até 0,3 é considerado adequado para aplicação cutânea. Entretanto, índices de polidispersão altos refletem a ampla variação no tamanho das nanopartículas, isto é, uma falta de controle nos diâmetros das partículas formadas, a qual pode ser afetada por diversos fatores: natureza e concentração do polímero e do fármaco, concentração de surfactantes, proporção entre solvente orgânico e água, concentração e natureza do óleo, além da velocidade de difusão da fase orgânica na aquosa.

Figura 43 – Efeito sobre a polidispersidade.

O método também foi validado, afirmando que a variação da fração molar do tensoativo da fase aquosa não interfere na polidispersidade, apresentando um coeficiente de correlação de 0,00 %. De acordo com o modelo, independente da fração molar de tensoativo da fase aquosa, a polidispersidade apresentará sempre os mesmos valores.

Os valores de F para os modelos linear e quadrático obtidos pelo teste da ANOVA foram, respectivamente, 0,59 e 0,21 confirmando, mais uma vez, que nenhum modelo foi significativo. A Figura 44 mostra a validade do modelo em relação aos dados experimentais.

Figura 44 – Dados experimentais versus calculados para a polidispersidade.

4.3.1.5 Avaliação do percentual de encapsulação

Para determinação do comprimento de onda (λ) específico para a BZ-3, foi realizada a varredura do espectro de UV de 200 a 500 nm. A partir do espectro de UV (Figura 44), foi possível identificar λ da BZ-3, isto é, o λ que possui a absorção máxima (pico maior), sendo este de 289 nm. Determinado o λ da BZ-3, pôde-se construir a curva de calibração para as diversas soluções de BZ-3/ACN (Figura 45).

Figura 45 – Varredura do espectro de UV para a BZ-3.

Figura 46 – Curva de calibração para soluções de benzofenona-3 em acetonitrila.

De acordo com a Figura 46, a absorbância das soluções de BZ-3/ACN pode ser representada por um modelo linear no intervalo de 2,0 a 16,0 mg/L. Ou seja, com esta curva de calibração pode-se prever qual será o valor de absorbância da BZ-3, nas condições experimentais adotadas, com um intervalo de confiança de 95 % (representado pelas linhas pontilhadas vermelhas no gráfico).

Já a avaliação do coeficiente de determinação (R^2 ou R-Sq) mostrou que neste intervalo 99,5 % da absorbância pode ser prevista pela variação da concentração da solução de BZ-3/ACN, sendo que os 0,5 % restantes são atribuídos às outras condições, inclusive o erro experimental. A partir desta curva de calibração, as concentrações da BZ-3 não encapsulada (livre) foi determinada e, conseqüentemente, o teor de encapsulação.

Por fim, a análise dos efeitos sobre o percentual de encapsulação (E) ou eficiência de encapsulação, é mostrada na Tabela 18.

Tabela 18 – Efeitos sobre o percentual de encapsulação.

Fator	Coeficiente			Probabilidade de não significância (p)
	Símbolo	Valor (%)	Erro ($\pm$ %)	
TWEEN	b_1	101	3	*
AABMM	b_2	100	3	*
ACBMM	b_3	100	3	*
AAAMM	b_4	101	3	*
ACAMM	b_5	18	3	*
TWEEN*ACAMM	b_{15}	69	52	0,211
AABMM*ACAMM	b_{25}	71	52	0,196
ACBMM*ACAMM	b_{35}	61	52	0,259
AAAMM*ACAMM	b_{45}	46	52	0,397

Diversos fatores são capazes de influenciar a quantidade de ativo associada aos sistemas nanoestruturados, dentre os quais se destacam as características físico-químicas do ativo, o pH do meio, as características de superfície das partículas ou a natureza do polímero, a quantidade de ativo adicionada à formulação, a natureza do óleo utilizado (no caso das NCs) e o tipo de tensoativo adsorvido à superfície polimérica (SHAFFAZICK et al., 2003).

A Tabela 18 mostra que os componentes que mais contribuíram para o aumento do percentual de encapsulação foram o AABMM (100 ± 3 %), ACBMM (100 ± 3 %), TWEEN (101 ± 3 %) e AAAMM (101 ± 3 %), pois estes possuem os maiores coeficientes. Apesar das diferentes características dos amidos hidrolisados adsorvidos à superfície das nanocápsulas influenciar no percentual de encapsulação, nenhum deles foi capaz de reduzir este teor; exceto o ACAMM empregado na formulação 5 na qual houve decantação da fase orgânica.

Como o erro experimental dos coeficientes foi de ± 3 % não há diferença significativa entre eles. Já quanto as interações, dentre as 4 testadas nenhuma foi significativa ($p > 0,01$). O ACAMM foi o que apresentou menor contribuição para o aumento do percentual de encapsulação (18 ± 3 %). A Figura 47 mostra os efeitos dos amidos hidrolisados sobre o percentual de encapsulação.

Figura 47 – Efeito sobre o percentual de encapsulação.

O modelo indicou que a variação da fração molar do tensoativo da fase aquosa representa 97,8 % do efeito sobre o percentual de encapsulação observado. Já no teste da ANOVA foram obtidos valores de F igual a 232,24 para o modelo linear e 8,19 para o modelo quadrático, descartando a validade das interações. O modelo também apresentou um valor de p igual a 0,000, confirmando que este modelo também foi significativo. A Figura 48 mostra a validade do modelo em relação aos dados experimentais.

Figura 48 – Dados experimentais versus calculados para o percentual de encapsulação.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados na cinética de polimerização da PCL, a partir de um modelo matemático, é possível obter lotes de mesma massa molar ponderal média ($\overline{Mw}$) com um intervalo de confiança de 95 %; considerando temperatura e proporção mássica de monômero e iniciador constantes.

Neste trabalho também foram avaliadas as características e propriedades do lote final de PCL, como presença dos grupos típicos de um éster, pureza, temperaturas de transição, as quais demonstraram-se de acordo com a literatura e com o próprio polímero, porém obtido comercialmente.

Com relação à hidrólise enzimática, esta mostrou-se eficiente na redução de ($\overline{Mw}$) de todos os amidos estudados. Entretanto, baseado nos testes de tensão superficial, somente os AABMM e ACBMM apresentaram capacidade tensoativa, pois reduziram significativamente a tensão superficial da água; caracterizando-se, assim, como agentes ativos de superfície.

A capacidade tensoativa dos amidos AABMM e ACBMM foi confirmada ao empregá-los nas formulações de nanocápsulas poliméricas baseados nos valores de diâmetro, polidispersidade e teor de encapsulação. Ou seja, com a introdução destes amidos nas formulações (nas proporções estudadas 0,1-1,0 %) não houve mudança significativa nas propriedades das nanocápsulas, principalmente com relação à estabilidade coloidal das mesmas, apenas confirmando que estes amidos hidrolisados podem ser utilizados como tensoativos.

Na quantificação do ativo encapsulado foi desenvolvida uma técnica mais barata, a qual evitou o emprego de outras técnicas como: HPLC, ultrafiltração, ultracentrifugação e o uso de solventes com grau apropriado.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-ROMÁN, R. et al. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 191-195, 2001.
- ALVAREZ-ROMÁN, R. et al. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 53-62, 2004.
- ALVES, M. P. et al. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215-220, 2007.
- ALVES, S. S. **Síntese de poli(ésteres-uretanos) à base de poliois de poli(hidroxibutirato) e poli(caprolactona)**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- ARAKI, K. Estratégia supramolecular para a nanotecnologia. **Química Nova**, v. 30, p. 1484-1490, 2007.
- ASBILL, C. S.; MICHNIAK, B. B. Percutaneous penetration enhancers: local *versus* transdermal activity. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, p. 36-41, 2000.
- ASTM D 1331 - 1956. Disponível em: <<http://www.astm.org>> Acesso em: 15/dez./ 2010.
- AVGOUSTAKIS, K. et al. Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, *in vitro* stability, and biodistribution of PLGA-m-PEG nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 259, p. 115-127, 2003.
- BARAKAT, I. et al. Poly(epsilon-caprolactone-beta-glycolide) and poly(D,L-lactide-beta-glycolide) diblock copolyesters: controlled synthesis, characterization, and colloidal dispersions. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 30, p. 294-306, 2001.
- BARRIOS, J. G. **Desenvolvimento e caracterização de suspensões contendo nanocápsulas de adapaleno com diferentes núcleos oleosos**. 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado em Nanociências) - Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, 2010.
- BENDIX, D. Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical application. **Polymers Degradation and Stability**, v. 59, p. 129-135, 1998.
- BHAVSAR, D. M.; TIWARI, S. B.; AMIJL, M. M. Formulation optimization for the nanoparticles-in-microsphere hybrid oral delivery system using factorial design. **Journal of Controlled Release**, v. 110, p. 422-430, 2006.

BHOSALE, R.; SINGHAL, R. Process optimization for the synthesis of octenyl succinyl derivative of waxy corn and amaranth starches. **Carbohydrate Polymers**, p. 521-527, 2006.

BILOTI, D. N. et al. Photochemical behavior under UVA radiation of β -cyclodextrin included Parsol[®]1789 with a chemometric approach. **Journal of Molecular Structure**, v. 480-481, p. 557-561, 1999.

BOUCHEMAL, K. et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241-245, 2004.

BUDHIAN, A.; SIEGEL, S. J.; WINEY, K. I. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 336, p. 367-375, 2007.

CANEVAROLO, S. V. J. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2007.

CASTRO, M. L. **Copolímeros estatísticos biodegradáveis de ϵ -caprolactona e L,L-dilactídeo - Síntese, caracterização e propriedades**. 2006. 134 f. Tese (Doutorado em Engenharia) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CASTRO, M. L.; WANG, S. H. Statistical copolymers of L,L-lactide and ϵ -caprolactone. **Polymer Bulletin**, v. 51, p. 151-158, 2003.

CASWELL, M. Sunscreen formulation and testing. **Cosmetics and Toiletries Magazine**, v. 116, p. 49-60, 2001.

CEREDA, M. P. **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargil, 2002, v.3.

CHAMBERLAIN, B. M. et al. The controlled polymerization of D,L-lactide and ϵ -caprolactone by structurally well-defined alkoxo-bridged di- and triyttrium (III) complexes. **Macromolecules**, v. 33, p. 3970-3977, 2000.

CHISHOLM, M. H. et al. Molecular design of single metal alkoxide catalyst precursors for ring-opening polymerization on reactions leading to polyoxygenerates. 1. Polylactide formation by achiral and chiral magnesium and zinc alkoxides, (η -3-L)MOR, where L = trispyrazolyl and trisindazolyborate ligands. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, p. 11845-11854, 2000.

CHISVERT, A.; SALVADOR, A.; PASCUAL-MARTÍ, M. C. Simultaneous determination of oxybenzone and 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate in sunscreen formulations by flow injection-isodifferential derivative ultraviolet spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 428, p. 183-190, 2001.

CITERNESI, U. Photostability of sun filters complexed in phospholipids or beta-cyclodextrin. **Cosmetics and Toiletries Magazine**, v. 116, p. 77-86, 2001.

CORDEIRO, C. A. M.; MARTINS, M. L. L.; LUCIANO, A. B. Production and properties of α -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 57-61, 2002.

COSTA NETO, B. P. **Desenvolvimento de sistemas micro e nanoestruturados de quitosana/MDI para aplicações cosméticas**. 2009. 124 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

COULEMBIER, O. et al. From controlled ring-opening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: essentially poly(β -malic acid) derivatives. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 723-747, 2006.

DAVIS, H. T. Factors determining emulsion type: Hydrophile-lipophile balance and beyond. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 91, p. 9-24, 1994.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1-10, 2009.

DERAKHSHANDEH, K.; ERFAN, M.; DADASHZADEH, S. Encapsulation of 9-nitrocamptothecin a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: factorial design, characterization and release kinetics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, p. 34-41, 2007.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia - Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber Editora Ltda, 2006.

ENGELSTEIN, M. Veja na sala de aula. **Veja**, 2006. Disponível em: <<http://veja.abril.com.br/saladeaula>>. Acesso em: 15/fev/2009.

FENG, S. S.; HUANG, G. Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol[®]) from nanospheres of biodegradable polymers. **Journal of Controlled Release**, v. 71, p. 53-69, 2001.

FERNANDEZ, C. et al. LC analysis of benzophenone-3: II Application to determination of "in vitro" and "in vivo" skin penetration from solvents, coarse and submicron emulsions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 155-165, 2000.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. R1-R4, 1989.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P. **Procédé de preparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance sous forme de nanocapsules**. 0274961A1, 1988.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores Solares. **Química Nova**, v. 30, p. 153-158, 2007.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **PSTT**, v. 3, p. 417-425, 2000.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis - uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, p. 811-816, 2006.

GALINDO-RODRIGUES, S. et al. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 1428-1439, 2004.

GONZÁLEZ, H. et al. Percutaneous adsorption of the sunscreen benzophenone-3 after repeated whole-body applications, with and without ultraviolet irradiation. **Photobiology**, v. 154, p. 337-340, 2006.

GONZÁLEZ, H.; FARBROT, A.; LARKO, O. Percutaneous absorption of benzophenone-3, a common component of topical sunscreens. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 27, p. 691-694, 2002.

GOVENDER, T. et al. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 199, p. 95-110, 2000.

GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agents by HLB. **Journal of the Society of Cosmetics Chemists**, v. 1, p. 311-326, 1949.

GUARATINI, T. et al. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. **Química Nova**, v. 32, p. 717-721, 2009.

GUTERRES, S. S. et al. Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, p. 57-63, 1995.

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.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

HAYDEN, C. G. J.; BENSON, H. A. E.; ROBERTS, M. S. Systemic adsorption of sunscreen after topical administration. **The Lancet**, v. 350, p. 863-864, 1997.

HOFFAMANN, F. et al. Preparation, characterization and cytotoxicity of methylmethacrylate copolymer nanoparticles with a permanent positive surface charge. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 157, p. 189-198, 1997.

HOLMQUIST, L. et al. Lipoic acid as a novel treatment for Alzheimer's disease and related dementias. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 113, p. 154-164, 2007.

HORISAWA, E. et al. Size-dependency of D,L-lactide/glycolide copolymer particles for intra-articular delivery system on phagocytosis in rat synovium. **Pharmaceutical Research**, v. 19, p. 132-139, 2002.

JENSEN, S. **Emulsificantes com diferentes EHL (Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico) em filmes de amido de mandioca**. 2007. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

JEON, H.-J. et al. Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 207, p. 99-108, 2000.

JIMÉNEZ, M. M. et al. Influence of encapsulation on the vitro percutaneous absorption of actyl methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 272, p. 45-55, 2004.

KAYSER, O.; LEMKE, A.; HERNÁNDEZ-TREJO, N. The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 6, p. 3-5, 2005.

KREUTER, J. Nanoparticles - a historical perspective. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, p. 1-10, 2007.

KRICHELDORF, H. R. Synthesis and application of polylactides. **Chemosphere**, v. 43, p. 49-54, 2001.

KRICHELDORF, H. R.; KREISER-SAUNDERS, I. Polylactones 49: Bu₄Sn-initiated polymerizations of ε-caprolactone. **Polymer**, v. 41, p. 3957-3963, 2000.

KRSTONOSIC, V.; DOKIC, L.; MILANOVIC, J. Micellar properties of OSA starch and interaction with xanthan gum in aqueous solution. **Food Hydrocolloids**, p. 361-367, 2011.

KÜHN, I.; SCHUHMACHER, R. **Polymer dispersions containing starch**. 6835767B2, 2004.

KÜLKAMP, I. C. et al. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, v. 32, p. 2078-2084, 2009.

LAUTENSCHLAGER, S.; WULF, H. C.; PITTELKOW, M. R. Photoprotection. **The Lancet**, v. 370, p. 528-537, 2007.

LBOUTOUNNE, H. et al. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(ε-caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. **Journal of Controlled Release**, v. 82, p. 319-334, 2002.

LEHMANN, A. et al. Starch based thickening agents for personal care and surfactants systems. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 331, p. 150-154, 2008.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2^a. ed. São Paulo: Simões AA, 1995.

LUPPI, B. et al. Polymeric nanoparticles composed of fatty acids polyvinylalcohol for topical application of sunscreens. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 407-411, 2003.

MAIER, H. et al. Change of ultraviolet absorbance of sunscreens by exposure to solar-simulated radiation. **The Journal of Invertigative Dermatology**, v. 117, p. 256-262, 2001.

MAIER, H. et al. Ultraviolet protective performance of photoprotective lipsticks: change of spectral transmittance because of ultraviolet exposure. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 21, p. 84-92, 2005.

MAIER, T.; KORTING, H. C. Sunscreens - wich or what for? **Skin Pharmacology and Pysiology**, v. 18, p. 253-262, 2005.

MILESI, S. S.; GUTERRES, S. S. Fatores determinantes da eficácia de fotoprotetores. **Caderno de Farmácia**, v. 18, p. 81-87, 2002.

MILLIKAN, L. E. Adapaleno: Actualización de los últimos estudios de comparación de los distintos retinoides. **Farmacología y Terapéutica**, v. 4, p. 29-34, 2001.

MONDAL, N. et al. Effect of different formulation variables on some particle characteristics of poly(D,L-lactide-co-glicolide) nanoparticles. **Pharmaceutical Society Japan**, v. 128, p. 595-601, 2008.

MONTEIRO, M. S. S. B. **Filtros solares em nanocosméticos: desenvolvimento e avaliação da segurança e eficácia**. 2008. 164 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universide Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

MORAES, C. M. **Preparo, caracterização físico-química e avaliação da estabilidade de nanopartículas poliméricas contendo anestésicos locais**. 2009. 119 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

MOSQUEIRA, V. C. F. et al. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 89, p. 614-626, 2000.

MU, L.; FENG, S.-S. Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol[®]). **Journal of Controlled Release**, v. 80, p. 129-144, 2002.

MULLER, C. R. et al. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. **Química Nova**, v. 27, p. 555-560, 2004.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 762-798, 2007.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos - Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 1ª. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2001.

NILSSON, L.; BERGENSTÅHL, B. Adsorption of hydrophobically modified starch at oil/water interfaces during emulsification. **Langmuir**, v. 22, p. 8770-8776, 2006.

NILSSON, L.; BERGENSTÅHL, B. Emulsification and adsorption properties of hydrophobically modified potato and barley starch. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1469-1474, 2007.

O'KEEFE, B. J. et al. Rapid and controlled polymerization of lactide by structurally characterized ferric alkoxides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, p. 339-340, 2001.

OKEREKE, C. S.; BARAT, S. A.; ABDEL-RAHMAN, M. S. Safely evaluation of benzophenone-3 after dermal administration in rats. **Toxicology Letters**, v. 80, p. 61-67, 1995.

OLVERA-MARTÍNEZ, B. et al. Preparation of polymeric nanocapsules containing octyl methocinnamate by the emulsification-diffusion technique: penetration across the stratum corneum. **Journal of Pharmaceutis Sciences**, v. 994, p. 1552-1559, 2005.

PAESE, K. **Desenvolvimento tecnológico, estudo da fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea *in vitro* da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos**. 2008. 185 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

PAOLA, M. V. Princípios de formulações de protetores solares. **Cosmetics and Toiletries**, v. 13, p. 74-81, 2001.

PICOS, D. R. et al. Microesferas biodegradables de liberación controlada para administración parenteral. **Revista Cubana de Farmácia**, v. 34, p. 70-77, 2000.

POHLMANN, A. R. et al. Structural model of polymeric nanospheres containing indomethacin ethyl and in vivo antiedematogenic activity. **International Journal of Nanotechnology**, v. 4, p. 454-467, 2007.

POHLMANN, A. R. et al. **Tópicos em nanociência e nanotecnologia**. 1ª. ed. Porto Alegre: UFRGS Editora, 2008.

QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. Preparation techniques and mechanism of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p. 1113-1128, 1998.

RAWAT, M. et al. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1790-1798, 2006.

REIS, C. P. et al. Nanoencapsulation I: Methods preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2, p. 8-21, 2006.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos - Uma estratégia sequencial de planejamentos**. 1ª. ed. Campinas: Casa do Pão, 2005.

ROGGIA, I. **Avaliação da estabilidade, liberação e permeação cutânea de nanocápsulas contendo benzofenona-3**. 2009. 134 f. Dissertação (Mestrado em Nanociências) - Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, 2009.

RONA, C.; VAILATI, F.; BERARDESCA, E. The cosmetice treatment of wrinkles. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 3, p. 26-34, 2004.

ROSSO, J. Q. D. Topical Retinoid Therapy. **Skin & Aging**, v. 10, p. 50-62, 2002.

RYNER, M. et al. Mechanism of ring-opening polymerization of 1,5-dioxepan-2-one and L-lactide with stannous 2-ethylhexanoate. A theoretical study. **Macromolecules**, v. 34, p. 3877-3881, 2001.

SANTANDER-ORTEGA, M. J. et al. Nanoparticles made from novel starch derivatives for transdermal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 141, p. 85-92, 2010.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Química Nova**, v. 25, p. 1181-1185, 2002.

SANTOS, V. M. **Preparação de filtros solares em nanosistema visando à maior proteção**. 2007. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S. et al. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, p. 71-80, 2000.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 21, p. 99-106, 2002.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos para a administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SCHULZ, J. et al. Distribution of sunscreen on skin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 157-163, 2002.

SILVA, G. O. et al. Características físico-químicas de amidos modificados de grau alimentício comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 188-197, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7^a. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos - LTC, 2006.

SIMEONI, S. et al. Influence of cyclodextrin complexation on the *in vivo* human skin penetration and retention of the sunscreen agent, oxybenzone. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 54, p. 275-282, 2006.

SINHA, V. R. et al. Poly(ϵ -caprolactone) microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 1-23, 2004.

SIQUEIRA, N. M. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação da penetração cutânea de benzofenona-3 a partir de nanocápsulas revestidas com quitosana**. 2008. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SLOMKOWSKI, S.; SOSNOWSKI, S.; GADZINOWSKI, M. Polyesters from lactides and ϵ -caprolactone. Dispersion polymerization versus polymerization in solution. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 153-160, 1998.

SOMA, C. E. et al. Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and cyclosporin A in polyalkylcyanoacrylate nanoparticles. **Biomaterials**, v. 21, p. 1-7, 2000.

SONAJE, K. et al. Development of biodegradable nanoparticles for oral delivery of ellagic acid and evaluation of their antioxidant efficacy against cyclosporine: A induced nephrotoxicity in rats. **Pharmaceutical Research**, v. 24, p. 899-908, 2007.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

TESCH, S.; GERHARDS, C.; SCHUBERT, H. Stabilization of emulsions by OSA starches. **Journal Food Engineering**, v. 54, p. 167-174, 2002.

THORNHIL, M. H. The sun, the ozone layer and the skin: the role of ultraviolet light in lip and skin cancer. **Dental Update**, v. 20, p. 236-240, 1993.

URBACH, F. the historical aspects of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 64, p. 99-104, 2001.

VAN NATTA, F. J.; HILL, J. W.; CAROTHE, W. H. Studies of polymerization and ring formation, ϵ -caprolactone and its polymers. **Journal of American Chemical Society**, v. 56, p. 455-459, 1934.

VARONA, S.; MARTÍN, A.; COCERO, M. J. Formulation of a natural biocide based on lavandin essential oil by emulsification using modified starches. **Chemical Engineering and Processing**, v. 48, p. 1121-1128, 2009.

VAUTHIER, C. et al. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 519-548, 2003.

WEISS-ANGELI, V. **Desenvolvimento e caracterização de formulações fotoprotetoras contendo nanocápsulas**. 2007. 208 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

WISSING, S. A.; MULLER, R. H. Cosmetic application for solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, p. 65-68, 2003.

WOLF, R. et al. Sunscreens. **Clinics in Dermatology**, v. 19, p. 452-459, 2001.

XIE, W. et al. Lithium chloride as catalyst for the ring-opening polymerization of lactide in the presence of hydroxyl containing compounds. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 37, p. 3486-3491, 1999.

YESUDIAN, P. D. Severe contact urticaria and anaphylaxis from benzophenone-3 (2-hidroxy 4-methoxy benzophenone). **Contact Dermatitis**, v. 46, p. 55-56, 2002.

YOO, H. S. et al. Biodegradable nanoparticles containing doxorubicin-PLGA conjugate for sustained release. **Pharmaceutical Research**, v. 16, p. 1114-1118, 1999.

YUSOFF, A.; MURRAY, B. S. Modified starch granules as particle-stabilizers of oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, p. 42-55, 2011.

ŽOLDÁKOVÁ, A. et al. Biosurfactants based on partially esterified *o*-(carboxymethyl) starch. **Chemical Papers**, p. 362-367, 2005.

ANEXO A

Cromatogramas da cinética de polimerização da PCL

- Amostra de 45 minutos

- Amostra de 90 minutos

- Amostra de 120 minutos

- Amostra de 150 minutos

- Amostra de 180 minutos

ANEXO B

CROMATOGRAMAS DOS AMIDOS ANIÔNICOS HIDROLISADOS

- Experimento 1

- Experimento 2

- Experimento 3

- Experimento 4

- Experimento 5

- Experimento 6

- Experimento 7

CROMATOGRAMAS DOS AMIDOS CATIÔNICOS HIDROLISADOS

- Experimento 1

- Experimento 2

- Experimento 3

- Experimento 4

- Experimento 5

- Experimento 6

- Experimento 7