

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Nanocápsulas poliméricas: controle da arquitetura supramolecular e
avaliação da permeação cutânea em pele de porco

TAINÁ LENZ DE BRUM

PORTO ALEGRE, 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nanocápsulas poliméricas: controle da arquitetura supramolecular e
avaliação da permeação cutânea em pele de porco

Dissertação apresentada por **Tainá Lenz de
Brum** para obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

PORTO ALEGRE, 2011.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 21.03.2011, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Solange Cristina Garcia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Zaine Teixeira Camargo
Universidade Federal de Sergipe

B893n	Brum, Tainá Lenz de Nanocápsulas poliméricas: controle da arquitetura supramolecular e avaliação da permeação cutânea em pele de porco / Tainá Lenz de Brum. – Porto Alegre: UFRGS, 2011. – xxvi, 75 p.: il. Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. 1. Nanocápsulas. 2. Penetração cutânea. 3. Corantes fluorescentes. I. Pohlmann, Adriana Raffin. II. Título. CDU: 615.4
-------	--

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Este trabalho foi realizado nos laboratórios de Micro e Nanopartículas Aplicadas na Terapêutica (Instituto de Química/ UFRGS), de Sistemas Nanoestruturados para a Administração de Fármacos (Faculdade de Farmácia/ UFRGS) e no Centro de Microscopia Eletrônica (Projeto CNANO). A aluna recebeu bolsa CAPES.

Aos meus pais Paulo e Beti
e aos meus irmãos Tiago e Rafael.

AGRADECIMENTOS

À professora Adriana Raffin Pohlmann, pela orientação, ensinamentos, paciência e confiança depositada.

À professora Sílvia Stanisçuaski Guterres pela colaboração, ajuda, por disponibilizar seu laboratório e por ter me apresentado à profa. Adriana.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pela oportunidade.

A CAPES, órgão financiador da bolsa de pesquisa, e a Rede de Nanocosméticos (CNPq) pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

A todos os colegas do laboratório K204, em especial Catiúscia Padilha, Rossana Friedrich, Stela Ferrarini, Fernanda Poletto e Bruna Donida pela companhia, amizade e discussões produtivas.

Aos colegas do laboratório 405 pela receptividade e amizades ali cultivadas.

Às minhas amigas e colaboradoras Renata Contri e Luana Fiel que participaram na parte final deste trabalho.

Às minhas amigas da faculdade, Márcia Toniolo, Tatiana Von Diemen e Katiane Santin.

À minha prima querida Letícia Sfair pela amizade desde que nasci e pelo incentivo.

E principalmente à minha família, em especial meus pais, Paulo e Beti, pelo amor incondicional, incentivo constante e por sempre apoiarem meus estudos. Aos meus irmãos Tiago e Rafael pelo incentivo, carinho e paciência.

RESUMO

O objetivo principal deste trabalho foi determinar se a penetração cutânea de nanocápsulas em pele de porco seria dependente da arquitetura supramolecular dos nanocarreadores. Para isso, primeiramente, tentou-se desenvolver nanocápsulas com diferentes distribuições de tamanho através do método emulsificação-difusão. Como isto não foi possível, optou-se por desenvolver nanocápsulas poliméricas e de núcleo lipídico (contendo monoestearato de sorbitano) com polímero covalentemente ligado a rodamina B através do método de deposição interfacial de polímero pré-formado. As suspensões (LNC_L e NC_L) foram obtidas utilizando poli(ε-caprolactona) como parede polimérica e triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (TCC) (NC_L) ou monoestearato de sorbitano e TCC (LNC_L) como núcleo e, posteriormente, foram caracterizadas quanto a distribuição de tamanhos por difração de laser e espectroscopia de correlação de fótons. As nanocápsulas apresentaram diâmetro médio de partículas 176 e 170 nm (SPAN<2,0) para LNC_L e NC_L, respectivamente, por difração de laser, e 182 e 179 nm (PDI<0,1) para LNC_L e NC_L, respectivamente, por espectroscopia de correlação de fótons. Após experimento de penetração cutânea *in vitro* em pele de porco observou-se, por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) que as NC_L foram capazes de penetrar mais profundamente através da pele, enquanto que as LNC_L permaneceram nas camadas mais superiores. Em conclusão, estes resultados são promissores na aplicação de nanocápsulas para fins cosméticos onde poder-se-ia modular a penetração cutânea, pelo uso de nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) para efeito reservatório na epiderme ou diminuindo a concentração de monoestearato de sorbitano para modular a penetração em camada planejada da pele.

Palavras-chaves: nanocápsulas, penetração cutânea e corantes fluorescentes.

Polymeric nanocapsules: supramolecular architecture control and skin penetration evaluation in pig skin.

ABSTRACT

The main purpose of this study was to determine whether skin penetration of nanocapsules into pig skin would be dependent on the supramolecular architecture of the nanocarriers. For this, first, we tried to develop nanocapsules with different size distributions through emulsification-diffusion method. As this was not possible, we chose to develop polymeric nanocapsules and lipid core nanocapsules (containing sorbitan monostearate) with polymer covalently labeled with rhodamine B through interfacial deposition of preformed polymer method. The suspensions (LNC_L and NC_L) were obtained using poly(ϵ -caprolactone) as polymeric wall and capric/caprylic triglycerids (CCT) (NC_L), or sorbitan monostearate and TCC (LNC_L) as the core, and subsequently they were characterized the size distribution by laser diffraction and photon correlation spectroscopy. Nanocapsules showed an average diameter of particles 176 and 170 nm (SPAN <2.0) for LNC_L and NC_L, respectively, by laser diffraction, and 182 and 179 nm (PDI <0.1) for LNC_L and NC_L, respectively, by spectroscopic photon correlation. After skin penetration *in vitro* experiment in pig skin, the confocal laser scanning microscopy (CLSM) images showed that NC_L was able to penetrate more deeply through the skin, while LNC_L remained in the outer layers. In conclusion, these results are promising for the use of nanocapsules for cosmetic purposes which would be able to modulate the skin penetration, the use of lipid core nanocapsules (LNC) for reservoir effect on skin or decreasing the concentration of sorbitan monostearate to modulate the penetration on planned skin layer.

Keywords: nanocapsules, skin penetration and fluorescent dyes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da interpretação dos fenômenos de instabilidade analisados por espalhamento múltiplo de luz empregando o equipamento Turbiscan Lab®.....	31
Figura 2. Esquema das reações para obtenção do polímero marcado.....	38
Figura 3. Curva analítica da rodamina B para quantificação do corante ligado a PCL.....	39
Figura 4. Gráficos de distribuição de tamanho das formulações NC _{95-BZ3} (esquerda) e NC _{175-BZ3} (direita) por volume (a) e (c) e por número (b) e (d)....	40
Figura 5. Gráficos de distribuição de tamanho da NC ₆₅ (esquerda) e NC ₁₉₀₋₁₆₅ (direita) por volume (a) e (c) e por número (b) e (d).....	41
Figura 6. Gráficos de distribuição de tamanho da NC ₁₉₀₋₁₂₀ (topo), NC ₁₉₀₋₁₀₀ (meio) e NC ₁₉₀₋₈₅ (base) por volume (a), (c) e (e) e por número (b), (d) e (f)....	42
Figura 7. Gráficos de distribuição de tamanho da MC ₂₀₄₋₁₀₀ por volume (a) e por número (b).....	42
Figura 8. Gráficos de distribuição de tamanho da MC ₂₀₄₋₇₀ (direita) e NC _{204-Et40} (esquerda) por volume (a), (c) e por número (b) e (d).....	45
Figura 9. Gráficos de distribuição de tamanho da NC _{204-Et30} por volume (a) e por número (b).....	46
Figura 10. Gráficos de distribuição de tamanho da MC ₁₇₅ por volume (a) e por número (b).....	47
Figura 11. Gráficos de distribuição de tamanho da MC _{94-Et30} (esquerda) e MC _{94-Et05} (direita) por volume (a) e (c) e por número (b) e (d).....	48
Figura 12. Gráficos de distribuição de tamanho da MC ₉₄₋₂₀ (esquerda) e MC ₉₄₋₁₆ (direita) por volume (a) e (c) e por número (b) e (d).....	48
Figura 13. Gráficos de distribuição de tamanho da MC _{94-16RoB} por volume (a) e por número (b).....	49
Figura 14. Gráficos de distribuição de tamanho da NC ₁ (esquerda) e NC ₂ (direita) por volume (a) e (c) e por número (b) e (d).....	50
Figura 15. Gráficos de distribuição de tamanho da NC ₃ (esquerda) e NC _{4-RoB} (direita) por volume (a) e (c) e por número (b) e (d).....	51

Figura 16. Gráficos de distribuição de tamanho da NC _{4-RoB} por intensidade (a), por volume (b) e por número (c).....	52
Figura 17. Gráficos de distribuição de tamanho da NC ₅ (topo), LNC _{1-RoB} (meio) e LNC ₁ (abaixo) por volume (a), (c) e (e) e por número (b), (d) e (f).....	53
Figura 18. Gráficos de distribuição de tamanho da LNC _B por volume (a) e por número (b).....	54
Figura 19. Gráficos de distribuição de tamanho da NC _B por volume (a) e por número (b).....	55
Figura 20. Gráficos de distribuição de tamanho da LNC _L por volume (a) e por número (b).....	56
Figura 21. Gráficos de distribuição de tamanho da LNC _L por intensidade (a), volume (b) e número (c).....	56
Figura 22. Gráficos de distribuição de tamanho da NC _L por volume (a) e por número (b).....	57
Figura 23. Gráficos de distribuição de tamanho da NC _L por intensidade (a), volume (b) e número (c).....	58
Figura 24. Perfil de retroespalhamento da NC ₁₉₀₋₁₆₅ . O menisco está marcado na linha traçada em 43,1 mm.....	60
Figura 25. Perfil de retroespalhamento da NC ₁₉₀₋₁₂₀ . O menisco está marcado na linha traçada em 42,7 mm.....	60
Figura 26. Perfil de retroespalhamento da NC ₁₉₀₋₈₅ . O menisco está marcado na linha traçada em 41,5 mm.....	60
Figura 27. Perfil de retroespalhamento da NC ₁₉₀₋₁₀₀ . O menisco está marcado na linha traçada em 41,8 mm.....	60
Figura 28. Perfil de retroespalhamento da MC ₂₀₄₋₁₀ . O menisco está marcado na linha traçada em 16,3 mm.....	61
Figura 29. Imagens 2D (A e C) (barra 50 μm) e 3D (B e D) da epiderme de pele de porco no microscópio confocal de varredura a laser das LNC _L em profundidade (X,Z) e aumento 10X. As flechas amarelas mostram a penetração dos nanocarreadores nas camadas da pele.....	62
Figura 30. Imagens 2D (E e G) (barra 50 μm) e 3D (F e H) da epiderme de pele de porco no microscópio confocal de varredura a laser das NC _L em	

profundidade (X,Z) e aumento 10X. As flechas amarelas mostram a penetração dos nanocarreadores nas camadas da pele..... 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das formulações de MC.....	25
Tabela 2. Composição das formulações contendo lipoid® 75 e benzofenona-3.....	27
Tabela 3. Composição das formulações de NC.....	28
Tabela 4. Composição das formulações de NCL.....	29
Tabela 5. Valores obtidos por difração de laser.....	43
Tabela 6. Número de Reynolds.....	44
Tabela 7. Valores obtidos por difração de laser.....	44
Tabela 8. Valores obtidos por espalhamento de luz dinâmico.....	52
Tabela 9. Valores obtidos por difração de laser.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCL: poli(ϵ -caprolactona)

TCC: triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico

P80: polissorbato 80

Span 60[®]: monoestearato de sorbitano

BZ3: benzofenona-3

PVA: álcool polivinílico

PCL-RB: rodamina B ligada a poli(ϵ -caprolactona)

CLSM: microscopia confocal de varredura a laser

DMAP: *N,N*-dimetilaminopiridina

EDCI: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EHL: equilíbrio hidrofílico-lipofílico

MC: microcápsulas poliméricas

MC₂₀₄₋₇₀: microcápsulas preparadas com velocidade de cisalhamento de 20450 rpm e 70 mg/mL de PVA

MC₂₀₄₋₁₀₀: microcápsulas preparadas com velocidade de cisalhamento de 20450 rpm e 100 mg/mL de PVA

MC₁₇₅: microcápsulas preparadas com velocidade de cisalhamento de 17500 rpm

MC_{94-Et30}: microcápsulas preparadas com velocidade de cisalhamento de 9400 rpm e 30% de etanol

MC_{94-Et5}: microcápsulas preparadas com velocidade de cisalhamento de 9400 rpm e 5% de etanol

MC₉₄₋₂₀: microcápsulas preparadas com velocidade de cisalhamento de 9400 rpm e 20 μ L/mL de TCC

MC₉₄₋₁₆: microcápsulas preparadas com velocidade de cisalhamento de 9400 rpm e 16 μ L/mL de TCC

MC_{94-16RoB}: microcápsulas preparadas com velocidade de cisalhamento de 9400 rpm e 16 μ L/mL de TCC saturado com RoB

NC: nanocápsulas poliméricas

NC_{95-BZ3}: nanocápsulas preparadas com velocidade de cisalhamento de 9500 rpm e BZ3

NC_{175-BZ3}: nanocápsulas preparadas com velocidade de cisalhamento de 17500 rpm e BZ3

NC₆₅: nanocápsulas preparadas com velocidade de cisalhamento de 6500 rpm

NC₁₉₀₋₁₆₅: nanocápsulas preparadas com velocidade de cisalhamento de 19000 rpm e 1650 μ L de TCC

NC₁₉₀₋₁₂₀: nanocápsulas preparadas com velocidade de cisalhamento de 19000 rpm e 1200 μ L de TCC

NC₁₉₀₋₁₀₀: nanocápsulas preparadas com velocidade de cisalhamento de 19000 rpm e 1000 μ L de TCC

NC₁₉₀₋₈₅: nanocápsulas preparadas com velocidade de cisalhamento de 19000 rpm e 850 μ L de TCC

NC_{204-Et40}: nanocápsulas preparadas com velocidade de cisalhamento de 20450 rpm e 40% de etanol

NC_{204-Et30}: nanocápsulas preparadas com velocidade de cisalhamento de 20450 rpm e 30% de etanol

NC₁: nanocápsulas poliméricas preparadas com 2 mg/mL de P80 e 20 μ L/mL de TCC.

NC₂: nanocápsulas poliméricas preparadas com 2 mg/mL de P80 e 10 μ L/mL de TCC.

NC₃: nanocápsulas poliméricas preparadas com 16 mg/mL de P80 e 16 μ L/mL de TCC.

NC_{4-RoB}: nanocápsulas poliméricas preparadas com 16 mg/mL de P80 e 16 μ L/mL de TCC saturado com RoB.

NC₅: nanocápsulas poliméricas preparadas com 8 mg/mL de P80 e 16 μ L/mL de TCC.

NC_B: nanocápsulas poliméricas preparadas com PCL Mw 14000 e 114000 g/mol

NC_L: nanocápsulas poliméricas com polímero marcado e PCL 114000 g/mol

LNC: nanocápsulas de núcleo lipídico

LNC_{1-RoB}: nanocápsulas de núcleo lipídico com 16 μ L/mL de TCC saturado com RoB

LNC₁: nanocápsulas de núcleo lipídico com 16 μ L/mL de TCC

LNC_B: nanocápsulas de núcleo lipídico preparadas com PCL Mw 14000 e 114000 g/mol

LNC_L: nanocápsulas de núcleo lipídico com polímero marcado e PCL 114000 g/mol

RoB: Rodamina B

NC_{215-Et30}: nanocápsulas poliméricas com velocidade de cisalhamento de 21500 rpm e 30% de etanol

PCS: espectroscopia de correlação de fótons

BS: retroespalhamento de luz

SPAN: polidispersão

PDI: índice de polidispersão

R²: coeficiente de determinação

r: coeficiente de correlação

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	01
2.	OBJETIVOS.....	05
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	09
3.1	Nanopartículas, nanocápsulas poliméricas e nanocápsulas de núcleo lipídico.....	11
3.2	Nanopartículas poliméricas, permeação cutânea e sondas fluorescentes.....	14
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1	Materiais.....	19
4.1.1	Matérias-primas.....	19
4.1.2	Aparelhos e Equipamentos.....	19
4.1.3	Solventes.....	21
4.2	Métodos.....	22
4.2.1	Ligação da rodamina B em poli(épsilon-caprolactona).....	22
4.2.2	Quantificação da Rodamina B (RoB) ligada ao polímero (PCL).....	22
4.2.3	Preparação das microcápsulas (MC) e nanocápsulas (NC).....	23
4.2.3.1	Método 1: Emulsificação-difusão.....	23
4.2.3.2	Método 2: Deposição interfacial de polímero pré-formado.....	24
4.2.4	Cálculo do Número de Reynolds.....	30
4.2.5	Análises de Espalhamento Múltiplo de Luz.....	30
4.2.6	Determinação do diâmetro das partículas e polidispersão.....	31
4.2.7	Viscosidade.....	32
4.2.8	Penetração cutânea <i>in vitro</i>	33
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1	Ligação de rodamina B em poli(épsilon-caprolactona).....	37
5.2	Quantificação da rodamina B (RoB) ligada ao polímero (PCL).....	38
5.3	Preparação das formulações.....	39
5.4	Turbiscan Lab®.....	59
5.5	Permeação cutânea.....	61
6.	CONCLUSÕES.....	65
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o crescimento explosivo da nanotecnologia vem desafiando as inovações na liberação de compostos biologicamente ativos (COUVREUR e col., 2006). O emprego das nanopartículas poliméricas (nanocápsulas e nanoesferas) como sistemas de liberação de fármacos apresenta vantagens resultantes de duas das principais propriedades básicas: i) o tamanho reduzido; ii) a versatilidade dos sistemas, nos quais diversos agentes terapêuticos podem ser encapsulados, dispersos ou dissolvidos (GUTERRES e col., 2007a). Elas têm sido propostas como alternativa para aumentar a penetração de substâncias na pele devido à sua forte interação com a superfície cutânea (SHIM e col., 2004; ALVAREZ-ROMÁN e col., 2004a).

As nanocápsulas para aplicação cutânea são preparadas a partir de um polímero, um ou mais tensoativos e de um óleo biocompatível e apresentam diâmetro entre 100 e 300 nm. Geralmente são preparadas por técnicas de deposição interfacial do polímero pré-formado ou emulsificação-difusão. O mecanismo de formação das nanopartículas para a deposição interfacial ocorre quando a fase orgânica (FO) é vertida na fase aquosa (FA) sob agitação moderada. As nanopartículas são formadas instantaneamente pela rápida difusão do solvente orgânico na FA. Na emulsificação-difusão a FO é emulsificada na FA sob agitação vigorosa nesta fase. A posterior adição de água leva a difusão do solvente para a FA e formação das nanopartículas (MORA-HUERTAS e col., 2010; POLETTO e col., 2009). Estes dois métodos se diferenciam quanto ao número de etapas, onde o primeiro ocorre em 1 etapa e o solvente orgânico é miscível em água. O segundo ocorre em 2 etapas e o solvente orgânico é parcialmente miscível em água. A deposição interfacial apresenta vantagem na obtenção espontânea de partículas com alta eficiência de encapsulação, e a emulsificação-difusão controle de distribuição de diâmetros (MORA-HUERTAS e col., 2010; GUTERRES e col., 2007b; POLETTO e col., 2009).

Dentre os polímeros, a poli(ϵ -caprolactona) é uma das mais utilizadas devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades

mecânicas, enquanto o núcleo oleoso é freqüentemente composto de triglicerídeos (GUTERRES e col., 2007b).

Nanocápsulas de núcleo lipídico foram desenvolvidas nos últimos anos pela adição de monoestearato de sorbitano na formulação de nanocápsulas poliméricas (MÜLLER e col., 2001). A caracterização físico-química dessa nova formulação (MÜLLER e col., 2001; CRUZ e col., 2006) demonstrou que o monoestearato de sorbitano, um tensoativo de baixo EHL, está disperso no triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico (TCC). JÄGER e colaboradores (2009) estabeleceram uma correlação entre a liberação de uma sonda lipofílica nanoencapsulada e a concentração de monoestearato de sorbitano dispersa no núcleo das nanocápsulas. Recentemente FIEL e colaboradores (2010) demonstraram que a presença de monoestearato de sorbitano no núcleo lipídico de nanocarreadores poliméricos modifica as propriedades mecânicas deste sistema tornando-os mais rígidos.

As técnicas experimentais utilizadas para avaliar o mecanismo de interação das partículas com a pele como experimentos de difusão e de análises por microscopia eletrônica, microscopia ótica e fluoromicrografia; apresentam como desvantagem a necessidade de congelamento (criofixação) do tecido, que pode alterar a organização lipídica da pele ou resultar na reorganização da camada. A principal vantagem da microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) é que o tecido pode ser seccionado opticamente permitindo a visualização da distribuição da sonda fluorescente nas camadas (ALVAREZ-ROMÁN e col., 2004a).

Portanto, a hipótese deste trabalho foi verificar se o comportamento de permeação cutânea *in vitro* seria dependente da estrutura supramolecular de nanocápsulas. Desta forma, foram preparadas nanocápsulas poliméricas e nanocápsulas de núcleo lipídico marcadas com corante fluorescente ligado quimicamente ao polímero para a avaliação da permeação cutânea em células de Franz e observação dos cortes de pele de porco através de microscopia confocal de varredura a laser.

2. OBJETIVOS

GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi determinar se a penetração cutânea de nanocápsulas em pele de porco seria dependente da arquitetura supramolecular dos nanocarreadores.

ESPECÍFICOS

- Desenvolver suspensões de nanocápsulas com diferentes distribuições de tamanhos através do método emulsificação-difusão.
- Desenvolver suspensões de nanocápsulas poliméricas e de nanocápsulas de núcleo lipídico, cujo polímero está covalentemente ligado a rodamina B através do método deposição interfacial de polímero pré-formado.
- Avaliar se nanocápsulas poliméricas e nanocápsulas de núcleo lipídico apresentam diferentes características de penetração cutânea empregando-se células de Franz, pele de porco como membrana e microscopia confocal de varredura a laser (CLSM).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Nanopartículas, nanocápsulas poliméricas e nanocápsulas de núcleo lipídico

O controle da liberação de fármacos em sítios de ação específicos, através da utilização de carreadores, capazes de permitir a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias, tem sido uma área de intensa pesquisa. Dentre os carreadores, incluem-se as micropartículas e os sistemas coloidais (lipossomas e nanopartículas) (SCHAFFAZICK e col., 2003).

As nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, têm atraído maior atenção dos pesquisadores em relação aos lipossomas, devido às suas potencialidades terapêuticas, à maior estabilidade nos fluidos biológicos e durante o armazenamento. A nanoencapsulação apresenta vantagens como (a) diminuir os efeitos colaterais de certos fármacos, (b) proteger o fármaco da degradação no trato intestinal (via oral) e na luz (via tópica), (c) aumentar a absorção do fármaco através da difusão facilitada no epitélio, (d) modificar a farmacocinética e perfil de distribuição do fármaco no tecido e/ou (e) melhorar a penetração e distribuição intracelular (COUVREUR e col., 2006; SCHAFFAZICK e col., 2003).

Nanopartículas poliméricas são dispersões particuladas compostas de pelo menos uma fase polimérica com distribuição de tamanhos na faixa nanométrica (COUVREUR e col., 2002). Essas nanopartículas se classificam em nanocápsulas e nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (SCHAFFAZICK e col., 2003). As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica e estabilizadas por tensoativos. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK e col., 2003).

Os métodos utilizados na preparação das nanopartículas poliméricas podem ser baseados na polimerização in situ de monômeros dispersos

(cianoacrilatos de alquila) e precipitação de polímeros pré-formados (GUTERRES e col. 2007a). Atualmente vários métodos estão disponíveis para a preparação de nanopartículas poliméricas utilizando polímeros pré-formados, tais como nanoprecipitação (FESSI e col., 1988) e deposição interfacial de polímeros (FESSI e col., 1989), salting-out (BINDSCHAEDLER e col., 1988; GALINDO-RODRIGUEZ e col., 2004), emulsificação-*evaporação* de solvente (BUDHIAN e col., 2007; BABAK e col., 2007) e emulsificação-*difusão* (LEROUX e col., 1995; QUINTANAR-GUERRERO e col., 1996; QUINTANAR-GUERRERO e col., 1998;). Dentre estes se destacam: o método de deposição interfacial do polímero pré-formado (adaptado do método de nanoprecipitação), descrito por FESSI e colaboradores (1988), e o método de emulsificação-*difusão*, descrito por LEROUX e colaboradores (1995), patenteado e estudado por QUINTANAR-GUERRERO e colaboradores (1996).

A emulsificação-*difusão* é um processo de duas etapas onde uma emulsão convencional O/A é formada usando um solvente parcialmente solúvel em água (QUINTANAR-GUERRERO e col., 1996; MOINARD-CHECOT e col., 2006; POLETTO e col., 2009), que são previamente saturados entre si. A adição posterior de água no sistema provoca *difusão* do solvente para a fase externa, resultando na formação de nanopartículas (MORA-HUERTAS e col., 2010; POLETTO e col., 2009). Esse método apresenta vantagens como possibilidade de controle de distribuição de diâmetros que, recentemente, foi estudado por POLETTO e colaboradores (2008 e 2009), além de alta reprodutibilidade e fácil mudança de escala (*scaling-up*) (QUINTANAR-GUERRERO e col., 1996; MOINARD-CHECOT e col., 2006; POLETTO e col., 2009). Do ponto de vista do consumo de água, este método é sem dúvida uma desvantagem. No entanto, esta condição representa uma vantagem em termos de etapas de purificação (MORA-HUERTAS e col., 2010).

Com relação ao controle de tamanho de nanopartículas, foi descrito por POLETTO e colaboradores (2008) que é possível controlar o diâmetro de nanocápsulas e nanoesferas de PHBV preparadas pelo método emulsificação-*difusão* modificando a proporção da fase orgânica (clorofórmio e etanol). Observou-se que partículas menores (253 a 493 nm) foram obtidas com a proporção 30:70 de clorofórmio:etanol e as partículas maiores (896 a

1568 nm) somente com clorofórmio. Em (2009) os mesmos autores prepararam nanoesferas de PCL com controle de diâmetro através do mesmo método variando a taxa de cisalhamento da emulsão primária, além da proporção da fase orgânica (acetato de etila e etanol). Observou-se as partículas menores (249 nm) foram obtidas com taxa de cisalhamento de 17500 rpm e proporção acetato de etila:etanol (60:40). Por outro lado, as partículas maiores (423 nm) foram obtidas com taxa de cisalhamento de 9500 rpm e somente acetato de etila como fase orgânica.

Através do método deposição interfacial do polímero pré-formado as nanocápsulas são obtidas como uma suspensão coloidal formada quando a fase orgânica é injetada, com agitação moderada, na fase aquosa (MORA-HUERTAS e col., 2010). Os solventes utilizados são miscíveis com a água (exemplo: acetona ou etanol). A vantagem deste método é a obtenção espontânea, de baixo custo, rápida, eficiente e reprodutível de pequenas partículas com alta eficiência de encapsulação (MORA-HUERTAS e col., 2010; GUTERRES e col., 2007b).

Na última década, novos nanocarreadores foram desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, e denominados nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) (MÜLLER e col., 2001; JÄGER e col., 2009; VENTURINI e col., 2011). Estas são compostas por uma dispersão de monoestearato de sorbitano em triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico (TCC), no núcleo, e ao redor uma parede polimérica de poli(ϵ -caprolactona) (PCL). Recentemente JÄGER e colaboradores (2009) verificaram a influência da concentração de monoestearato de sorbitano no núcleo lipídico (TCC) na liberação do éster etílico de indometacina. Neste estudo observou-se que o aumento da viscosidade do núcleo devido ao aumento da concentração de monoestearato de sorbitano diminuiu o fluxo difusional do éster de indometacina. E mais recentemente, FIEL e colaboradores (2010) verificaram que esse aumento de viscosidade modifica as propriedades mecânicas das nanocápsulas modulando o comportamento elástico desses colóides. Assim, poder-se-ia supor que fosse possível modificar as propriedades de deformação das nanocápsulas contendo monoestearato de sorbitano para que essas nanopartículas ficassem mais retidas na superfície da pele, servindo de reservatório.

3.2 Nanopartículas poliméricas, permeação cutânea e sondas fluorescentes

O estrato córneo é a camada mais externa da pele e oferece a principal resistência para a penetração de compostos aplicados topicamente. Diversas são as vantagens da aplicação cutânea de substâncias ativas quando nanoencapsuladas. Entre elas, pode-se citar a diminuição da irritação e alergenicidade cutânea, da fotoinstabilidade e da oxidação do fármaco, bem como a possível diminuição de odores desagradáveis. A liberação controlada pode diminuir a necessidade de aplicações repetidas, bem como aumentar a quantidade de fármaco disponível no local de ação desejado (GUTERRES e col., 2007b).

O grau de penetração e transporte dos nanocarreadores através da pele parecem ser dependente principalmente da composição química dos componentes, no mecanismo de encapsulação, que, por conseqüência, influencia o mecanismo de liberação do fármaco, no tamanho de nanopartículas e, assim como, na viscosidade das formulações (GUTERRES e col., 2007b).

A principal vantagem da microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) sobre as técnicas clássicas para estudar o mecanismo de interação das partículas com a pele (experimentos de difusão e de visualização por microscopia eletrônica, microscopia ótica e fluoromicrografia) é permitir que a distribuição de uma sonda fluorescente em uma amostra biológica seja visualizada em profundidade, sem a necessidade de fixação do tecido e/ou corte. A desvantagem das outras técnicas é a necessidade de congelamento (criofixação) do tecido, que pode alterar a organização lipídica da pele ou resultar na reorganização da camada (ALVAREZ-ROMÁN e col., 2004a).

Nos últimos anos, o encapsulamento de compostos fluorescentes em nanopartículas poliméricas para estudos de permeação cutânea vem sendo amplamente utilizado pelos pesquisadores (ALVAREZ-ROMÁN e col., 2004b; GU e col., 2004; SHIM e col., 2004; RASTOGI e col., 2009; WU e col., 2009a; YOU e col., 2009; ARAYACHUKEAT e col., 2011), quanto à utilização de

polímeros fluorescentes, muitos pesquisadores têm adquirido estas partículas fluorescentes comerciais (ALVAREZ-ROMÁN e col., 2004a; VOGT e col., 2006; GOPEE e col., 2009) ou sintetizado através de ligação química do polímero com a sonda fluorescente. Estes polímeros marcados são utilizados para a visualização da penetração da partícula na pele.

Em 2006, STRACKE e colaboradores estudaram a penetração em pele humana de nanopartículas de PLGA-FA com *Texas red* encapsulado. O PLGA foi covalentemente ligado a fluoresceinamina (FA) através de reação com EDCI. As peles foram analisadas por microscopia multifóton. As imagens mostraram que a partícula (PLGA-FA) permaneceu na superfície e o *Texas red* encapsulado foi liberado no início da permeação. No ano seguinte, LADEMANN e colaboradores empregaram nanopartículas com polímero marcado (PLGA-FA) de 320 nm para avaliar a penetração e o comportamento de nanopartículas contendo sondas fluorescentes nos folículos pilosos.

SHEIHET e colaboradores (2008) investigaram a penetração cutânea de nanoesferas derivadas de tirosina (copolímeros tribloco) contendo vermelho do Nilo (NR) ou 5-dodecanoilaminofluoresceína (DAF) como modelo de fármacos lipofílicos. Os autores concluíram que nanoesferas derivadas de tirosina facilitam o transporte de substâncias lipofílicas para as camadas mais profundas da pele.

WU e colaboradores (2009b) visualizaram a permeação cutânea de nanopartículas de poli(metacrilato de metila) (PMMA) e poliestireno (PS) contendo metacrilato de fluoresceína (FMA) covalentemente ligada através de polimerização em emulsão, juntamente com vermelho do Nilo disperso. As imagens de CLSM mostraram que as nanopartículas ficaram retidas no estrato córneo, localizadas nos sulcos da pele e ao redor dos folículos pilosos e o vermelho do Nilo liberado permeou nas camadas mais profundas da pele. Os mesmos autores utilizaram nanopartículas, sintetizadas por polimerização em emulsão, com dois polímeros variando o grau de hidrofobicidade e vermelho do Nilo disperso para permeação cutânea. As imagens de CLSM mostraram que as partículas ficaram retidas no estrato córneo, mas tiveram afinidade pelos folículos pilosos (WU e col., 2009c).

Adicionalmente, TEIXEIRA e colaboradores (2010) estudaram a permeação através de CLSM, em pele humana, de nanocápsulas de poli(lactideo) marcadas com azul do Nilo e contendo palmitato de retinila. O grupo amina do Azul do Nilo foi covalentemente ligado ao polímero, pela ativação da carboxila terminal com diciclohexilcarbodiimida. As imagens de CLSM mostraram que as nanocápsulas permearam uniformemente na pele. Os autores sugeriram que o mecanismo de permeação das nanocápsulas foi intercelular.

Desta forma, o comportamento de nanoesferas e de nanocápsulas poliméricas mostrou-se diferenciado quanto à penetração dos nanocarreadores na pele. Esses achados abrem o questionamento sobre a potencialidade de modular a penetração na pele pelo uso de nanocápsulas de núcleo lipídico cuja rigidez poderia ser controlada pela variação da concentração de monoestearato de sorbitano no seu núcleo. Alternativamente, poder-se-ia pensar que diferentes tamanhos de nanocápsulas poliméricas poderiam modular a penetração dos carreadores nas diferentes camadas da pele.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Matérias-primas

- Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (Aldrich - Strasbourg, França) Mw = 14.000 g/mol e 65.000 g/mol;
- Poli(ϵ -caprolactona) (PCL, Capa[®] 6500) (Perstorp - Reino Unido) Mw = 114.000 g/mol;
- Monoestearato de sorbitano (SPAN 60[®]) (Delaware - Porto Alegre, Brasil);
- Polissorbato 80 (Tween 80[®], P80) (Delaware - Porto Alegre, Brasil);
- Benzofenona-3 (BZ3) (Delaware - Porto Alegre, Brasil);
- Triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (TCC) (Crodamol - São Paulo, Brasil) e (Delaware - Porto Alegre, Brasil);
- Álcool polivinílico (PVA) (Delaware - Porto Alegre, Brasil) Mw = 200.000 g/mol, 88% hidrolisado;
- Fosfatidilcolina (Lipoid[®] 75) (Gerbrás - Anápolis, Brasil);
- Rodamina B (RoB) (Sigma-Adrich - Saint Louis, EUA).
- 4-(*N, N*-dimetilamino)piridina (DMAP) (Sigma-Adrich - Saint Louis, EUA);
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) (Sigma-Adrich - Saint Louis, EUA);

4.1.2 Aparelhos e Equipamentos

Laboratório de Micro- e Nanopartículas Aplicadas na Terapêutica, IQ/UFRGS:

- Balança analítica SA 210 (Scientech - EUA);

- Evaporador rotatório Büchi RE120 (Suíça);
- Placa de agitação magnética com 15 pontos (Velp - Europa);
- Dispositivo de aquecimento e circulação de água, acoplado a termostato IKA EH4 (Alemanha);
- Medidas de pH foram realizadas utilizando-se potenciômetro Micronal B-474 (São Paulo, Brasil);
- As análises de espalhamento múltiplo de luz foram realizadas utilizando o Turbiscan LabExpert (Formulaction - Toulouse, França);
- Ultra-Turrax® T10 basic (Ika-Werke - Alemanha);
- Ultra-Turrax® T25 basic (Ika-Werke - Alemanha);
- Agitador em hélice RW20 DZM-n (Ika-Werke - Alemanha);
- Centrífuga Baby® I 206 BL (Fanem - Brasil).

Grupo de pesquisa: Sistemas Nanoestruturados para a Administração de Fármacos, Faculdade de Farmácia/UFRGS, coordenado pela Profa. Dr. Sílvia S. Guterres:

- Análises de espectroscopia de correlação de fótons e as análises de mobilidade eletroforética foram realizadas utilizando um Zetasizer® Nanoseries modelo ZEN 3600 (Malvern - Reino Unido);
- Análises de difração a Laser foram realizadas utilizando um Mastersizer® 2000 (Malvern - Reino Unido) utilizando índice de refração do poliestireno;
- Medidas de Viscosidade foram realizadas em viscosímetro rotacional modelo DV-II+ Pro, spindle ULA (Brookfield Engineering - USA).

Centro de Microscopia eletrônica (CME) da UFRGS, projeto vinculado ao CNANO. Auxílio do Técnico Carlos Eduardo Lima dos Santos;

- Análises de varredura foram realizadas em um microscópio confocal de varredura a laser invertido LSM700 (Carl Zeiss - Alemanha).

Laboratório E208 no IQ/UFRGS. Coordenado pelo prof. Dr. Valter Stefani:

- Análises de fluorescência foram realizadas em espectrofluorímetro Hitachi (F-4500).

4.1.3 Solventes

- Acetato de Etila (Nuclear - Brasil);
- Acetona (Nuclear - Brasil);
- Álcool Etílico (Etanol) (Nuclear - Brasil);
- Água destilada;
- Água ultrapura (Água Milli-Q®) (Destilador/deionizador Milliq-Q® - Millipore - EUA);
- Diclorometano (Nuclear - Brasil);
- Clorofórmio (Nuclear - Brasil);
- Metanol (Nuclear - Brasil);
- Tetraidrofurano (THF) (Tedia - EUA);

Todos os produtos químicos e solventes empregados foram utilizados em grau farmacêutico. Todos os reagentes foram utilizados como fornecidos.

4.2 Métodos

4.2.1 Ligação da rodamina B em poli(ϵ -caprolactona)

A síntese do polímero marcado foi realizada conforme já descrita por (POLETTO e col., 2011). Primeiramente a rodamina B (0,160 mmol) foi dissolvida em diclorometano seco (10 mL). Essa solução foi mantida sob atmosfera de argônio na temperatura ambiente para a adição de *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP; 0,160 mmol). Após 40 min, adicionou-se 0,160 mmol de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI), que reagiu por 40 min adicionais. Em seguida, adicionou-se uma solução de poli(ϵ -caprolactona) (PCL Mw = 14000 g/mol; 0,160 mmol) em diclorometano seco (15 mL) mantendo-se a mistura sob agitação magnética por 5 dias. Após esse período, o meio reacional foi lavado com água destilada (3×200 mL). O solvente foi, então, evaporado sob pressão reduzida utilizando-se evaporador rotatório. Ao sólido resultante foram adicionados 100 mL de etanol. A suspensão foi agitada, evaporada para remoção de solvente e umidade e o sólido foi retomado em tetraidrofurano. Esta solução foi precipitada, sob baixa agitação, em etanol gelado. A suspensão resultante foi centrifugada sucessivas vezes (2.395 $\times g$ por 10 min) até separação completa do sólido. O precipitado foi retomado em tetraidrofurano, reprecipitado em etanol gelado e centrifugado. Após várias repetições deste procedimento, o sólido foi centrifugado na presença de etanol até obtenção de sobrenadante transparente.

O indicativo de ausência de rodamina B livre no produto final (PCL-RB) foi verificada através de cromatografia em camada delgada (TLC), empregando-se clorofórmio:metanol (9:1 v/v) como eluente. A placa foi revelada sob luz ultravioleta (254 e 365 nm).

4.2.2 Quantificação da Rodamina B (RoB) ligada ao polímero (PCL)

A rodamina B ligada à PCL foi quantificada por espectroscopia de fluorescência, com comprimento de onda de excitação de 553 nm e emissão de 568 nm, em cubeta de quartzo (caminho óptico 1 cm). Preparou-se a curva

analítica para quantificação da rodamina B a partir de uma solução-mãe em etanol com diluições para 1; 2; 2,5; 3 e 4 μM em clorofórmio. Para quantificar a amostra o polímero marcado foi solubilizado em clorofórmio.

4.2.3 Preparação das microcápsulas (MC) e nanocápsulas (NC)

Com o objetivo de obter formulações com diâmetros diferentes, as formulações de nanopartículas poliméricas [nanocápsulas (NC), nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) ou microcápsulas (MC)] foram preparadas através de dois métodos diferentes: emulsificação-difusão (QUINTANAR-GUERRERO e col., 1998; POLETTO e col., 2008) e deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI e col., 1989; JAGER e col., 2009). Estes foram chamados de método 1 e método 2, respectivamente.

4.2.3.1 Método 1: Emulsificação-difusão

Preparação de microcápsulas poliméricas

Para preparar as formulações foram utilizadas diferentes composições quali-quantitativas (Tabela 1). Primeiramente, acetato de etila e água foram previamente saturados entre si em pêra de decantação, seguido de separação das fases. O polímero (PCL), tensoativo, a benzofenona-3 (BZ3), e triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico (TCC) foram solubilizados (40 °C) na fase orgânica (acetato de etila saturado com água ou mistura deste com etanol). Uma fase aquosa contendo tensoativo de elevado EHL foi preparada. As duas fases orgânica e aquosa foram misturadas e ultra-agitadas em rotor-estator de 9400 a 20450 rpm (Ultra-Turrax®). Após 5 min, uma segunda fase aquosa foi vertida sob a emulsão primária sob agitação mecânica de 300 rpm. A suspensão permaneceu em agitação durante 40 min a 40 °C. O solvente orgânico foi removido em rotaevaporador e a suspensão foi concentrada até o volume final desejado.

Dois modelos de Ultra-Turrax® foram utilizados, as taxas de cisalhamento 6500, 9500, 17500, 19000 e 21500 rpm foram utilizadas no modelo T25 e as taxas 9400 e 20450 rpm no T10. Lipoid® 75 foi utilizado como tensoativo de baixo EHL enquanto PVA ou polissorbato 80 foram utilizados como tensoativo/emulsificante de elevado EHL.

As formulações foram nominadas MC_{X-Y}, onde X corresponde a velocidade do Ultra-Turrax®, por exemplo, 204 corresponde a 20450 rpm, e Y a concentração de PVA ou TCC ou percentual de etanol. A tabela 1 mostra as suspensões de microcápsulas preparadas com PVA ou polissorbato 80 como tensoativo na fase orgânica. A formulação MC_{94-16R0B} foi preparada com a mesma composição da MC₉₄₋₁₆, porém o TCC foi saturado com rodamina B.

Tabela 1. Composição das formulações de MC.

		MC₂₀₄₋₇₀	MC₂₀₄₋₁₀₀	MC₁₇₅	MC_{94-Et30}	MC_{94-Et5}	MC₉₄₋₂₀	MC₉₄₋₁₆	MC_{94-16RoB}
Fase Aquosa	Água Milli-Q® (mL)	40	40	100	40	40	40	40	40
1	Polissorbato 80 (mg)	-	-	375	75	75	20	20	20
	PVA (mg)	700	1000	-	-	-	-	-	-
Fase Orgânica	PCL (mg)	200	200	500	100	100	100	100	100
	TCC (µL)	400	400	1000	200	200	200	160	160*
	Acetato de etila (mL)	6	6	17,5	7	9,5	9,5	9,5	9,5
	Etanol (mL)	4	4	7,5	3	0,5	0,5	0,5	0,5
Fase Aquosa	Água Milli-Q® (mL)	100	100	250	100	100	100	100	100
2									
Taxa de cisalhamento (rpm)		20450	20450	17500	9400	9400	9400	9400	9400
Volume final (mL)		10	10	50	10	10	10	10	10

*TCC saturado com rodamina B.

Preparação de nanocápsulas poliméricas

Para preparar as nanocápsulas também foram utilizadas diferentes composições quali-quantitativas (Tabela 2). Acetato de etila e água foram previamente saturados entre si em pêra de decantação, seguido de separação das fases. O polímero (PCL), tensoativo, a benzofenona-3 (BZ3), e triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (TCC) foram solubilizados (40 °C) na fase orgânica (acetato de etila saturado com água ou mistura deste com etanol). Uma fase aquosa contendo tensoativo de elevado EHL foi preparada. As duas fases orgânica e aquosa foram misturadas e ultra-agitadas em rotor-estator de 6500 a 20450 rpm (Ultra-Turrax®). Após 5 min, uma segunda fase aquosa foi vertida sob a emulsão primária sob agitação mecânica de 300 rpm. A suspensão permaneceu em agitação durante 40 min a 40 °C. O solvente orgânico foi removido em rotaevaporador e a suspensão foi concentrada até o volume final desejado.

As formulações foram nominadas NC_{X-Y} , onde X corresponde a velocidade do Ultra-Turrax® e Y a benzofenona-3 (BZ3) ou quantidade de TCC, por exemplo, 165 corresponde a 1650 µL, ou percentual de etanol. Tabela 2 mostra as suspensões de nanocápsulas contendo polissorbato 80 como tensoativo da fase aquosa 1, contendo ou não Lipoid® 75 na fase orgânica e preparadas com ou sem BZ3.

Tabela 2. Composição das formulações contendo lipoid® 75 e benzofenona-3.

		NC_{95-BZ3}	NC_{175-BZ3}	NC₆₅	NC₁₉₀₋₁₆₅	NC₁₉₀₋₁₂₀	NC₁₉₀₋₁₀₀	NC₁₉₀₋₈₅	NC_{204-E40}	NC_{204-E30}
Fase Aquosa	Água Milli-Q® (mL)	100	100	100	100	100	100	100	40	40
1	Polissorbato 80 (mg)	350	750	350	-	-	-	-	700	700
	PVA (mg)	-	-	-	2500	2500	2500	2500	-	-
Fase Orgânica	PCL (mg)	500	500	500	500	500	500	500	200	200
	Lipoid® 75 (mg)	250	250	250	-	-	-	-	-	-
	TCC (µL)	645	645	645	1650	1200	1000	850	400	400
	BZ3 (mg)	150	150	150	-	-	-	-	-	-
	Acetato de etila (mL)	25	17,5	25	15	15	15	15	6	7
	Etanol (mL)	-	7,5	-	10	10	10	10	4	3
Fase Aquosa	Água Milli-Q® (mL)	250	250	250	250	250	250	250	100	100
2										
Taxa de cisalhamento (rpm)		9500	17500	6500	19000	19000	19000	19000	20450	20450
Volume final (mL)		50	50	50	50	50	50	50	10	10

4.2.3.2 Método 2: Deposição interfacial de polímero pré-formado

Preparação de nanocápsulas poliméricas

Uma solução de 100 a 250 mg de PCL, 100 a 400 μ L de TCC foram solubilizados, a 40°C, em 25 a 67,5 mL de acetona. A fase orgânica foi injetada em um fase aquosa (50 a 132,5 mL) contendo 20 a 400 mg de polissorbato 80. Após 10 minutos de agitação magnética moderada, o solvente orgânico foi removido e a suspensão concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida (40°C). O volume final das formulações foi ajustado a 10 ou 25 mL em balão volumétrico.

As formulações foram nominadas NC_x, onde X corresponde a sequência (1 a 5) ou contém rodamina B (4-RoB) ou branca (B) ou contém o polímero marcado (L) (Tabela 3).

Tabela 3. Composição das formulações de NC.

Componentes		NC ₁	NC ₂	NC ₃	NC _{4-RoB}	NC ₅	NC _B	NC _L
Fase Aquosa	Água Milli-Q® (mL)	53	53	53	132,5	53	53	53
	Polissorbato 80 (mg)	20	20	160	400	80	80	80
Fase Orgânica	PCL-RHOB (mg)	-	-	-	-	-	-	10
	PCL Mw=14.000 (mg)	100	100	100	250	100	10	-
	PCL Mw=114.000 (mg)	-	-	-	-	-	90	90
	TCC (μ L)	200	100	160	400*	160	160	160
	Acetona (mL)	27	27	27	67,5	27	27	27
Volume final (mL)		10	10	10	25	10	10	10

*TCC saturado com rodamina B.

Preparação de nanocápsulas de núcleo lipídico

Resumidamente, foram pesados PCL (10 a 100 mg), monoestearato de sorbitano (SPAN 60®; 40 mg) e TCC (160 µL) e solubilizados com acetona (27 mL) a 40°C. A fase orgânica foi injetada numa solução aquosa (53 mL) contendo polissorbatos 80 (80 mg). Após 10 minutos de agitação magnética, o solvente orgânico foi evaporado e a suspensão foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida. O volume final (10 ou 25 mL) foi ajustado em balão volumétrico.

As formulações foram nominadas NCL_x, onde X corresponde a rodamina B (1-RoB) ou número sequencial (1) ou branca (B) ou contém o polímero marcado (L) (Tabela 4).

Tabela 4. Composição das formulações de NCL.

Componentes		LNC _{1-RoB}	LNC ₁	LNC _B	LNC _L
Fase Aquosa	Água Milli-Q® (mL)	53	53	53	53
	Polissorbatos 80 (mg)	80	80	80	80
Fase Orgânica	PCL-RHOB (mg)	-	-	-	10
	PCL Mw=14.000 (mg)	100	100	10	-
	PCL Mw=114.000 (mg)	-	-	90	90
	SPAN 60® (mg)	40	40	40	40
	TCC (µL)	160*	160	160	160
	Acetona (mL)	27	27	27	27
Volume final (mL)		10	10	10	10

*TCC saturado com rodamina B.

4.2.4 Cálculo do Número de Reynolds

O número de Reynolds (Re) foi calculado (Equação 1) para as formulações NC_{204-E130} e NC_{215-E130} a fim de verificar se o regime de fluxo empregado na preparação das emulsões primárias destas formulações foi turbulento. A primeira formulação utilizou Ultra-turrax[®] T10 e a segunda Ultra-turrax[®] T25, os quais possuem diâmetro do rotor 7,44 mm e 18,77 mm, respectivamente.

$$Re = \frac{\rho_c ND^2}{\eta_c} \quad (\text{Equação 1})$$

onde N é a taxa de cisalhamento (s^{-1}), D é o diâmetro do rotor (m), e ρ_c (Pa.s) e η_c ($kg \cdot m^{-3}$) são a densidade e a viscosidade da fase contínua, respectivamente.

4.2.5 Análises de Espalhamento Múltiplo de Luz

As formulações NC₁₉₀₋₁₆₅, NC₁₉₀₋₁₂₀, NC₁₉₀₋₁₀₀, NC₁₉₀₋₈₅ e MC₂₀₄₋₁₀₀ foram analisadas por espalhamento múltiplo de luz (MENGUAL e col., 1999) utilizando equipamento Turbiscan Lab[®] para obtenção dos perfis de retroespalhamento (BS). Cada amostra (cerca de 20 mL) foi colocada em uma cubeta cilíndrica de vidro (25 mm de diâmetro, 55 mm de altura). A amostra foi analisada em varredura a cada 40 micrômetros do fundo ao topo na temperatura de 25°C em intervalos de 3 min por 15 min, empregando-se laser com comprimento de onda de 880 nm. Os sinais de transmitância e de retroespalhamento foram detectados a 0° e 135° em relação ao feixe de laser incidente, respectivamente.

As variações de sinal de BS de todas as varreduras em relação à primeira varredura foram utilizadas para acessar os perfis relativos de BS e, assim, visualizar os fenômenos de migração (sedimentação, cremagem) e/ou variação de tamanho de partícula (floculação, coalescência) (Figura 1).

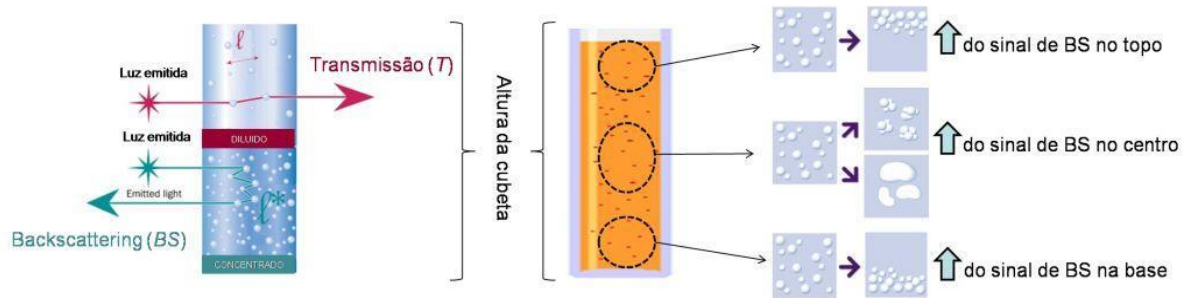


Figura 1. Esquema da interpretação dos fenômenos de instabilidade analisados por espalhamento múltiplo de luz empregando o equipamento Turbiscan Lab®.

4.2.6 Determinação do diâmetro das partículas e polidispersão

Difração de laser

Alíquotas das formulações foram adicionadas diretamente na unidade de dispersão de amostra do equipamento (Mastersizer®, Malvern). Os perfis foram traçados para descrever a granulometria por percentual de volume ou por percentual de número de partículas. Nesta técnica, durante a comparação entre as distribuições de número e volume, é importante lembrar que existe uma relação cúbica entre o tamanho de uma partícula e o seu volume. Por exemplo, o volume de uma partícula de 500 μm será 1 milhão de vezes o volume de uma partícula de 5 μm . Se uma amostra que contém uma partícula de 500 μm e um milhão de partículas de 5 μm for analisada por volume, a contribuição desses tamanhos de partículas para a distribuição geral será equivalente. Porém, se essa distribuição for expressa em número de partículas, a presença da partícula de 500 μm seria vista como insignificante dentro da distribuição geral.

A maioria das técnicas de medição de partículas supõe que o material a ser medido é esférico, para poder expressar o tamanho através de um único número, e determina o tamanho de partícula como o diâmetro médio da "esfera equivalente" ($D_{[4,3]}$). Este cálculo foi realizado conforme Equação 2 e os valores de polidispersão (SPAN) foram obtidos pela Equação 3.

$$D_{[4,3]} = \frac{\sum d^4}{\sum d^3} \quad (\text{Equação 2})$$

$$SPAN = \frac{(D_{0.9} - D_{0.1})}{D_{0.5}} \quad (\text{Equação 3})$$

onde $D_{0.9}$ é o tamanho que abrange 90 % da curva de distribuição, $D_{0.1}$ é o tamanho que abrange 10 % das partículas de menor tamanho sob a curva de distribuição e $D_{0.5}$ é o tamanho que representa a mediana da curva de distribuição de tamanhos.

Espalhamento de luz dinâmico

As formulações que apresentaram partículas na escala nanométrica após análise por difração de laser foram também analisadas por espalhamento de luz dinâmico, ou espectroscopia de correlação de fótons (PCS). O ângulo de medição é 173° , o que representa maior sensibilidade de medição do tamanho de partículas sub-micrométricas. Os valores de diâmetro médio foram obtidos pelo ajuste da função de correlação empregando-se uma função exponencial (método baseado em cumulants) e os índices de polidispersão (PDI) através da Equação 4.

$$PDI = \frac{\sigma^2}{Z_D^2} \quad (\text{Equação 4})$$

onde σ é o desvio padrão de uma gaussiana hipotética de distribuição e Z é o tamanho médio de partículas.

As amostras foram preparadas diluindo-se 20 μL das suspensões em 10 mL de água (Milli-Q®). Foram realizadas duas medições de cada amostra com sete leituras cada medição de 10 segundos.

4.2.7 Viscosidade

As análises foram realizadas em viscosímetro rotacional Brookfield provido de *spindle* ULA. Cada amostra foi acondicionada em dispositivo Brookfield acoplado a banho termostatizado circulante a 40°C .

4.2.8 Penetração cutânea *in vitro*

Os estudos de penetração cutânea *in vitro* foram conduzidos em células de difusão de Franz estáticas. A membrana utilizada foi pele do abdômen de porcas fêmeas (Abatedouro e frigorífico Araldi), que tiveram o tecido adiposo removido. Amostras de pele com espessura em torno de 2,0 mm foram posicionadas entre os compartimentos doador e acceptor, o qual foi constituído de uma solução aquosa de etanol a 30%. Aplicou-se 1,5 mL de cada formulação no compartimento doador de cada célula. Os experimentos tiveram duração de 24 horas e as células foram mantidas em banho termostaticado a 32°C e sob agitação constante. Após o período do experimento, as membranas foram removidas, o excesso de formulação foi retirado com água Milli-Q® e a pele foi tratada por corte com lâmina afiada. Os cortes foram colocados em lâminas e visualizados por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) utilizando laser vermelho (555 nm) e comprimento de onda de excitação da rodamina B de 507 nm para observação de emissão a 566 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ligação de rodamina B em poli(ϵ -caprolactona)

Para a síntese do polímero marcado, como mostra a figura 2, realizou-se reação de substituição nucleofílica em carbono acílico da rodamina B (1) com PCL α,ω -dihidroxilada (4) sob atmosfera de argônio utilizando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) (2) como agente de acoplamento e dimetilaminopiridina (DMAP) como catalisador. Inicialmente foi realizada a ativação da carboxila da rodamina B com EDCI, obtendo-se o intermediário I (3). Este se liga à PCL (4) resultando no polímero marcado (PCL-RoB) (5). A purificação do produto foi feita com água e etanol, retirando-se assim, a rodamina B que não reagiu e o subproduto da reação (uréia). A formação do produto (PCL-RoB) (5) foi verificada através de cromatografia em camada delgada (TLC) e cromatografia de exclusão de tamanhos. O rendimento da reação após purificação foi 76%, o produto apresentou-se puro em TLC e a massa molar média permaneceu inalterada.

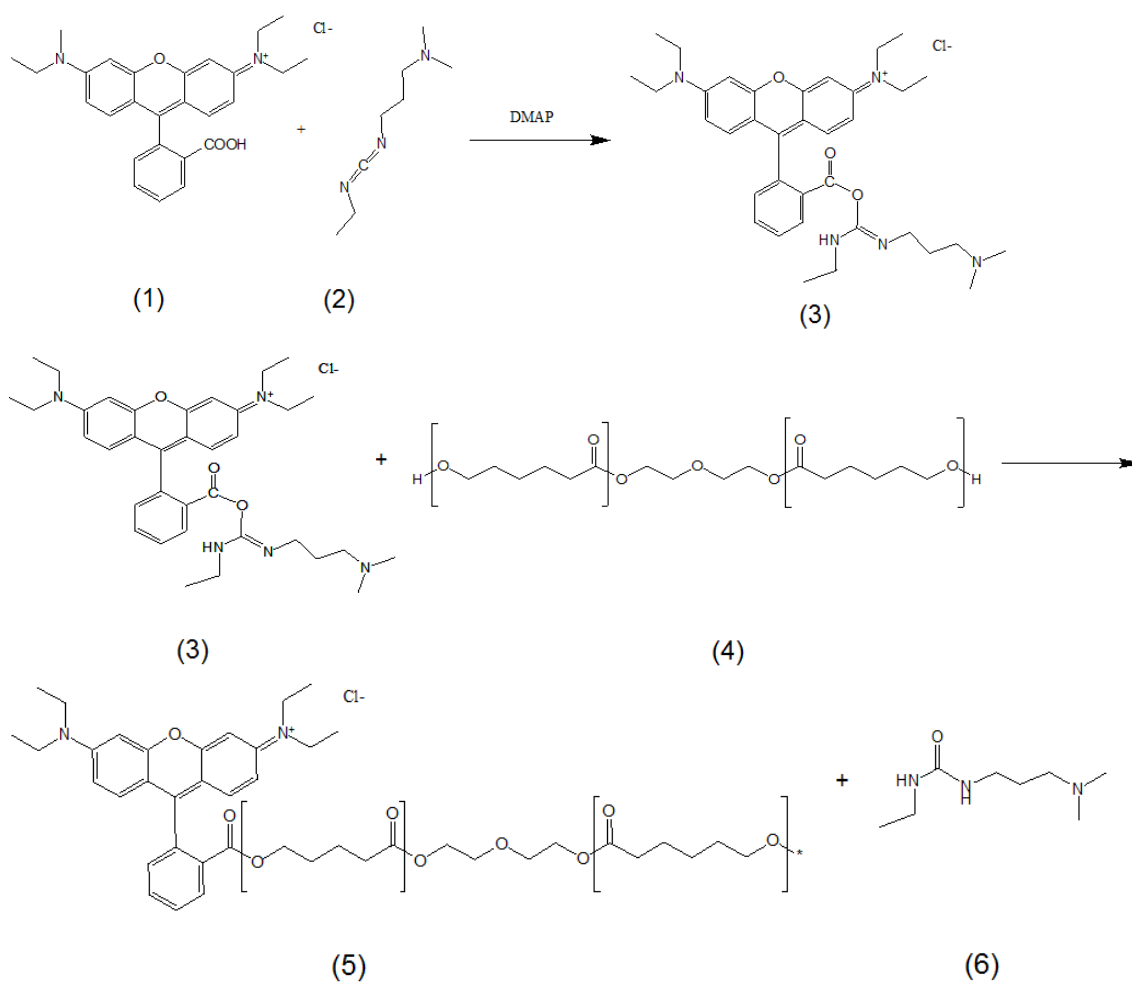


Figura 2. Esquema das reações para obtenção do polímero marcado.

5.2 Quantificação da rodamina B (RoB) ligada ao polímero (PCL)

O teor de rodamina B ligada ao polímero foi 3,63 $\mu\text{g/g}$. Para isso, uma curva analítica foi traçada contendo cinco concentrações (0,25 a 3,0 μM) utilizando fluorímetro (Figura 3). O valor do coeficiente de correlação mostrou a linearidade do método ($r = 0,9956$) apresentando boa correlação.

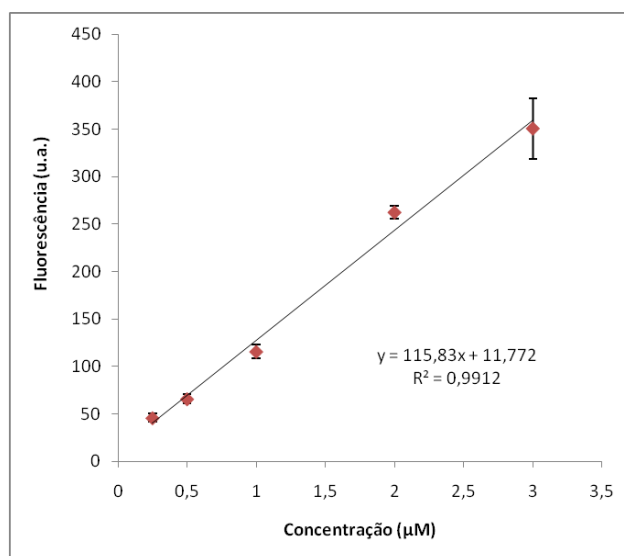


Figura 3. Curva analítica da rodamina B para quantificação do corante ligado a PCL.

5.3 Preparação das formulações

A capacidade de permeação cutânea de nanocarreadores está relacionada com suas propriedades morfológicas (distribuição de tamanhos e química de superfície) e suas propriedades mecânicas. Primeiramente a estratégia de controle de permeação seria investigada a partir do controle de distribuição de tamanhos das nanocápsulas. Desta forma, com o objetivo de obter formulações com diâmetro médio controlado de 800 nm ou de 200 nm, testaram-se diferentes taxas de cisalhamento e concentrações de agentes interfaciais na obtenção de partículas por método de emulsificação-difusão, aplicando-se método previamente descrito na obtenção de nanoesferas (POLETTO e col., 2009).

As formulações de nanocápsulas NC₉₅-BZ3 e NC₁₇₅-BZ3 foram preparadas empregando-se agitação a 9500 e a 17500 rpm e proporções de acetato de etila:etanol na fase orgânica de 100:0 e 70:30, respectivamente. O sistema tensoativo utilizado foi composto de Lipoid® 75 e polissorbato 80. Benzofenona-3 (BZ3) foi o modelo de substância encapsulada.

Observa-se que os perfis de distribuição de tamanho obtidos para a formulação NC₉₅-BZ3, tanto por volume (Fig. 4a) quanto por número (Fig. 4b)

apresentam-se monomodais. Quando se observa a granulometria por volume verifica-se que a distribuição de tamanhos abrange desde a escala nanométrica até a micrométrica, sendo que o valor de diâmetro médio $D_{[4,3]}$ é de 662 nm. Por outro lado, para a formulação NC_{175-BZ3}, o perfil granulométrico mostra-se na distribuição de tamanhos por volume polimodal, com valor de diâmetro médio de 766 nm (Fig. 4c). Quanto ao perfil de distribuição por número (Fig. 4d) a formulação apresenta-se monomodal nanométrica. A escolha dos parâmetros de taxa de cisalhamento e de fração volumétrica de etanol, como agente interfacial, não foi adequada para atingir-se os objetivos pretendidos.

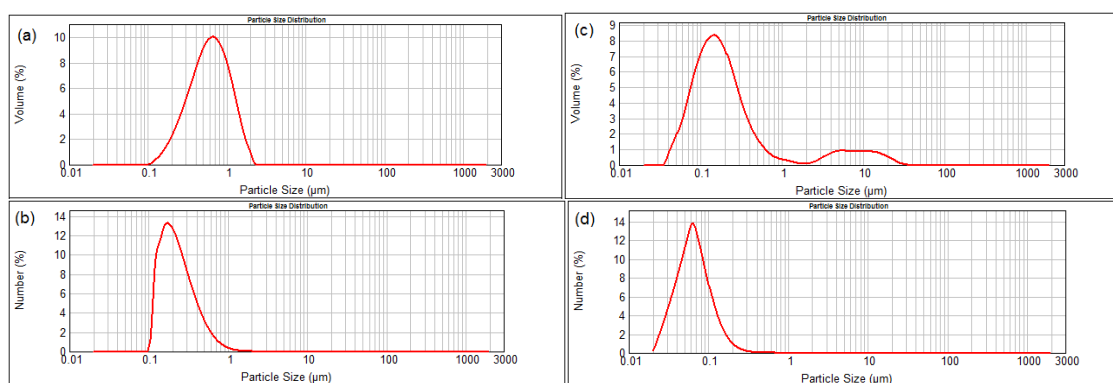


Figura 4. Gráficos de distribuição de tamanho das formulações NC_{95-BZ3} (esquerda) e NC_{175-BZ3} (direita) por volume (a) e (c) e por número (b) e (d).

Dessa forma, buscando-se obter formulações com diâmetro médio em torno de 800 e 200 nm testou-se novas taxas de cisalhamento. Duas novas formulações foram preparadas com a velocidade de agitação de 6500 rpm e somente acetato de etila na fase orgânica (NC₆₅) e com a velocidade de agitação de 19000 rpm e mistura de acetato de etila:etanol 60:40 (NC₁₉₀₋₁₆₅). Buscando-se uma maior diferença nos diâmetros médios das formulações, considerando-se os resultados obtidos para NC_{95-BZ3} e NC_{175-BZ3}, o polissorbato 80 foi substituído por PVA para a formulação NC₁₉₀₋₁₆₅. Essa estratégia foi baseada em relatos descritos na literatura para a obtenção de nanoesferas (POLETTO col., 2009).

A figura 5 mostra distribuições monomodais por volume (a) e por número (b) para a formulação NC₆₅. O diâmetro médio resultante, por volume, foi de 709 nm, com polidispersão de 1,36 (SPAN). Por outro lado, mesmo que o tamanho médio da formulação NC₁₉₀₋₁₆₅ tenha atingido o valor de 288 nm, uma população micrométrica permaneceu em suspensão conforme pode ser observado na figura 5c. Essa formulação apresenta uma porção diminuta de micropartículas comparando-se os perfis de distribuição por volume e por número (Fig. 5c e 5d).

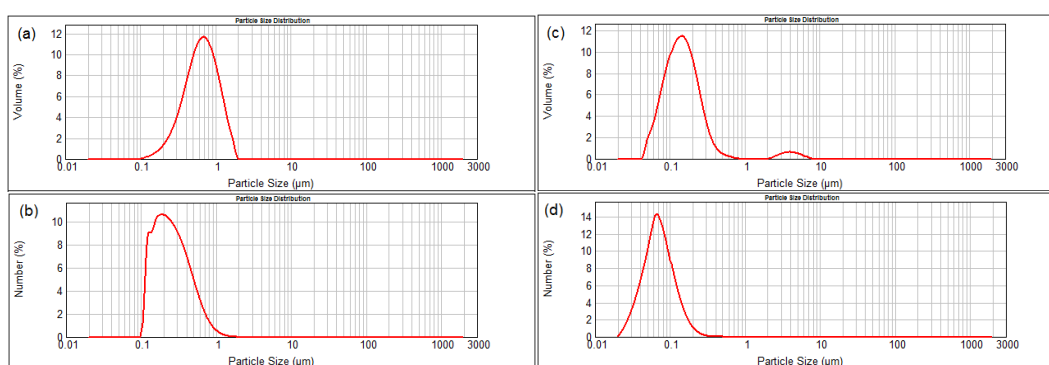


Figura 5. Gráficos de distribuição de tamanho da NC₆₅ (esquerda) e NC₁₉₀₋₁₆₅ (direita) por volume (a) e (c) e por número (b) e (d).

De forma a otimizar a formulação NC₁₉₀₋₁₆₅, e assumindo que a sua porção micrométrica pudesse ser decorrente de coalescência como uma consequência de excesso de óleo na formulação, variou-se a concentração de TCC de 165 µL/mL para 120, 100 e 85 µL/mL obtendo-se, assim, as formulações NC₁₉₀₋₁₂₀, NC₁₉₀₋₁₀₀ e NC₁₉₀₋₈₅.

A figura 6 mostra que todas as formulações apresentaram uma população micrométrica (a), (c) e (e), além da nanométrica. O diâmetro médio foi de 4,14 µm para NC₁₉₀₋₁₂₀; 124,93 µm para NC₁₉₀₋₁₀₀ e 5,64 µm para NC₁₉₀₋₈₅, mostrando que essas modificações realizadas não foram satisfatórias para tornar monomodal a distribuição do sistema NC₁₉₀₋₁₆₅.

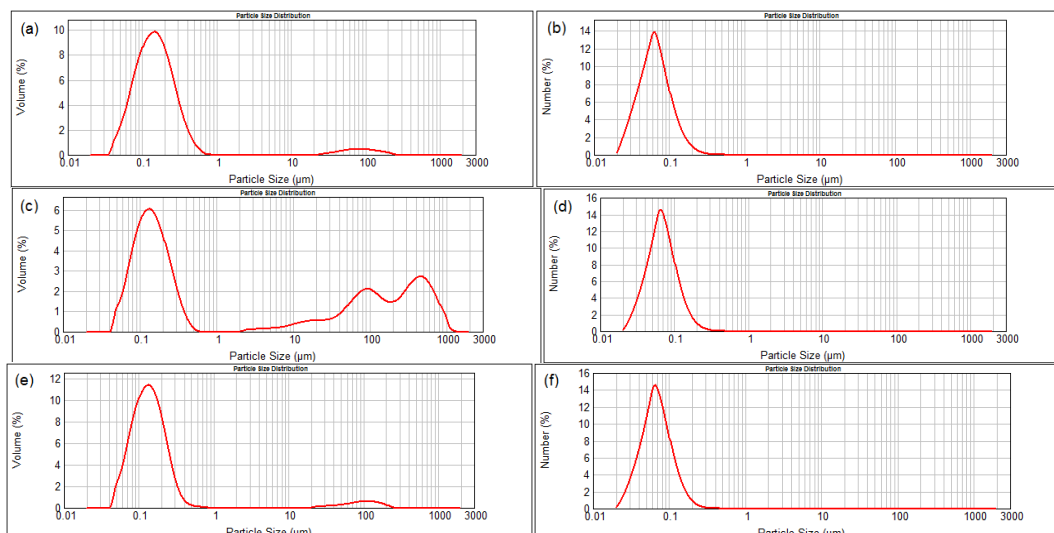


Figura 6. Gráficos de distribuição de tamanho da NC₁₉₀₋₁₂₀ (topo), NC₁₉₀₋₁₀₀ (meio) e NC₁₉₀₋₈₅ (base) por volume (a), (c) e (e) e por número (b), (d) e (f).

Alternativamente para a otimização, utilizou-se agitação através do Ultra-Turrax[®] T10 para volumes pequenos (10 mL). Desta forma, uma nova formulação foi preparada com proporção de acetato de etila:etanol 60:40 (v/v) e velocidade de agitação de 20450 rpm. As distribuições de tamanhos por volume (Fig. 7a) e por número (Fig. 7b) são monomodais. No entanto, o tamanho médio das partículas foi de 1,11 μm , muito superior ao esperado, por isso essa formulação foi chamada de MC₂₀₄₋₁₀₀.

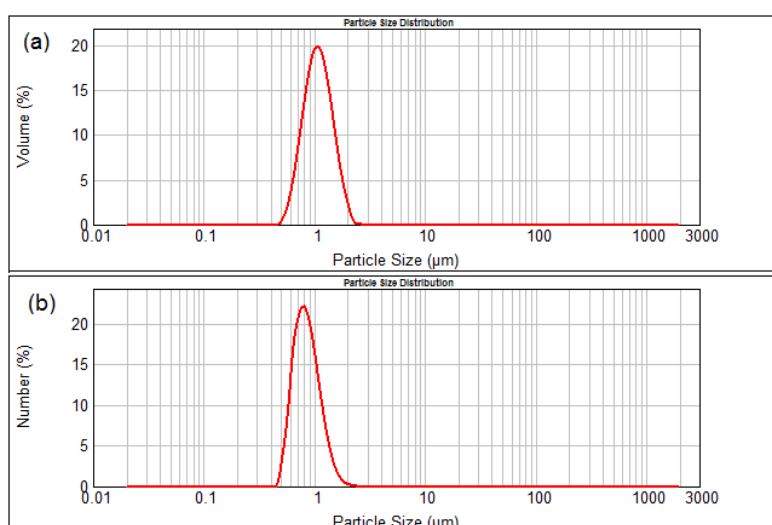


Figura 7. Gráficos de distribuição de tamanho da MC₂₀₄₋₁₀₀ por volume (a) e por número (b).

Para fins de comparação os valores, obtidos por difração de laser, de diâmetro médio e de polidispersão (SPAN) das formulações são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Valores obtidos por difração de laser.

Formulação	Volume					Número				
	SPAN	D _[4,3] (μm)	D _{0,1} (μm)	D _{0,5} (μm)	D _{0,9} (μm)	SPAN	D _[4,3] (μm)	D _{0,1} (μm)	D _{0,5} (μm)	D _{0,9} (μm)
NC ₉₅ -BZ3	1,59	0,662	0,258	0,582	1,183	1,47	0,658	0,126	0,205	0,428
NC ₁₇₅ -BZ3	2,93	0,766	0,074	0,168	0,566	1,35	0,195	0,035	0,064	0,121
NC ₆₅	1,36	0,709	0,315	0,649	1,196	1,63	0,709	0,131	0,239	0,520
NC ₁₉₀₋₁₆₅	1,51	0,288	0,075	0,143	0,290	1,26	0,157	0,039	0,069	0,126
NC ₁₉₀₋₁₂₀	1,87	4,145	0,070	0,147	0,346	1,32	0,168	0,035	0,064	0,119
NC ₁₉₀₋₈₅	1593	124,93	0,086	0,294	467,77	1,25	0,157	0,037	0,067	0,121
NC ₁₉₀₋₁₀₀	1,60	5,637	0,072	0,136	0,290	1,24	0,147	0,038	0,067	0,121
MC ₂₀₄₋₁₀₀	0,78	1,11	0,729	1,062	1,555	0,72	1,11	0,607	0,823	1,198

Para poder-se explicar o resultado observado, novas formulações foram preparadas NC_{204-Et30} e NC_{215-Et30} com as mesmas composições, mas com taxa de cisalhamento e dimensões de rotor-estator diferentes. Assim, o número de Reynolds (Re) foi calculado (Eq. 1, seção 4.2.4) para se determinar o regime de fluxo durante a preparação dos colóides. A tabela 6 mostra que o número de Reynolds para NC_{204-Et30} é menor que $1 \times 10^4 \text{ Kg.m}^{-1}.\text{Pa}^{-1}.\text{s}^{-2}$, enquanto que para NC_{215-Et30} é maior, mesmo que suas composições sejam iguais. O regime é considerado turbulento quando o número de Reynolds é maior ou igual a $1 \times 10^4 \text{ Kg.m}^{-1}.\text{Pa}^{-1}.\text{s}^{-2}$. Sendo assim, o regime de fluxo na preparação da formulação (NC_{215-Et30}) com taxa de cisalhamento de 21.500 rpm no Ultra-turrax[®] T25 é considerado turbulento. Comparando com a formulação NC_{204-Et30} para a qual se utilizou taxa de cisalhamento de 20450 rpm no Ultra-turrax[®] T10, verifica-se que o regime não é considerado turbulento.

Tabela 6. Número de Reynolds.

Formulação	Re
NC _{204-Et30}	$0,55 \times 10^4 \text{ Kg.m}^{-1}.\text{Pa}^{-1}.\text{s}^{-2}$
NC _{215-Et30}	$3,7 \times 10^4 \text{ Kg.m}^{-1}.\text{Pa}^{-1}.\text{s}^{-2}$

Afim de verificar se somente o regime, turbulento ou não, justificaria o tamanho das partículas em MC₂₀₄₋₁₀₀, desenvolveram-se formulações (MC₂₀₄₋₇₀ e NC_{204-Et40}) variando o tensoativo hidrofílico (PVA ou polissorbato 80). Na formulação MC₂₀₄₋₇₀ utilizou-se PVA e na NC_{204-Et40} polissorbato 80 e 20450 rpm para ambas, além da proporção acetato de etila:etanol 60:40. O tamanho médio ($D_{[4,3]}$) e SPAN das formulações estão representados na tabela 7.

Tabela 7. Valores obtidos por difração de laser.

Formulação	Volume					Número				
	SPAN	D _{4,3} (μm)	D _{0,1} (μm)	D _{0,5} (μm)	D _{0,9} (μm)	SPAN	D _{4,3} (μm)	D _{0,1} (μm)	D _{0,5} (μm)	D _{0,9} (μm)
MC ₂₀₄₋₇₀	74,31	51,78	1,459	2,698	201,94	0,83	2,419	1,104	1,504	2,357
NC _{204-Et40}	1,67	0,481	0,160	0,431	0,878	2,07	0,473	0,038	0,077	0,198
NC _{204-Et30}	1,91	0,414	0,134	0,345	0,793	1,88	0,403	0,039	0,078	0,186
MC ₁₇₅	1,15	2,327	1,283	2,095	3,703	0,86	2,323	1,001	1,391	2,202
MC _{94-Et30}	1,61	0,723	0,108	0,716	1,263	1,18	0,694	0,033	0,060	0,105
MC _{94-Et05}	1,40	4,80	2,104	4,328	8,178	1,23	4,792	1,307	1,964	3,721
MC ₉₄₋₂₀	0,96	6,635	3,791	6,352	9,872	1,35	6,632	1,617	3,535	6,388
MC ₉₄₋₁₆	0,99	6,269	3,502	5,991	9,417	1,33	6,269	1,626	3,265	5,974
MC _{94-16RoB}	1,30	8,307	3,824	7,616	13,75	2,15	8,246	1,245	2,107	5,779

Para a MC₂₀₄₋₇₀, a distribuição foi polimodal por volume (Fig. 8a) apresentando uma população micrométrica, enquanto que o perfil por número (Fig. 8b) mostra que a população majoritária nessa formulação é nanométrica. O tamanho médio de partículas em MC₂₀₄₋₇₀ foi de 51,78 μm , devido à presença da população acima de 10 μm . Por outro lado, o perfil granulométrico para NC_{204-Et40} foi monomodal (Fig. 8c e 8d) apresentando polidispersão de

1,53 e diâmetro médio de 436 nm. Este valor foi bem menor se comparado com as formulações preparadas com PVA empregando-se o mesmo método, onde os valores de diâmetro médio da gaussiana que corresponde a população majoritária foram próximos de 1 μm .

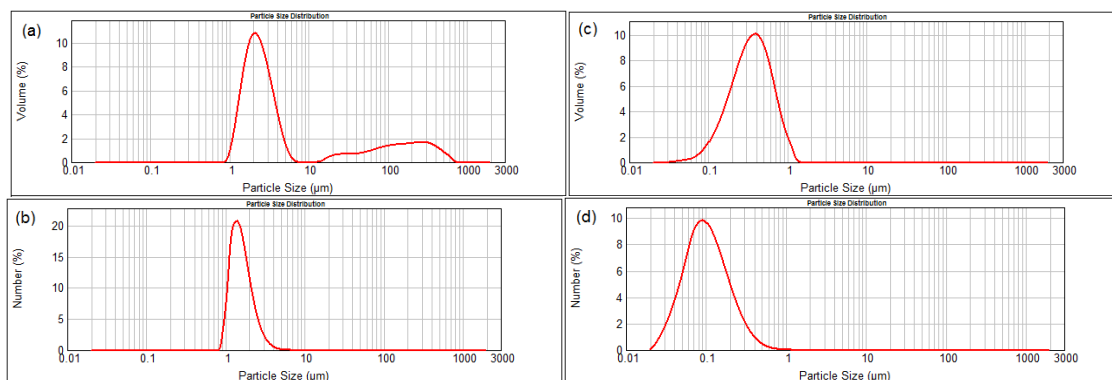


Figura 8. Gráficos de distribuição de tamanho da MC₂₀₄₋₇₀ (direita) e NC_{204-Et40} (esquerda) por volume (a), (c) e por número (b) e (d).

Com base nestes resultados, optou-se por utilizar polissorbato 80 ao invés de PVA na preparação das nanopartículas. Sabendo-se que a proporção de etanol muito elevada pode levar a precipitação do sistema devido à insolubilidade do polímero, optou-se, para obter diâmetro médio final em torno de 200 nm, utilizar 70:30 de acetato de etila:etanol como proporção da fase orgânica com velocidade de agitação de 20450 rpm (T10) (NC_{204-Et30}).

A distribuição para NC_{204-Et30} foi monomodal por volume (Fig. 9a) e por número (Fig. 9b). No entanto, o diâmetro médio das partículas, por volume, foi de 414 nm e a polidispersão de 1,91. Esse resultado mostra que o emprego de polissorbato 80 como estabilizante ao invés do PVA leva à diferentes distribuições de tamanhos.

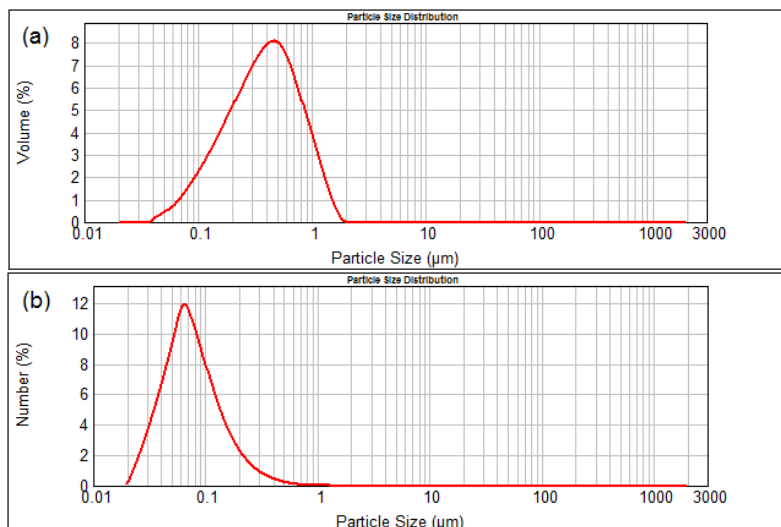


Figura 9. Gráficos de distribuição de tamanho da NC₂₀₄-Et₃₀ por volume (a) e por número (b).

Assim, para tentar reduzir o diâmetro médio e a polidispersão, optou-se por utilizar o equipamento Ultra-Turrax[®] T25 (com maior diâmetro do rotor) para que o regime turbulento pudesse influenciar na diminuição do tamanho das partículas. Para isso, utilizou-se taxa de 17500 rpm e proporção de 70:30 de acetato de etila:etanol na fase orgânica MC₁₇₅, assim como PCL de massa molar de 14000 g/mol no lugar da PCL de 65000 g/mol para que a diminuição da viscosidade da fase orgânica pudesse contribuir para a diminuição do tamanho médio de partículas. Os resultados mostraram distribuições monomodais por volume (Figura 10a) e por número (Figura 10b). A polidispersão foi de 1,15; e o tamanho médio de partículas foi de 2,33 µm. Este valor elevado pode ser explicado pela ausência do lipoid[®] 75 na fase orgânica. Para NC₁₇₅-BZ₃ preparada com lipoid[®] 75, o D_[4,3] foi de 766 nm, com pequena população micrométrica.

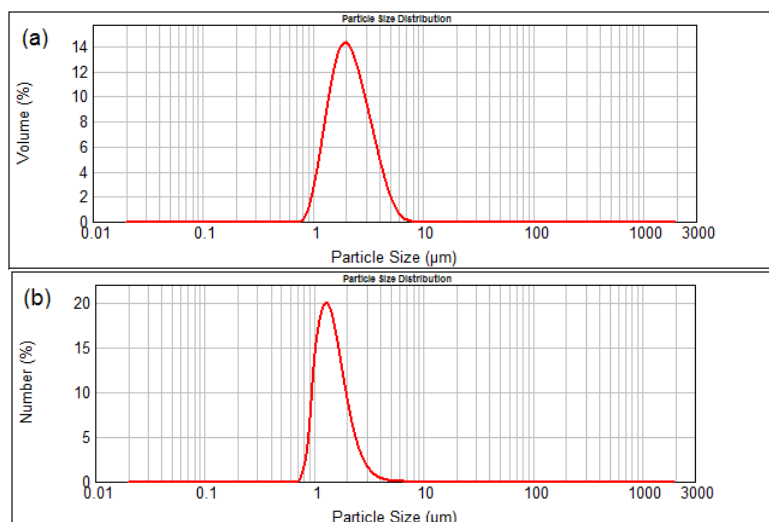


Figura 10. Gráficos de distribuição de tamanho da MC₁₇₅ por volume (a) e por número (b).

A partir deste ponto, para a otimização destes resultados visando o diâmetro médio de 800 nm com base em um fluxo não turbulento (Figura 11), primeiramente testou-se diminuir as concentrações de polissorbato 80 (7,5 mg/mL), PCL 14000 g/mol (10 mg/mL), TCC (20 µL/mL). A velocidade do turrax para 9400 rpm e mantendo a proporção acetato de etila:etanol 70:30, obtendo-se assim a formulação MC_{94-Et30}. Em seguida, testou-se reduzir a proporção de acetato de etila:etanol para 95:05. Essa formulação foi chamada de MC_{94-Et05}.

A figura 11 mostra que, para a MC_{94-Et30} embora o tamanho médio, por volume, de partículas tenha sido de 723 nm, a distribuição não foi monomodal por volume (a), apresentando duas populações. Para a formulação MC_{94-Et05}, pode-se visualizar uma distribuição monomodal por volume (Fig. 11c) e por número (Fig. 11d). A polidispersão (SPAN) foi 1,40; porém, o tamanho médio, de partículas foi de 4,80 µm. O valor de tamanho elevado é justificado pelo regime não turbulento, além da redução de etanol na formulação, diminuição da velocidade e PCL de massa molar média (Mw).

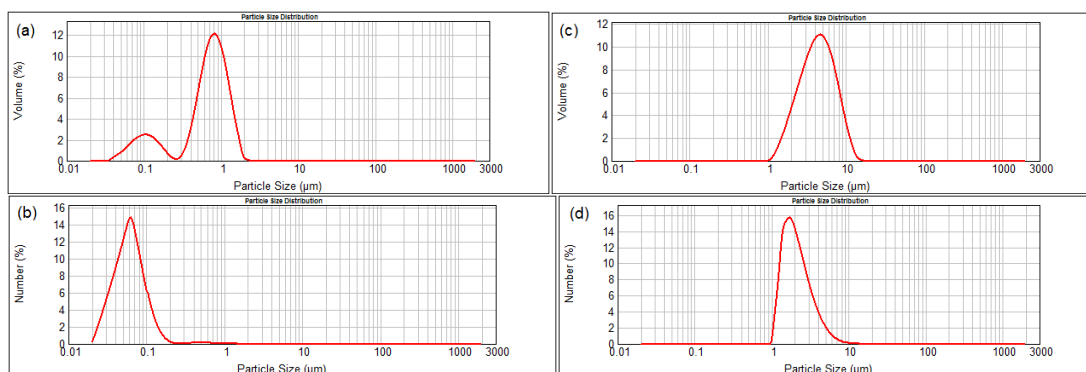


Figura 11. Gráficos de distribuição de tamanho da MC₉₄-Et₃₀ (esquerda) e MC₉₄-Et₀₅ (direita) por volume (a) e (c) e por número (b) e (d).

Ainda buscando uma formulação que apresentasse um perfil granulométrico monomodal com diâmetro médio de 800 nm, testou-se diminuir a concentração de polissorbato 80 para 2,0 mg/mL (MC₉₄-20) e também a concentração de TCC para 16 μ L/mL (MC₉₄-16). A figura 12 mostra que o perfil granulométrico foi monomodal por volume, mas polimodal por número de partículas. Ambas as formulações apresentaram polidispersão (SPAN) de aproximadamente 1 e tamanho de partícula de 6,5 μ m. Os resultados demonstraram que a redução da concentração de TCC de 20 para 16 μ L/mL não alterou significativamente o tamanho médio e a polidispersão.

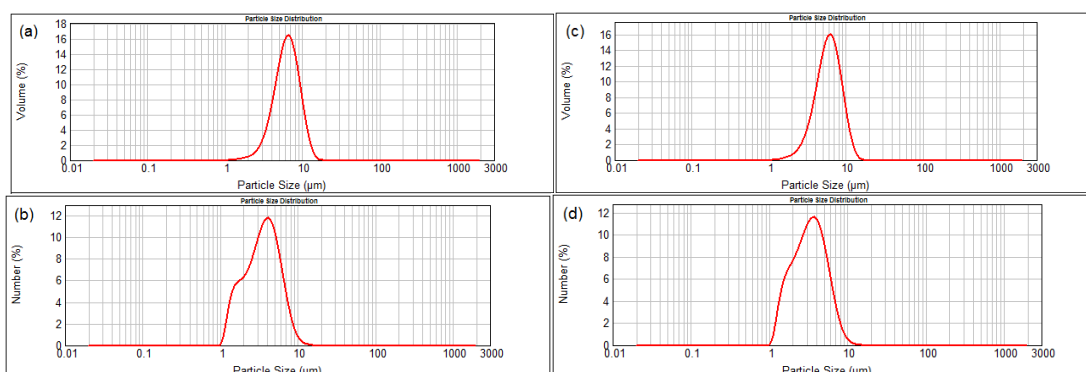


Figura 12. Gráficos de distribuição de tamanho da MC₉₄-20 (esquerda) e MC₉₄-16 (direita) por volume (a) e (c) e por número (b) e (d).

Para poder-se efetuar os ensaios de avaliação da permeação cutânea, as formulações foram marcadas com rodamina. Preparou-se uma formulação contendo a mesma composição que a formulação MC₉₄₋₁₆ onde o núcleo oleoso (triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico) foi saturado, por 6 dias, com rodamina B. Esta formulação foi chamada de MC_{94-16RoB} e apresentou tamanho médio de partículas de 8,31 µm. Este valor foi maior do que aquele determinado para MC₉₄₋₁₆, preparada sem o corante fluorescente. As distribuições granulométricas obtidas para a formulação MC_{94-16RoB} estão mostradas na figura 13. Verifica-se a falta de homogeneidade da suspensão pela diferença de diâmetros médios comparando-se as distribuições por volume e por número.

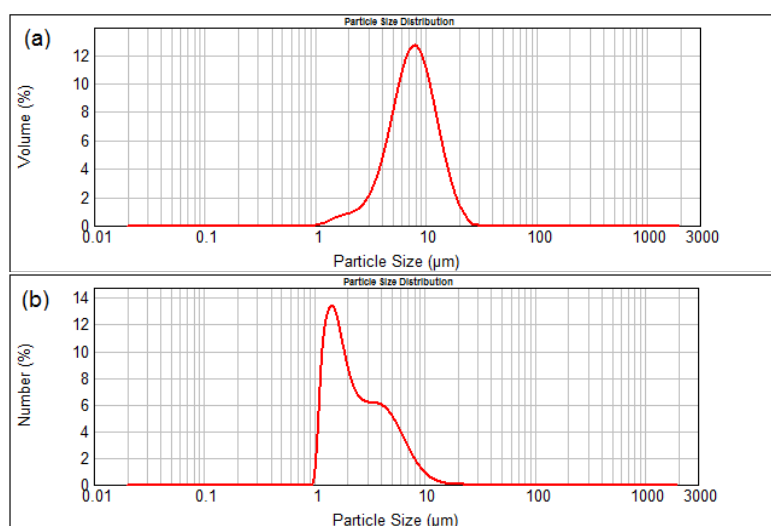


Figura 13. Gráficos de distribuição de tamanho da MC_{94-16RoB} por volume (a) e por número (b).

A falta de correlação entre os dados obtidos e aqueles anteriormente relatados (POLETTO e col., 2008; 2009) pode estar relacionada à diferença de frações volumétricas selecionadas para cada um dos estudos. Desta forma, como não foi possível aplicar a abordagem anteriormente relatada para nanoesferas para a produção de nanocápsulas com o controle de tamanhos necessários para os testes de permeação, uma alternativa foi proposta. O

método de obtenção de nanocápsulas por deposição interfacial de polímero pré-formado foi escolhido para a continuidade dos estudos.

A deposição interfacial de polímeros é um método de apenas uma etapa, onde a fase orgânica é, geralmente, constituída por um solvente orgânico miscível com água. O princípio do método está baseado no efeito Marangoni, sendo que a variação de diâmetros de partículas está relacionada à variação da natureza química do solvente orgânico e à viscosidade da fase orgânica. Assim, a obtenção de sistemas com diâmetros médios com diferença acentuada fica dificultada quando a formulação tem composição similar e o solvente orgânico não é variado.

Primeiramente as formulações NC₁ e NC₂ foram preparadas nas concentrações de 20,0 µL/mL (TCC) e 2,0 mg/mL (polissorbato 80); e 10,0 µL/mL (TCC) e 2,0 mg/mL (polissorbato 80), respectivamente. A figura 14 mostra que a distribuição foi monomodal para ambas, exceto por volume para NC₁. O tamanho médio de partículas para NC₁ e NC₂ foi 715 nm e 401 nm, respectivamente. A polidispersão foi 2,50 para NC₁ e 1,76 para NC₂. Estes resultados demonstraram que a redução pela metade da concentração de TCC possibilitou distribuição monomodal (Fig. 14c e 14d).

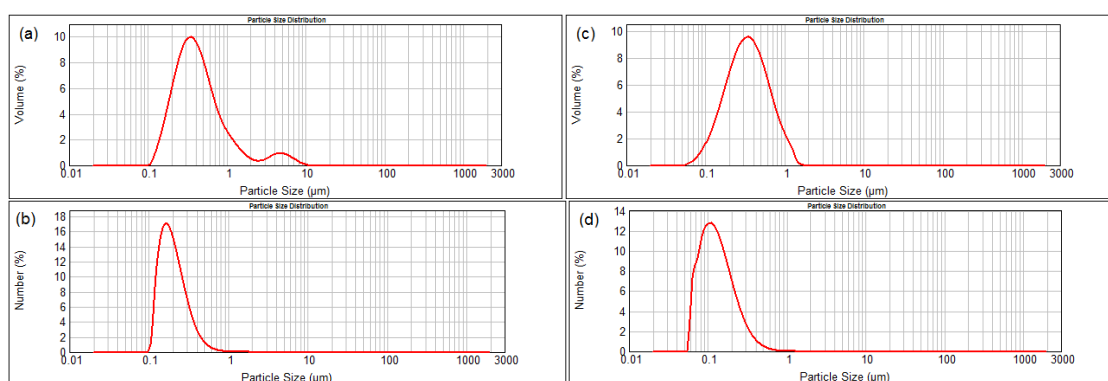


Figura 14. Gráficos de distribuição de tamanho da NC₁ (esquerda) e NC₂ (direita) por volume (a) e (c) e por número (b) e (d).

Ainda buscando uma formulação com distribuição monomodal e tamanhos de partículas inferiores a 1 µm optou-se por diminuir a concentração

de TCC para 16,0 $\mu\text{L/mL}$ e aumentar a concentração de polissorbato 80 para 16,0 mg/mL (NC_3). Utilizou-se TCC saturado com rodamina B (RoB) para a preparação de $\text{NC}_{4\text{-RoB}}$. A figura 15 mostra distribuição monomodal para ambas. O tamanho médio de partículas foi menor (192 nm) para $\text{NC}_{4\text{-RoB}}$, que contém rodamina B, se comparado com NC_3 (329 nm) sem rodamina B. A polidispersão, para ambas, foi menor que 2,0.

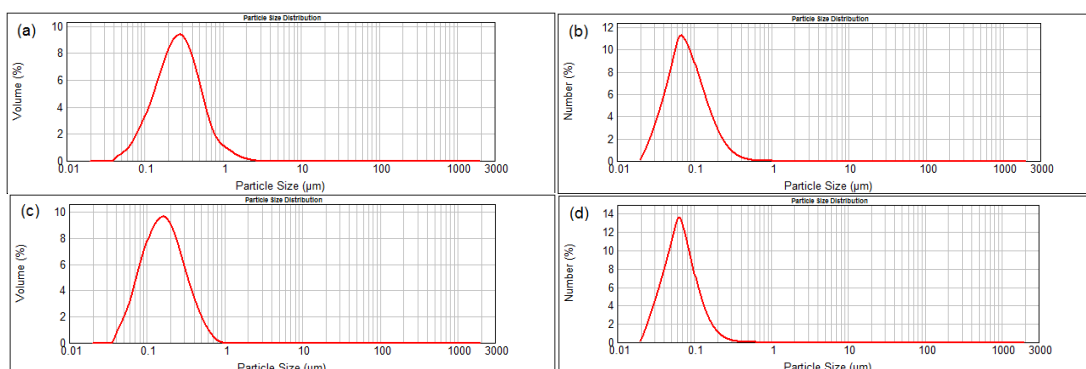


Figura 15. Gráficos de distribuição de tamanho da NC_3 (esquerda) e $\text{NC}_{4\text{-RoB}}$ (direita) por volume (a) e (c) e por número (b) e (d).

Para verificar detalhadamente a polidispersão da população nanométrica a $\text{NC}_{4\text{-RoB}}$ foi analisada por espectroscopia de correlação de fótons (PCS). A figura 16 mostra a distribuição de tamanho por intensidade, volume e número. Os valores de diâmetro médio, por intensidade, e índice de polidispersão (PDI) das formulações $\text{NC}_{4\text{-RoB}}$, LNC_L e NC_L foram determinados (tabela 8).

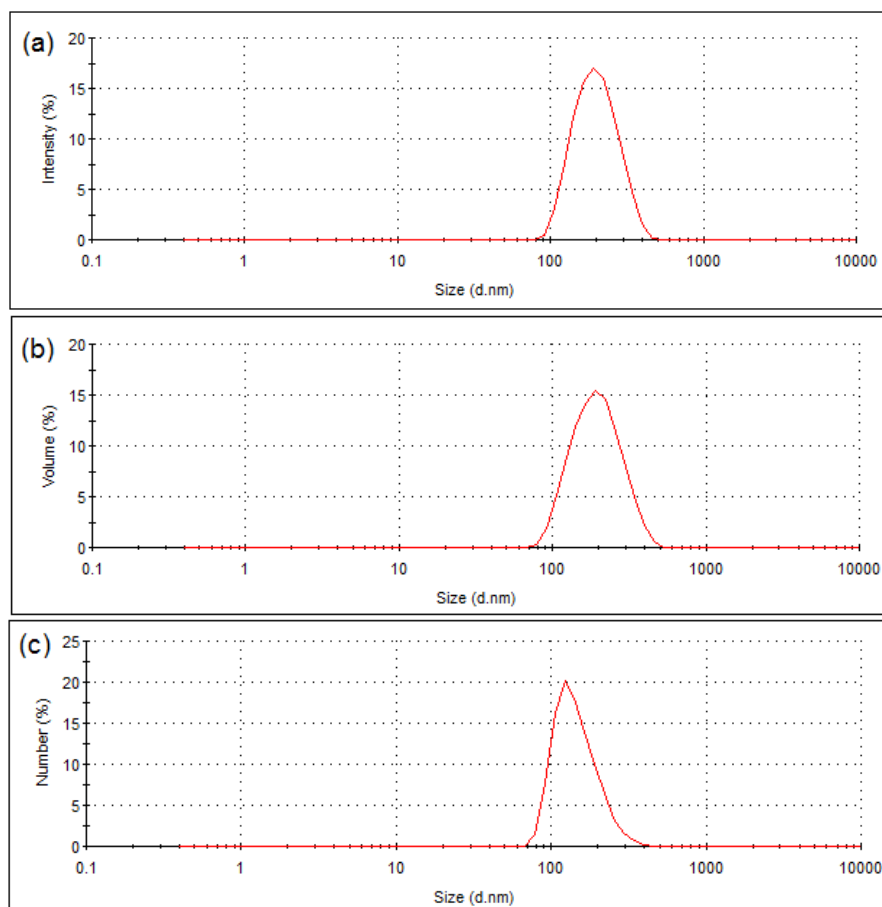


Figura 16. Gráficos de distribuição de tamanho da NC_{4-RoB} por intensidade (a), por volume (b) e por número (c).

Tabela 8. Valores obtidos por espalhamento de luz dinâmico.

Formulação	Diâmetro médio (nm)	PDI
NC _{4-RoB}	188	0,08
LNC _L	182	0,06
NC _L	179	0,08

Em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que nanocápsulas poliméricas (NC) e nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) possuem diferentes propriedades mecânicas (FIEL e col., 2010). As nanocápsulas de núcleo lipídico, que contém uma dispersão lipídica no núcleo, mostraram-se mais rígidas que as nanocápsulas poliméricas, que contém

apenas óleo no núcleo. Assim, para avaliar diferença de permeação comparando-se nanocápsulas com propriedades mecânicas diferentes, foram preparadas formulações de nanocápsulas e de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo TCC saturado com rodamina B, caracterizadas quanto ao tamanho de partícula e polidispersão para posteriores estudos de permeação cutânea.

Preparou-se, ainda, a formulação NC₅ buscando-se uma distribuição de tamanhos ainda mais homogênea. Para isso, utilizou-se 8 mg/mL de polissorbato 80 e 16 µL/mL de TCC. As formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico foram preparadas com monoestearato de sorbitano disperso no óleo e PCL como parede. Essas formulações continham ou não rodamina B (LNC_{1-RoB} e LNC₁, respectivamente). A figura 17 mostra que todas as formulações apresentaram distribuições monomodais após análise por difração de laser. O tamanho médio de partículas foi maior para NC₅, (248 nm) comparado às de nanocápsulas de núcleo lipídico LNC_{1-RoB} (159 nm) ou LNC₁ (226 nm).

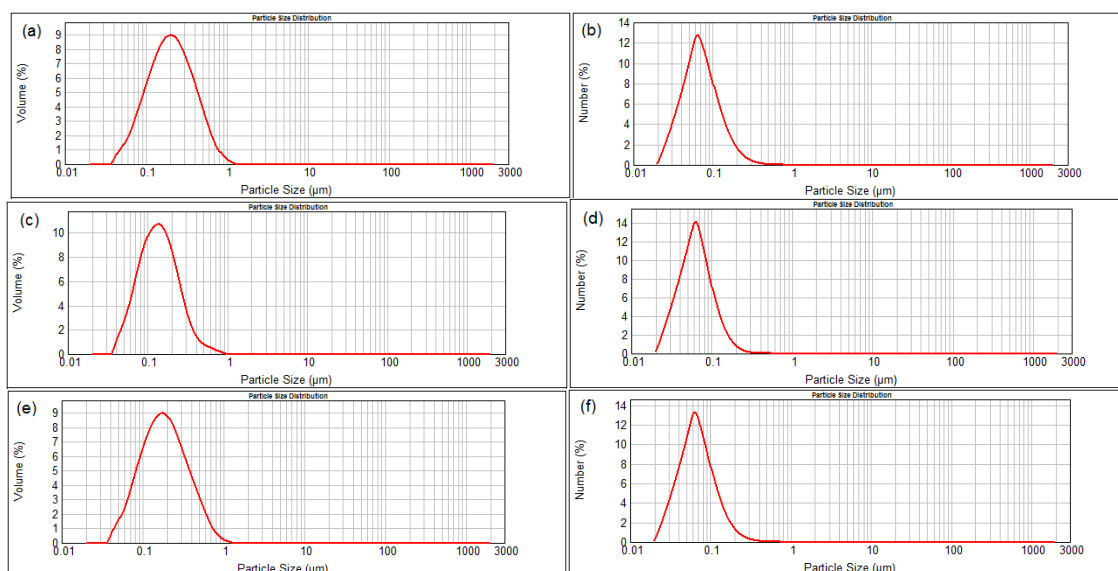


Figura 17. Gráficos de distribuição de tamanho da NC₅ (topo), LNC_{1-RoB} (meio) e LNC₁ (abaixo) por volume (a), (c) e (e) e por número (b), (d) e (f).

Considerando que a saturação do TCC com rodamina B foi baixa e a partição da rodamina B considerando sua hidrofilia poderia levar a uma

concentração maior na fase contínua do que na fase dispersa, optou-se por ligar a rodamina B quimicamente ao polímero. Desta forma, a ligação mais estável que a interação na fase dispersa levaria a identificação da posição da partícula nas camadas da pele. As formulações foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula e polidispersão para posteriores estudos de permeação cutânea. As formulações contendo 10% do polímero marcado com rodamina B foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado, caracterizadas e analisadas quanto ao seu comportamento em experimentos de penetração cutânea.

A formulação não marcada de nanocápsulas de núcleo lipídico LNC_B foi proposta para se validar a preparação de uma formulação com distribuição de tamanhos homogênea. Para isso, utilizou-se dois polímeros com diferentes massas molares médias PCL Mw 14.000 e 114.000 g/mol, além do óleo e monoestearato de sorbitano. As distribuições granulométricas das nanocápsulas de núcleo lipídico foram monomodais por volume (Fig. 18a) e por número (Fig. 18b). O tamanho médio de partículas foi de 148 nm.

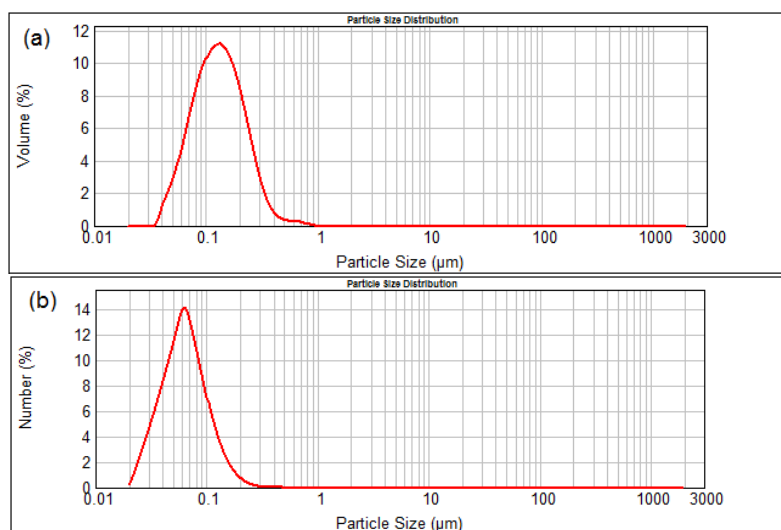


Figura 18. Gráficos de distribuição de tamanho da LNC_B por volume (a) e por número (b).

A formulação não marcada de nanocápsulas poliméricas (NC_B) também foi proposta para validar a obtenção desse tipo de formulação. Para isso,

utilizou-se dois polímeros com diferentes massas molares médias PCL Mw 14.000 e 114.000 g/mol, além do óleo. As distribuições granulométricas das nanocápsulas poliméricas foram monomodais por volume e número (Fig. 19a e 19b). O tamanho médio de partículas foi de 155 nm.

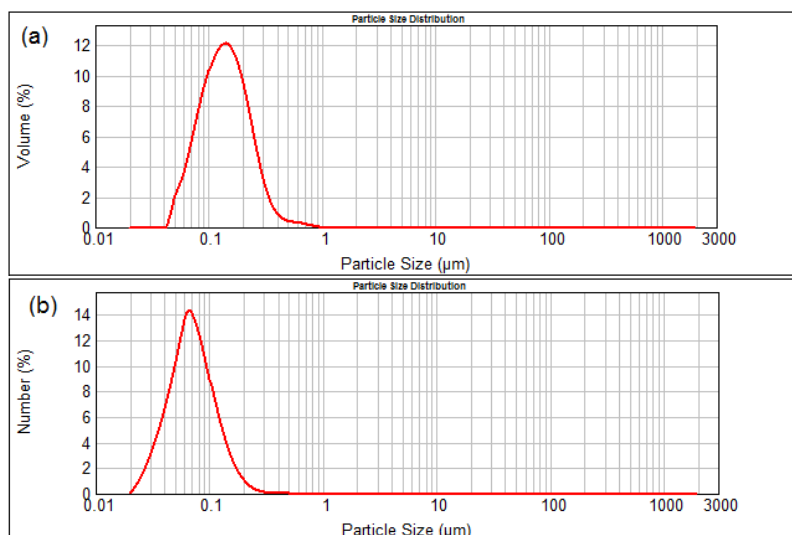


Figura 19. Gráficos de distribuição de tamanho da NC_B por volume (a) e por número (b).

A formulação marcada de nanocápsulas de núcleo lipídico LNC_L foi proposta para obter distribuição de tamanhos homogênea. Para isso, utilizou-se PCL marcada, PCL Mw 114.000, além do monoestearato de sorbitano e óleo. As distribuições foram monomodais por volume e número (Fig. 20a e 20b). O tamanho médio de partículas foi de 176 nm. Como a distribuição de tamanho foi nanométrica, análises de espalhamento de luz dinâmico foram realizadas (Fig. 21). As distribuições por intensidade, volume e número foram monomodais (Fig. 21 a-c). O tamanho médio de partículas foi 182 nm e o índice de polidispersão inferior a 0,1 (Tabela 8), indicando homogeneidade na distribuição.

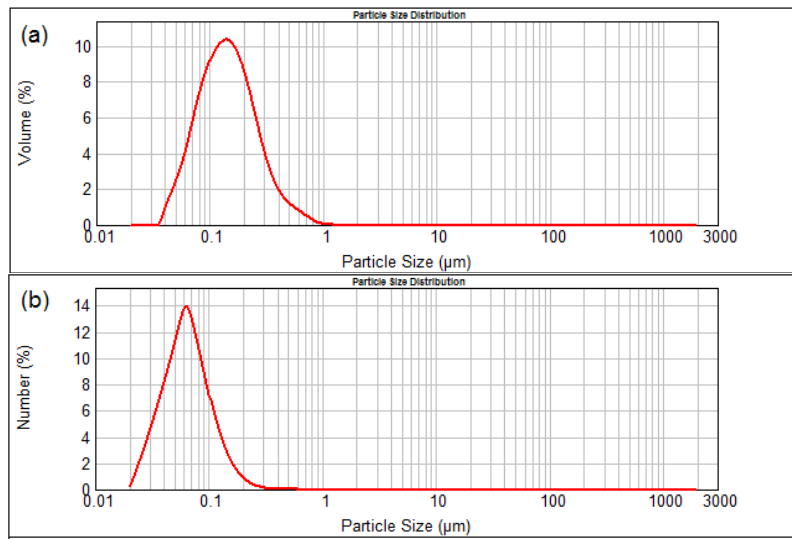


Figura 20. Gráficos de distribuição de tamanho da LNC_L por volume (a) e por número (b).

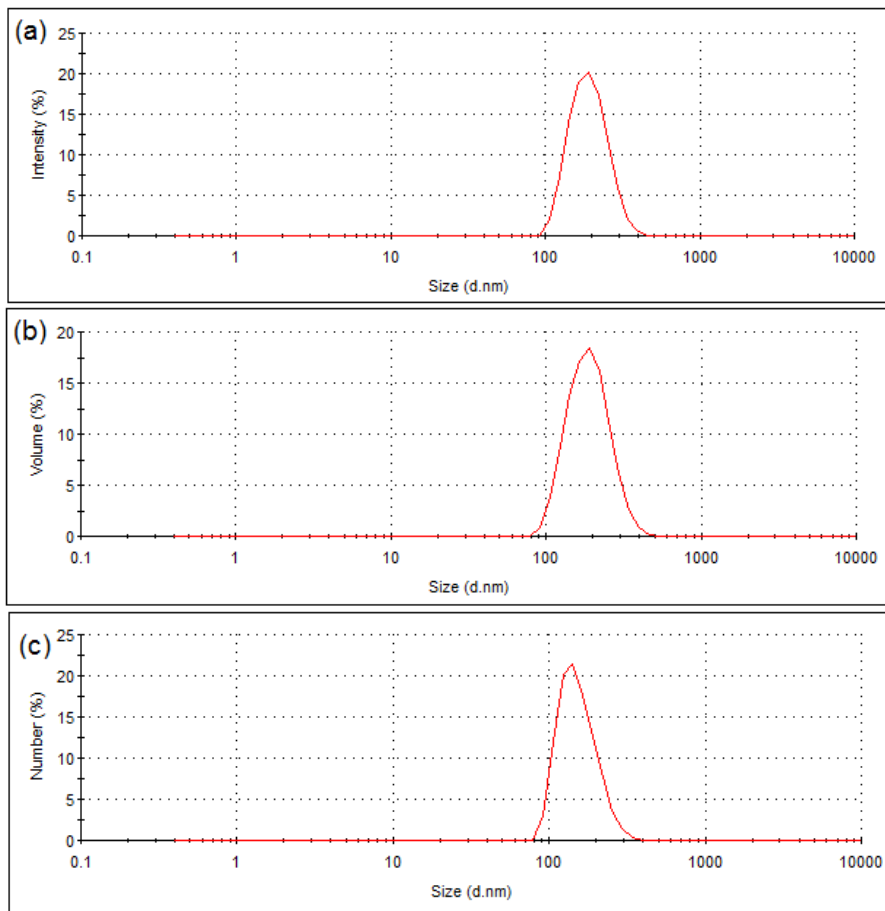


Figura 21. Gráficos de distribuição de tamanho da LNC_L por intensidade (a), volume (b) e número (c).

A formulação contendo polímero marcado de nanocápsulas poliméricas (NCL) foi proposta para se obter distribuição monomodal. Para isso, utilizou-se o polímero marcado e M_w 114.000 g/mol, além do óleo. A figura 22 mostra distribuições monomodais e tamanho médio de partículas de 170 nm. Realizou-se análise de espalhamento de luz dinâmico (Fig. 23). A figura 23 mostra que a distribuição foi monomodal, o tamanho médio de partículas foi de 179 nm e o índice de polidispersão inferior a 0,1 (tabela 8), indicando homogeneidade de distribuição.

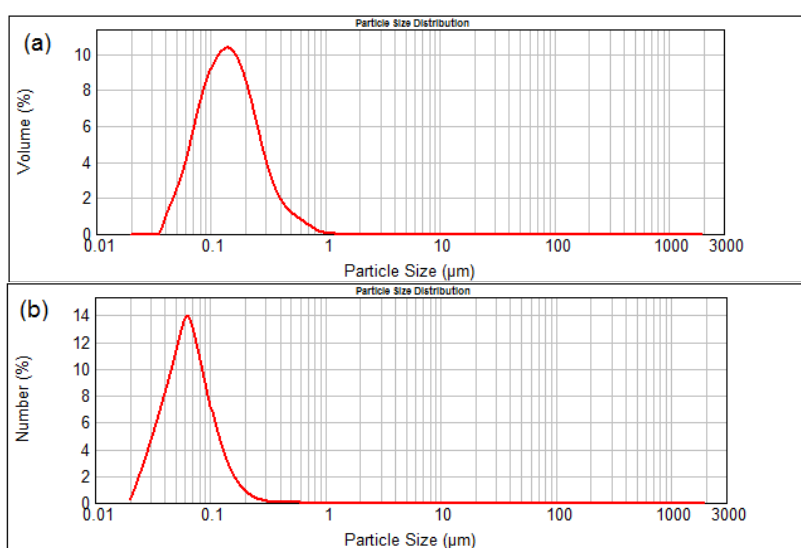


Figura 22. Gráficos de distribuição de tamanho da NCL por volume (a) e por número (b).

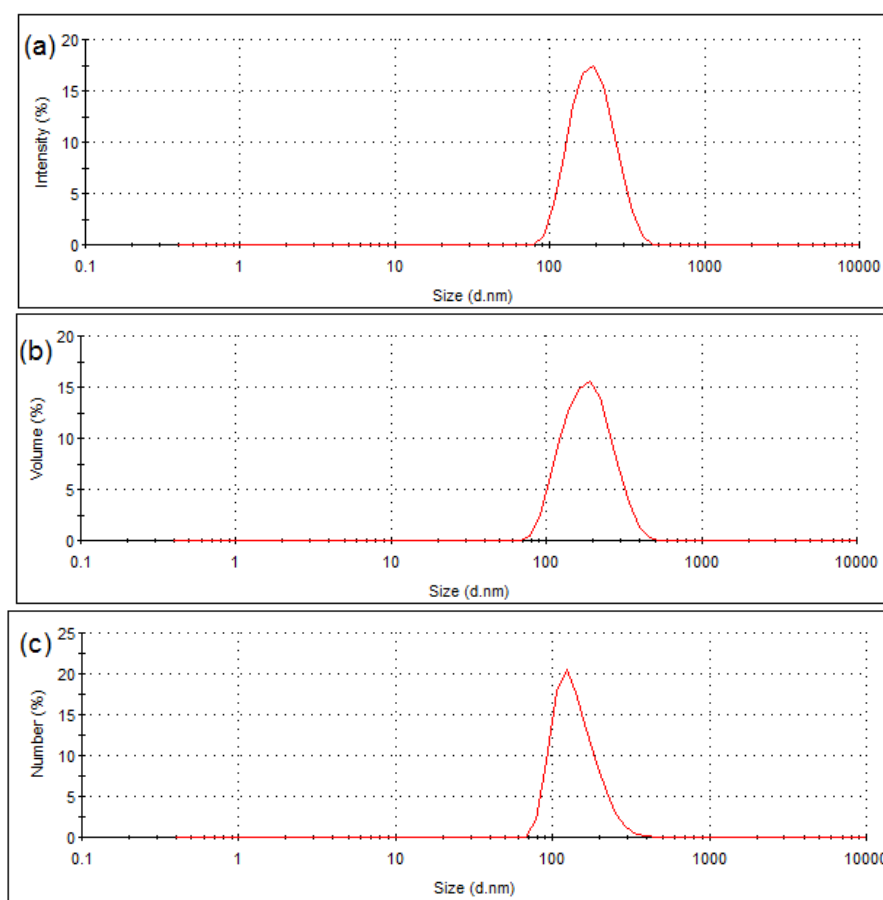


Figura 23. Gráficos de distribuição de tamanho da NCL por intensidade (a), volume (b) e número (c).

Para fins de comparação os valores, obtidos por difração de laser, de diâmetro médio e de polidispersão (SPAN) das formulações preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Valores obtidos por difração de laser.

Formulação	Volume					Número				
	SPAN	D _{4,3} (μm)	D _{0,1} (μm)	D _{0,5} (μm)	D _{0,9} (μm)	SPAN	D _{4,3} (μm)	D _{0,1} (μm)	D _{0,5} (μm)	D _{0,9} (μm)
NC ₁	2,50	0,715	0,194	0,391	1,172	1,07	0,474	0,129	0,188	0,330
NC ₂	1,76	0,401	0,151	0,336	0,744	1,43	0,395	0,073	0,122	0,248
NC ₃	1,85	0,329	0,111	0,265	0,602	1,72	0,311	0,039	0,076	0,170
NC _{4-R0B}	1,77	0,192	0,034	0,159	0,356	1,37	0,192	0,035	0,065	0,124
NC ₅	1,90	0,248	0,086	0,203	0,472	1,51	0,243	0,036	0,068	0,139
NC _{1-R0B}	1,56	0,159	0,067	0,134	0,276	1,29	0,158	0,034	0,063	0,116
LNC ₁	1,97	0,226	0,079	0,181	0,436	1,43	0,223	0,035	0,066	0,129
LNC _B	1,43	0,148	0,066	0,128	0,249	1,28	0,147	0,034	0,063	0,114
NC _B	1,32	0,155	0,073	0,137	0,254	1,25	0,153	0,039	0,069	0,125
LNC _L	1,78	0,176	0,068	0,142	0,324	1,31	0,175	0,034	0,063	0,117
NC _L	1,68	0,170	0,068	0,140	0,303	1,31	0,167	0,034	0,063	0,117

5.4 Turbiscan Lab®

Nos testes de avaliação de estabilidade física, as formulações contendo PVA apresentaram transmitância menor que 0,2%. Dessa forma, apenas o perfil de luz retroespalhada foi analisado. Os perfis de retroespalhamento demonstram que as formulações NC₁₉₀₋₁₆₅ a MC₂₀₄₋₁₀₀ apresentam provavelmente excesso de óleo (TCC) através da tendência a migração das partículas caracterizada pelo fenômeno de cremagem (figuras 24 a 28). Esta técnica é vantajosa porque a amostra pode ser analisada sem diluição prévia. O volume utilizado para análise das formulações NC₁₉₀₋₁₆₅ a NC₁₉₀₋₁₀₀ foi de 20 mL enquanto que para a formulação MC₂₀₄₋₁₀₀ foi de 5 mL devido ao volume total desta última formulação. O menisco das formulações está marcado nos gráficos.

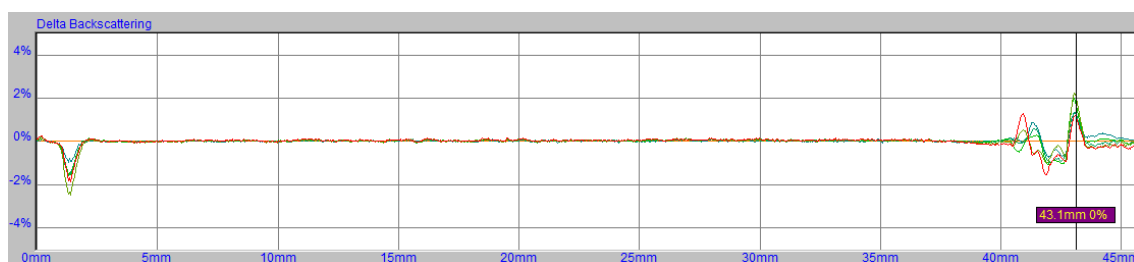


Figura 24. Perfil de retroespalhamento da NC₁₉₀₋₁₆₅. O menisco está marcado na linha traçada em 43,1 mm.

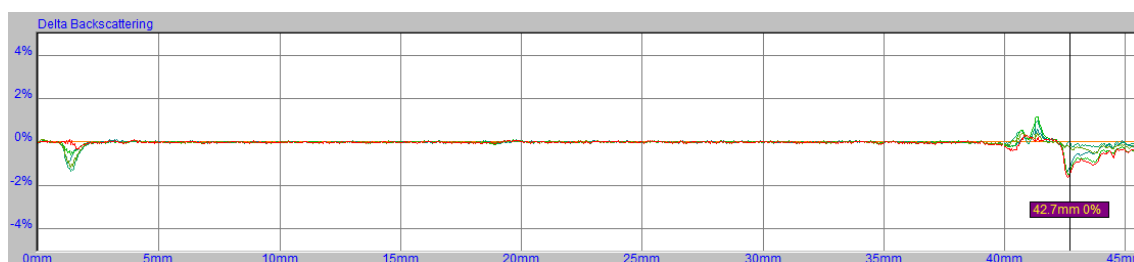


Figura 25. Perfil de retroespalhamento da NC₁₉₀₋₁₂₀. O menisco está marcado na linha traçada em 42,7 mm.

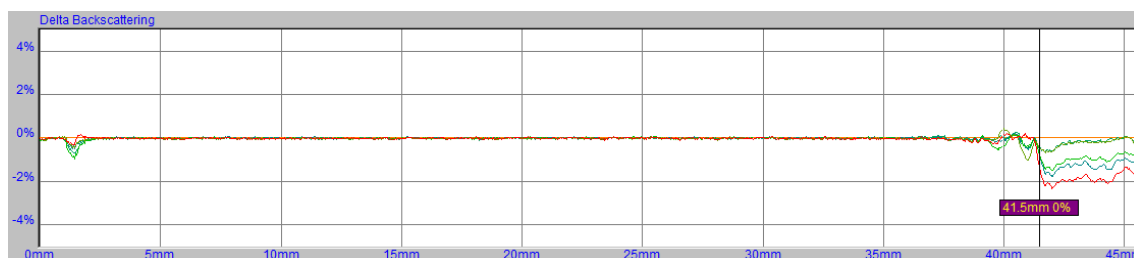


Figura 26. Perfil de retroespalhamento da NC₁₉₀₋₈₅. O menisco está marcado na linha traçada em 41,5 mm.

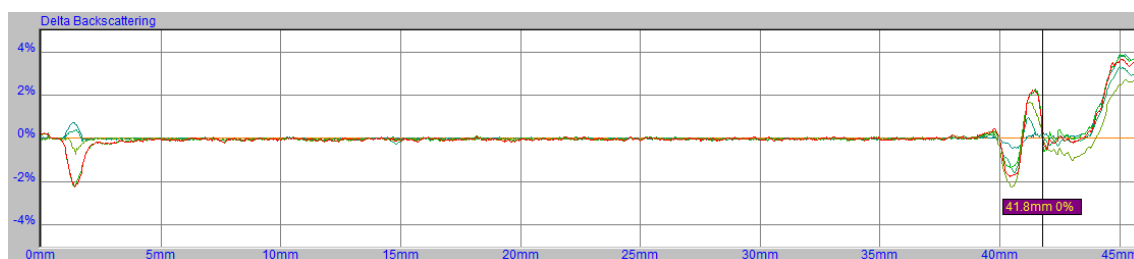


Figura 27. Perfil de retroespalhamento da NC₁₉₀₋₁₀₀. O menisco está marcado na linha traçada em 41,8 mm.

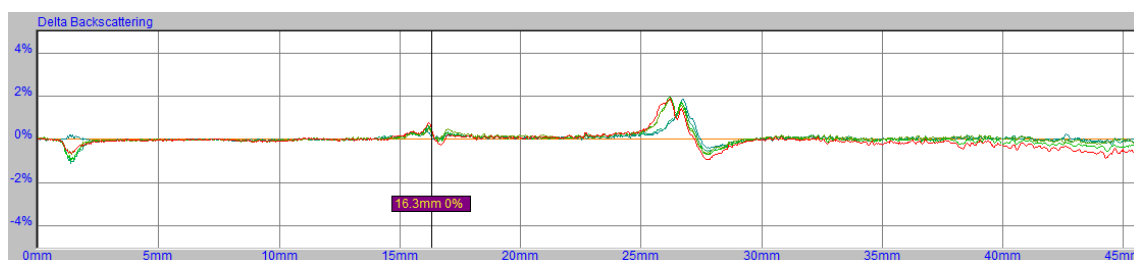


Figura 28. Perfil de retroespalhamento da MC₂₀₄₋₁₀₀. O menisco está marcado na linha traçada em 16,3 mm.

5.5 Permeação cutânea

As figuras 29 e 30 mostram imagens em duas (2D) e três dimensões (3D) obtidas por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) das amostras após experimento de penetração cutânea para LNC_L e NC_L, respectivamente, marcadas com rodamina B quimicamente ligada ao polímero. Observou-se que as NC_L foram capazes de penetrar mais profundamente através da pele, enquanto que as LNC_L permaneceram nas camadas mais externas. Este resultado pode ser explicado pela maior rigidez das nanocápsulas de núcleo lipídico comparada às nanocápsulas poliméricas conforme estudo realizado com partículas similares preparadas com metoxicinamato de octila e triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico, além de monoestearato de sorbitano para as primeiras (FIEL e col., 2010). Portanto, pode-se concluir que as partículas de LNC_L apresentam grande capacidade para atuarem como reservatório na epiderme e estrato córneo. Além disso, pode-se vislumbrar que variando-se a concentração de monoestearato de sorbitano para valores inferiores pode-se modular a penetração das nanocápsulas de núcleo lipídico.

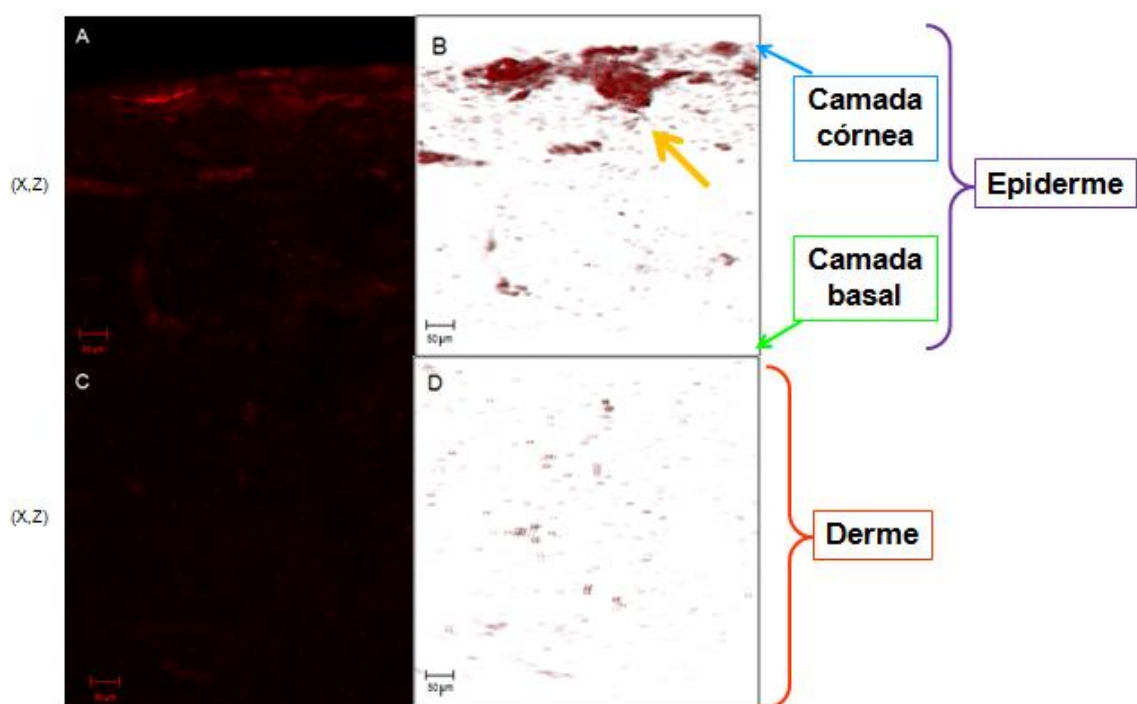


Figura 29. Imagens 2D (A e C) (barra 50 µm) e 3D (B e D) da epiderme de pele de porco no microscópio confocal de varredura a laser das LNC_L em profundidade (X,Z) e aumento 10X. A flecha amarela mostra a penetração dos nanocarreadores nas camadas da pele.

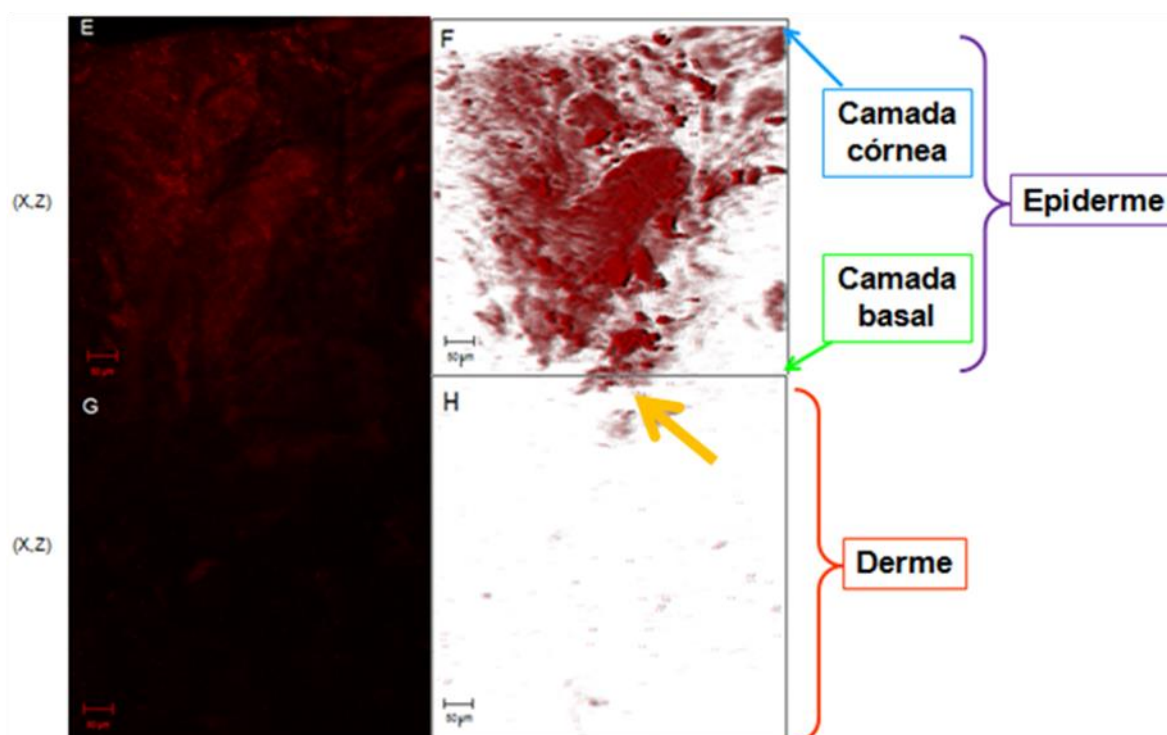


Figura 30. Imagens 2D (E e G) (barra 50 μm) e 3D (F e H) da epiderme de pele de porco no microscópio confocal de varredura a laser das NCL em profundidade (X,Z) e aumento 10X. A flecha amarela mostra a penetração dos nanocarreadores nas camadas da pele.

6. CONCLUSÕES

Não foi possível obter formulações com distribuições monomodais nanométricas com médias de 200 e 800 nm pelo método de emulsificação-difusão. Através do método deposição interfacial de polímero foi possível obter distribuições monomodais de nanocápsulas poliméricas e nanocápsulas de núcleo lipídico com polímero covalentemente ligado a rodamina B. A distribuição dos nanocarreadores nas camadas da pele foi determinada por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM). A técnica de microscopia confocal demonstrou que as nanocápsulas poliméricas (NC) penetraram mais profundamente que as nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC). Estes resultados são promissores na aplicação de nanocápsulas para fins cosméticos e dermatológicos onde poder-se-ia modular a penetração cutânea, pelo uso de nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) para efeito reservatório na epiderme ou diminuindo a concentração de monoestearato de sorbitano para modular a penetração em camada planejada da pele.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H.; FESSI, H. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 1818-1825, 2004b.

ARAYACHUKEAT, S.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. P.; TREE-UDOM, T. Retinyl acetate-loaded nanoparticles: dermal penetration and release of the retinyl acetate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, p. 281-288, 2011.

BABAK, V.G.; BAROS, F.; BOULANOUAR, O.; BOURY, F.; FROMM, M.; N.R. KILDEEVA, N.R.; UBRICH, N.; MAINCENT, P. Impact of bulk and surface properties of some biocompatible hydrophobic polymers on the stability of methylene chloride-in-water mini-emulsions used to prepare nanoparticles by emulsification–solvent evaporation, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 59, p. 194–207, 2007.

BINDSCHAEDLER, C.; GURNY, R.; DOELKER, E. Process for preparing a powder of water-insoluble polymer which can be redispersed in a liquid phase, the resulting powder and utilization thereof. **Patent** n. WO 88/08011, 1988.

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.

COUVREUR, P.; BARRAT, G; FATTAL, E; LEGRAND, P; VAUTHIER, C. Nanocapsule Technology: A Review. **Therapeutic Drug Carrier Systems**. v. 19, p. 99-134, 2002.

COUVREUR, P.; VAUTHIER, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. **Pharmaceutical Research**, v. 23, p. 1417-1450, 2006.

CRUZ, L.; SOARES, L. U.; DALLA COSTA, T.; MEZZALIRA, G.; DA SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S; POHLMANN, A. R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, p. 198-205, 2006.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.-P. Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanoparticles. **US Patent** n. 5.118.528, 1988.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. r1-r4, 1989.

FIEL, L. A.; ALENCAR, L. M. R.; SANTIAGO, T. M.; ADORNE, M. D.; GUTERRES, S. S.; SOUZA, J. S.; POHLMANN, A. R. Oily-core composition determines deformation properties of polymeric nanoparticles. 17th IMC, 2010.

GALINDO-RODRIGUEZ, S.; ALLEMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification–diffusion, and nanoprecipitation methods, **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 1428–1439, 2004.

GOPEE, N. V.; ROBERTS, D. W.; WEBB, P.; COZART, C. R.; SIITONEN, P. H.; LATENDRESSE, J. R.; WARBITTON, A. R.; YU, W. W.; COLVIN, V. L.; WALKER, N. J.; HOEARD, P. C.; Quantitative Determination of Skin Penetration of PEG-Coated CdSe Quantum Dots in Dermabraded but not Intact SKH-1 Hairless Mouse Skin. **Toxicological Sciences**, v. 111, p. 37-48, 2009.

GU, H.; ROY, K. Topical permeation enhancers efficiently deliver polymer micro and nanoparticles to epidermal Langerhans' cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.14, p. 265-273, 2004.

GUTERRES, S. S.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R. Preparação e aplicações de nanopartículas para liberação controlada de fármacos - ISBN 8573799293. In: Marcelo M. Morales. (Org.). **Terapias avançadas: células tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada a saúde**: Atheneu, cap. 17 , p. 247-264, 2007a.

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, 2007b.

JÄGER, E.; VENTURINI, C. G.; POLETTI, F. S.; COLOMÉ, L. M.; POHLMANN, J. P. U.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 130-140, 2009.

LADEMANN, J.; RICHTER, H.; TEICHMANN, A.; OTBERG, N.; BLUME-PEYTAVI, U.; LUENGO, J.; WEIB, B.; SCHAEFER, U. F.; LEHR, C-M.; WEPF, R.; STERRY, W. Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 66, p. 159-164, 2007.

LEROUX, J.C.; ALLEMANN, E.; DOELKER, E.; GURNY, R. New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 41, p. 14-18, 1995.

MENGUAL, O.; MEUNIER, G.; CAYRE, I.; PUECH, K.; SNABRE, P. Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: the TURBISCAN MA 1000. **Colloids and Surfaces A: Physicochemistry and Engineering Aspects**, v. 152, p. 111-123, 1999.

MOINARD-CHECOT, D.; CHEVALIER, Y.; S.BRIANÇON, S.; FESSI, H.; GUINEBRETIERE, S. Nanoparticles for drug delivery: Review of the formulation and process difficulties illustrated by the emulsion-diffusion process, **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, p. 2664-2681, 2006.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010.

MÜLLER, C. R.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DALLA COSTA, T.; PESCE DA SILVEIRA, N.; DE LUCCA FREITAS, L.; GUTERRES, S. S. Spray-dried diclofenac-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres. preparation and physicochemical characterization. **Pharmazie**, v. 56, p. 864–867, 2001.

POLETTO, F. S.; FIEL, L. A.; DONIDA, B.; RÉ, M. I.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Controlling the size of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanoparticles prepared by emulsification-diffusion technique using ethanol as surface agent. **Colloids and Surfaces A: Physicochemistry and Engineering Aspects**, v. 324, p. 105–112, 2008.

POLETTO, F. S.; SILVEIRA, R.P.; FIEL, L. A.; DONIDA, B.; RIZZI, M.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Size-Control of Poly(epsilon-aprolactone) Nanospheres by the Interface Effect of Ethanol on the Primary Emulsion Droplets. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, p. 1–9, 2009.

POLETTI, F. S. **Obtenção e caracterização de nanopartículas poliméricas com arquitetura planejada e diâmetro controlado para vetorização a macrófagos e células dendríticas.** Exame de Qualificação (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; FESSI, H.; ALLEMANN, E.; and DOELKER, E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 143, p. 133-141, 1996.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLEMANN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification–diffusion technique. **Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 1056–1062, 1998.

RASTOGI, R.; ANAND, S.; KOUL, V. Flexible polymerosomes - An alternative vehicle for topical delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 72, p. 161-166, 2009.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SHEIHET, L.; CHANDRA, P.; BATHEJA, P.; DEVORE, D.; KOHN, J.; MICHNIAK, B. Tyrosine-derived nanospheres for enhanced topical skin penetration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 350, p. 312-319, 2008.

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

STRAKE, F.; WEISS, B.; LEHR, C-M.; KÖNIG, K.; SCHAEGER, U. F., SCHNEIDER, M. Multiphoton microscopy for the investigations of dermal penetration of nanoparticle-borne drugs. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 2224-2233, 2006.

TEIXEIRA, Z.; ZANCHETTA, B.; MELO, B. A. G.; OLIVEIRA, L. L.; SANTANA, M. H. A.; PAREDES-GAMERO, E. J.; JUSTO, G. Z.; NADER, H. B.; GUTERRES, S. S.; DURÁN, N. Retinyl palmitate flexible polymeric nanocapsules: characterization and permeation studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, p. 374-380, 2010.

VENTURINI, C. G.; JÄGER, E.; OLIVEIRA, C. P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemistry and Engineering Aspects**, v. 375, p. 200–208, 2011.

VOGT, A.; COMBADIÈRE, B.; HADAM, S.; STIELER, K. M.; LADEMANN, J.; SCHAEFER, H.; AUTRAN, B.; STERRY, W.; CLUME-PEYTAVI B. 40 nm, but not 750 or 1,500 nm, nanoparticles enter epidermal CD1a+ cells after transcutaneous application on human skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 1316-1322, 2006.

WU, X.; BIATRY, B.; CAZENUEVE, C.; GUY, R. H.; Drug delivery to the skin from sub-micron polymeric particle formulations: Influence of particle size and polymer hydrophobicity. **Pharmaceutical Research**, v. 26, p. 1995–2001, 2009a.

WU, X.; PRICE, G. J.; GUY, R. H. Disposition of nanoparticles and an associated lipophilic permeant following topical application to the skin. **Molecular pharmaceutics**, v.6, p. 1441-1448, 2009b.

YOU, H. N.; WU, X.; ROUTH, A. F.; GUY, R. H. Dye diffusion from microcapsules with different shell thickness into mammalian skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 72, p. 62-68, 2009.