

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE NANOCÁPSULAS DE
POLI(ε-CAPROLACTONA) E DE EUDRAGIT® S 100 ATRAVÉS
DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA
POR FEIXE DE EMISSÃO DE CAMPO (FEG) E
POR FEIXE DE ÍONS FOCALIZADOS (FIB)**

Thaniele Müller Ramos

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, junho de 2017.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE NANOCÁPSULAS DE
POLI(ε-CAPROLACTONA) E DE EUDRAGIT® S 100 ATRAVÉS
DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA
POR FEIXE DE EMISSÃO DE CAMPO (FEG) E
POR FEIXE DE ÍONS FOCALIZADOS (FIB)**

Thaniele Müller Ramos

Dissertação realizada sob a orientação da Prof^a.
Dra. Silvia Stanisquaski Guterres, apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Materiais da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul em preenchimento parcial dos
requisitos para a obtenção do título de Mestra
em Ciência dos Materiais.

Porto Alegre, junho de 2017.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 OBJETIVOS	14
1.1.1 Objetivo geral	14
1.1.2 Objetivos específicos.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 NANOPARTÍCULAS	16
2.2 ADJUVANTES DE SECAGEM.....	21
2.2.1 Dióxido de silício coloidal.....	22
2.3 POLÍMEROS	23
2.3.1 Poli(ε-caprolactona).....	23
2.3.2 Eudragit ® S 100	24
2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO (BUDNC)	31
3.1.1 Preparação de nanocápsulas com PCL e Eudragit ® S 100	31
3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS MICROAGLOMERADAS	31
3.2.1 Espalhamento de luz dinâmico.....	31
3.2.2 Difração de laser.....	32
3.3 APLICAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS EM SUBSTRATOS ORGÂNICOS	32
3.3.1 Aplicação em substrato tegumentar.....	32
3.3.2 Aplicação em substrato epitelial.....	32
3.4 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 DIÂMETRO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS EM SOLUÇÃO AQUOSA E MICROAGLOMERADAS	35
4.2 FOTOMICROGRAFIAS DOS MICROAGLOMERADOS DE SÍLICA	37
4.3 FOTOMICROGRAFIAS DOS MICROAGLOMERADOS DE LACTOSE	39
4.4 FOTOMICROGRAFIAS DOS MICROAGLOMERADOS DE NANOCÁPSULAS DE PCL COM ADJUVANTE SÍLICA	41
4.5 FOTOMICROGRAFIAS DOS MICROAGLOMERADOS DE NANOCÁPSULAS DE PCL COM ADJUVANTE LACTOSE	43

4.6 FOTOMICROGRAFIAS DOS MICROAGLOMERADOS DE NANOCÁPSULAS DE EUDRAGIT® S 100 COM ADJUVANTE SÍLICA.....	46
4.7 FOTOMICROGRAFIAS DOS MICROAGLOMERADOS DE NANOCÁPSULAS DE EUDRAGIT® S 100 COM ADJUVANTE LACTOSE.....	48
4.8 SUBSTRATO TEGUMENTAR: ANEXOS	53
4.8.1. Fio de cabelo: amostra controle.....	54
4.8.2 Fio de cabelo tratado com adição de suspensão de nanocápsulas de PCL.....	55
4.8.3 Fio de cabelo tratado com adição de suspensão de nanocápsulas de Eudragit® S 100	57
4.8.4 Unha: amostra controle.....	60
4.8.5 Unha tratada com suspensão de nanocápsulas de PCL	61
4.8.6 Unha tratada com suspensão de nanocápsulas de Eudragit® S 100.....	62
4.9 SUBSTRATO TEGUMENTAR: EPIDERME	63
4.9.1 Pele: amostra controle	63
4.9.2 Pele tratada com suspensão de nanocápsulas de PCL	65
4.9.3 Pele tratada com nanocápsulas secas de PCL e adjuvante sílica.....	67
4.9.4 Pele tratada com nanocápsulas secas de PCL e adjuvante lactose	69
4.9.5 Pele tratada com suspensão de nanocápsulas de Eudragit® S 100	72
4.9.6 Pele tratada com nanocápsulas secas de Eudragit® S 100 e adjuvante sílica	74
4.9.7 Pele tratadas com nanocápsulas secas de Eudragit® S 100 e adjuvante lactose....	76
4.10 SUBSTRATO MUCOSO.....	77
4.10.1 Mucosa esofágica: amostra controle.....	77
4.10.2 Mucosa esofágica tratada com suspensão de nanocápsulas de PCL	78
4.10.3. Mucosa esofágica tratada com nanocápsulas secas de PCL e adjuvante sílica ...	80
4.10.4 Mucosa esofágica tratada com nanocápsulas secas de PCL e adjuvante lactose ..	82
4.10.5 Mucosa esofágica tratada com suspensão de nanocápsulas de Eudragit® S 100.	83
4.10.6 Mucosa esofágica tratada com nanocápsulas secas de Eudragit® S 100 e adjuvante sílica	85
4.10.7 Mucosa esofágica tratada com nanocápsulas secas de Eudragit® S 100 e adjuvante lactose.....	87
4.11 COMPARAÇÕES	89
4.11.1 Substrato: cabelo	89
4.11.2 Substrato: unha	90
4.11.3 Substrato: pele	90
4.11.4 Substrato: mucosa esofágica.....	93
5 CONCLUSÕES	95
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
7 ANEXO	113

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE NANOCÁPSULAS E NANOESFERAS POLIMÉRICAS: A) FÁRMACO DISSOLVIDO NO NÚCLEO OLEOSO DAS NANOCÁPSULAS; B) FÁRMACO ADSORVIDO À PAREDE POLIMÉRICA DAS NANOCÁPSULAS; C) FÁRMACO RETIDO NA MATRIZ POLIMÉRICA DAS NANOESFERAS; D) FÁRMACO ADSORVIDO OU DISPERSO MOLECULARMENTE NA MATRIZ POLIMÉRICA DAS NANOESFERAS.....	17
FIGURA 2: MÉTODOS USUAIS EMPREGADOS NA PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS, BASEADOS NA UTILIZAÇÃO DE MONÔMEROS DISPERSOS OU NA PRECIPITAÇÃO DE POLÍMEROS PRÉ-FORMADOS.....	19
FIGURA 3: ESQUEMA DA SÍNTESE DO POLÍMERO POLI(ϵ -CAPROLACTONA).....	24
FIGURA 4: ESTRUTURA QUÍMICA DO EUDRAGIT® S 100.....	25
FIGURA 5: COMPARAÇÃO DO TAMANHO DE DIÂMETRO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COM ESTRUTURAS BIOLÓGICAS.	26
FIGURA 6: COMPARAÇÃO ENTRE TRÊS DIFERENTES FILAMENTOS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA: (A) FILAMENTO DE TUNGSTÊNIO; (B) FILAMENTO DE HEXABORETO DE LANTÂNIO; (C) FILAMENTO FEG.	26
FIGURA 7. IMAGENS DE MODELOS DE NANOCÁPSULAS E MICROCÁPSULAS EXTRAÍDAS DA LITERATURA.	27
FIGURA 8: ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM EQUIPAMENTO <i>DUAL-BEAM FIB-MEV</i>	28
FIGURA 9: PERFIS DE DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS MICROAGLOMERADAS E GRUPO CONTROLE.	36
FIGURA 10: MICROAGLOMERADOS SECOS UTILIZANDO O ADJUVANTE SÍLICA. A: MICROAGLOMERADO ANTES DO CORTE; B: MICROAGLOMERADO PARTIDO ENCONTRADO AO ACASO; C: MICROAGLOMERADO FATIADO DETECTADO POR ELÉTRONS SECUNDÁRIOS INLENS; D: MICROAGLOMERADO FATIADO DETECTADO POR ELÉTRONS RETROESPALHADOS; E: SUPERFÍCIE DO MICROAGLOMERADO; F: SUPERFÍCIE DA FATIA DO MICROAGLOMERADO.	38
FIGURA 11 MICROAGLOMERADOS SECOS UTILIZANDO O ADJUVANTE LACTOSE. A-G : MICROAGLOMERADOS VISTOS EM DIFERENTES MAGNIFICAÇÕES; H-J: MICROAGLOMERADO FATIADO RECOBERTO COM PLATINA.	40
FIGURA 12: MICROAGLOMERADOS SECOS DE NANOCÁPSULAS DE PCL UTILIZANDO O ADJUVANTE SÍLICA. A-D: MICROAGLOMERADOS VISTOS EM DIFERENTES MAGNIFICAÇÕES; E, F: MICROAGLOMERADO FATIADO.	42
FIGURA 13: COMPARAÇÃO DE IMAGENS DE MICROAGLOMERADOS DE PCL COM ADJUVANTE SÍLICA DE OUTROS ESTUDOS COM A IMAGEM OBTIDA NESSE TRABALHO. A= MICROAGLOMERADOS DE PCL COM ADJUVANTE SÍLICA DO PRESENTE ESTUDO, ESCALA 2 μ M; B= MICROAGLOMERADOS DE PCL COM ADJUVANTE SÍLICA DO ESTUDO DE <i>POHLMANN ET AL.</i> 2002, ESCALA 1.39 μ M; C= MICROAGLOMERADOS DE PCL COM ADJUVANTE SÍLICA DO ESTUDO DE <i>RAFFIN ET AL.</i> 2003, ESCALA 2,93 μ M.....	43
FIGURA 14: MICROAGLOMERADOS DE NANOCÁPSULAS FORMADAS POR PCL E O ADJUVANTE LACTOSE. A-H : MICROAGLOMERADOS VISTOS EM DIFERENTES MAGNIFICAÇÕES.	45

FIGURA 15: MICROAGLOMERADOS SECOS DE EUD UTILIZANDO O ADJUVANTE SÍLICA. A, B : MICROAGLOMERADO ANTES DO CORTE; C,D: TOMOGRAFIA DO MICROAGLOMERADO; E: VISUALIZAÇÃO DO INTERIOR DO MICROAGLOMERADO; F: COMPARAÇÃO DO INTERIOR DO MICROAGLOMERADO DETECTADO POR ELÉTRONS SECUNDÁRIOS (ESQUERDA) E RETROESPALHADOS (DIREITA); G-L: NANOCÁPSULAS ENTRE OS POROS DO INTERIOR DO MICROAGLOMERADO.	47
FIGURA 16: COMPARAÇÃO ENTRE MICROAGLOMERADOS DE PCL COM ADJUVANTE DE SECAGEM SÍLICA E A SUPERFÍCIE DE MICROAGLOMERADOS DE EUD COM ADJUVANTE DE SECAGEM SÍLICA.	48
FIGURA 17: MICROAGLOMERADOS SECOS DE EUD UTILIZANDO O ADJUVANTE LACTOSE. A-E: MICROAGLOMERADO ANTES DO CORTE; F-H: TOMOGRAFIAS DO MICROAGLOMERADO E IMAGENS REALIZADAS POR DETECÇÃO DE ELÉTRONS RETROESPALHADOS.	50
FIGURA 18: COMPARAÇÃO DE IMAGENS ENTRE MICROAGLOMERADOS DE: A- SUPERFÍCIE DE MICROAGLOMERADOS DE LACTOSE PURA OBTIDAS NESSE TRABALHO; B- SUPERFÍCIE DE PCL COM ADJUVANTE DE SECAGEM LACTOSE OBTIDA NESSE TRABALHO; C- SUPERFÍCIE DE MICROAGLOMERADOS DE EUD COM ADJUVANTE DE SECAGEM LACTOSE OBTIDA NESSE TRABALHO; D- SUPERFÍCIE DE MICROAGLOMERADOS DE LACTOSE PURA OBTIDAS EM OUTRO ESTUDO; E- SUPERFÍCIE DE MICROAGLOMERADOS DE EUD COM ADJUVANTE LACTOSE OBTIDOS EM OUTRO ESTUDO.	51
FIGURA 19: COMPARAÇÃO DAS FORMULAÇÕES ANALISADAS: SÍLICA PURA (A), LACTOSE PURA (B), NANOCÁPSULAS DE PCL SECAS COM ADJUVANTE SÍLICA (C), NANOCÁPSULAS DE PCL SECAS COM ADJUVANTE LACTOSE (D), NANOCÁPSULAS DE EUD SECAS COM ADJUVANTE SÍLICA (E), NANOCÁPSULAS DE EUD SECAS COM ADJUVANTE LACTOSE (F).	53
FIGURA 20: AMOSTRA CONTROLE DE FIO DE CABELO HUMANO. A-D: SUPERFÍCIE DE FIO DE CABELO HUMANO; E, F: ANÁLISE DO INTERIOR DA ESTRUTURA CAPILAR.	55
FIGURA 21: FIO DE CABELO HUMANO TRATADO COM SUSPENSÃO DE NANOCÁPSULAS DE PCL A: SUPERFÍCIE DO FIO DE CABELO HUMANO; B: DETALHES NAS ESCAMAS CAPILARES; C: NANOESTRUTURA; D-F: CORTE NA ESTRUTURA.	57
FIGURA 22: FIO DE CABELO HUMANO TRATADO COM SUSPENSÃO DE NANOCÁPSULAS DE EUDRAGIT® S 100. A-D: SUPERFÍCIE DO FIO DE CABELO HUMANO; E-G: DETALHES NAS ESCAMAS CAPILARES.	59
FIGURA 23: AMOSTRA CONTROLE DE UNHA HUMANA: SUPERFÍCIE DAS PLACAS QUERATINOSAS COM CORTE (A,B) E DETALHES DENTRO DO CORTE (C,D).	60
FIGURA 24: AMOSTRA DE UNHA HUMANA TRATADA COM SUSPENSÃO DE NANOCÁPSULAS DE PCL: A,B: SUPERFÍCIE DAS PLACAS QUERATINOSAS; C: NANOESTRUTURA NA SUPERFÍCIE DA PLACA; D-F: DETALHES DENTRO DO CORTE.	61
FIGURA 25: SUBSTRATO DE UNHA HUMANA TRATADA COM SUSPENSÃO DE NANOCÁPSULAS DE EUDRAGIT® S 100. A,B: SUPERFÍCIE DAS PLACAS QUERATINOSAS COM CORTE; C: DETALHE DENTRO DO CORTE; D: MICROESTRUTURA E RESPECTIVA MEDIDA (12.82µM DE DIÂMETRO E 129.1 µM ² DE ÁREA).	63
FIGURA 26: AMOSTRA CONTROLE DE SUBSTRATO BIOLÓGICO DE PELE (DE ORELHA) SUÍNA. A: ASPECTO GERAL; B: DETALHE DE PREGAS CUTÂNEAS; C-F: DIFERENTES MAGNIFICAÇÕES DA SUPERFÍCIE DO SUBSTRATO.	65

FIGURA 27: SUBSTRATO BIOLÓGICO DE PELE SUÍNA TRATADA COM SUSPENSÃO DE NANOCÁPSULAS DE PCL. A E B - VISÃO GERAL DAS AMOSTRAS; C: DETALHE NAS PREGAS EPIDÉRMICAS PRÓXIMAS AO PELO; D-H: SUPERFÍCIE DO SUBSTRATO EM DIFERENTES MAGNIFICAÇÕES; I: PRESENÇA DE NANOESTRUTURAS.....	66
FIGURA 28: SUBSTRATO BIOLÓGICO DE PELE DE ORELHA SUÍNA TRATADA COM NANOCÁPSULAS SECAS DE PCL E ADJUVANTE SÍLICA. A: ASPECTO GERAL DA PELE COM PRESENÇA DE PELO; B: PELE AO REDOR DO PELO; C: PRESENÇA DE NANOESTRUTURAS NA SUPERFÍCIE EPIDÉRMICA; D-I: NANOESTRUTURAS EXIBIDAS NA IMAGEM 28-C E A PELE NO ENTORNO; J E K: VISÃO GERAL DA SUPERFÍCIE DO PELO DA IMAGEM 28-A; L: NANOESTRUTURA LOCALIZADA SOBRE O PELO EM MAIOR DETALHE.	68
FIGURA 29: COMPARAÇÃO ENTRE MICROAGLOMERADOS DE NANOCÁPSULAS DE PCL COM ADJUVANTE SÍLICA NO TRATAMENTO DE PELE SUÍNA (A), NANOCÁPSULAS DE PCL COM ADJUVANTE SÍLICA SOBRE PELO NO TRATAMENTO DE PELE SUÍNA (B), PÓS SECOS DE MICROAGLOMERADOS DE NANOCÁPSULAS DE PCL COM ADJUVANTE SÍLICA (C), SUPERFÍCIE DE CABELO HUMANO TRATADO COM SUSPENSÃO DE NANOCÁPSULAS DE PCL (D).....	70
FIGURA 30: SUBSTRATO DE PELE SUÍNA TRATADA COM NANOCÁPSULAS DE PCL E ADJUVANTE LACTOSE A: ASPECTO GERAL; B E C: DETALHES NA SUPERFÍCIE DA PELE EM DIFERENTES MAGNIFICAÇÕES; D: VISÃO GERAL DE PELO PRESENTE NO SUBSTRATO; E: PELO ENCONTRADO AO ACASO COM CORROSÕES NA SUPERFÍCIE; F: DETALHE DE ESCAMA DO PELO EXIBIDO EM E.....	71
FIGURA 31: SUBSTRATO DE PELE SUÍNA TRATADA COM SUSPENSÃO DE NANOCÁPSULAS DE EUDRAGIT ® S 100. A-C: SUBSTRATO DE PELE PRÓXIMO A FOLÍCULOS PILOSOS; D-F: SUPERFÍCIE DE FIO DE PELO DO SUBSTRATO CUTÂNEO; G-O: SUPERFÍCIE DA PELE SUÍNA COM AS NANOESTRUTURAS DO TRATAMENTO EM DIFERENTES MAGNIFICAÇÕES.	73
FIGURA 32: SUBSTRATO DE PELE SUÍNA TRATADA COM PÓS DE NANOCÁPSULAS DE EUDRAGIT ® S 100 E ADJUVANTE SÍLICA. A-C: SUBSTRATO DE PELE SUÍNA PRÓXIMAS A FOLÍCULOS PILOSOS; D-L: SUPERFÍCIE CUTÂNEA COM PRESENÇA DE MICROAGLOMERADOS DE NANOCÁPSULAS EM DIFERENTES MAGNIFICAÇÕES; M-O: DETALHE DOS MICROAGLOMERADOS EM DIFERENTES MAGNIFICAÇÕES.	75
FIGURA 33: SUBSTRATO DE PELE DE ORELHA SUÍNA TRATADA COM PÓS DE NANOCÁPSULAS DE EUDRAGIT ® S 100 E ADJUVANTE LACTOSE. A-C: VISÃO GERAL DO SUBSTRATO DE PELE SUÍNA PRÓXIMAS A FOLÍCULOS PILOSOS; D-F: SUPERFÍCIE CUTÂNEA COM PRESENÇA DE MICROAGLOMERADOS DE NANOCÁPSULAS EM DIFERENTES MAGNIFICAÇÕES; M-O: MICROAGLOMERADOS NA SUPERFÍCIE DO PELO ANEXO À PELE.	77
FIGURA 34: AMOSTRA CONTROLE DO SUBSTRATO DE MUCOSA ESOFÁGICA SUÍNA. A-C: SUPERFÍCIE DO TECIDO MUCOSO EM DIFERENTES MAGNIFICAÇÕES.....	78
FIGURA 35: SUBSTRATO BIOLÓGICO DE MUCOSA ESOFÁGICA SUÍNA TRATADA COM SUSPENSÃO DE NANOCÁPSULAS DE PCL A-J: SUPERFÍCIE DO SUBSTRATO EM DIFERENTES MAGNIFICAÇÕES; K-L DETALHE DE UMA AGLOMERAÇÃO DE NANOCÁPSULAS ENCONTRADA SOBRE A SUPERFÍCIE.	80
FIGURA 36: SUBSTRATO DE MUCOSA ESOFÁGICA SUÍNA TRATADA COM NANOCÁPSULAS DE PCL COM ADJUVANTE SÍLICA. A-C: VISÃO GERAL DA SUPERFÍCIE DO TECIDO MUCOSO, D-F: PREGAS NA SUPERFÍCIE DA MUCOSA; G-L DETALHES DA SUPERFÍCIE DO SUBSTRATO COM PRESENÇA DE NANOCÁPSULAS.	81

FIGURA 37: AMOSTRA DE SUBSTRATO DE MUCOSA ESOFÁGICA TRATADA COM PÓS DE NANOCÁPSULAS DE PCL COM ADJUVANTE LACTOSE. A-E: VISÃO GERAL DA SUPERFÍCIE DO TECIDO MUCOSO; F-I: DETALHES DA SUPERFÍCIE DO SUBSTRATO.	83
FIGURA 38: SUBSTRATO MUCOSO ESOFÁGICO SUÍNO TRATADO COM SUSPENSÃO DE NANOCÁPSULAS DE EUDRAGIT® S 100. A-C: VISÃO GERAL DO SUBSTRATO; D - F E J-L: PRESENÇA DE NANOCÁPSULAS ISOLADAS EM DIFERENTES REGIÕES DO TECIDO MUCOSO. EM F, A MEDIDA DE DIÂMETRO DA NANOCÁPSULA É 126,5 NM E ÁREA DE 12569 NM ² . G-I: PRESENÇA DE AGLOMERAÇÕES DE NANOCÁPSULAS DE EUD.	84
FIGURA 39: SUBSTRATO DA MUCOSA ESOFÁGICA SUÍNA TRATADA COM NANOCÁPSULAS SECAS DE EUDRAGIT® S 100 E ADJUVANTE SÍLICA. A E B: VISÃO GERAL DO SUBSTRATO; 39-C E F-L: REVELAM A PRESENÇA DE NANOCÁPSULAS; D, E, M-R: MICROAGLOMERADOS DE NANOCÁPSULAS.	86
FIGURA 40: SUBSTRATO DE MUCOSA ESOFÁGICA SUÍNA TRATADA COM NANOCÁPSULAS SECAS DE EUDRAGIT® S 100 E ADJUVANTE LACTOSE. A-L APRESENTAM DIFERENTES REGIÕES DO SUBSTRATO COM AMPLA DISTRIBUIÇÃO DE NANOCÁPSULAS EM TODAS AS ÁREAS ANALISADAS.	88
FIGURA 41: COMPARAÇÃO DOS SUBSTRATOS DE FIO DE CABELO HUMANO: A-CONTROLE; B- FIO DE CABELO HUMANO TRATADO COM SUSPENSÃO DE NANOCÁPSULAS DE PCL E C- FIO DE CABELO HUMANO TRATADO COM SUSPENSÃO DE NANOCÁPSULAS DE EUD.	89
FIGURA 42: COMPARAÇÃO DOS SUBSTRATOS DE UNHAS HUMANAS: A-CONTROLE; B- UNHA TRATADA COM SUSPENSÃO DE NANOCÁPSULAS DE PCL E C- UNHA TRATADA COM SUSPENSÃO DE NANOCÁPSULAS DE EUD.	90
FIGURA 43: COMPARAÇÃO ENTRE AS IMAGENS DE SUBSTRATO DE PELE DE ORELHA SUÍNA DOS DIFERENTES TRATAMENTOS APLICADOS NESSA PESQUISA. A- AMOSTRA CONTROLE DE PELE; B- SUBSTRATO COM SUSPENSÃO DE PCL; C- SUBSTRATO COM NANOCÁPSULAS DE PCL COM SÍLICA; D- SUBSTRATO COM NANOCÁPSULAS DE PCL COM LACTOSE; E- SUBSTRATO COM SUSPENSÃO DE EUD; F - SUBSTRATO COM NANOCÁPSULAS DE EUD COM SÍLICA; G- SUBSTRATO COM NANOCÁPSULAS DE EUD COM LACTOSE.	92
FIGURA 44: COMPARAÇÃO ENTRE IMAGENS DE SUBSTRATO DE MUCOSA ESOFÁGICA DOS DIFERENTES TRATAMENTOS APLICADOS NESSA PESQUISA. A- AMOSTRA CONTROLE DE MUCOSA ESOFÁGICA; B- SUBSTRATO COM SUSPENSÃO DE NANOCÁPSULAS DE PCL; C- SUBSTRATO COM NANOCÁPSULAS DE PCL COM ADJUVANTE SÍLICA; D- SUBSTRATO COM NANOCÁPSULAS DE PCL COM LACTOSE; E- SUBSTRATO COM SUSPENSÃO DE NANOCÁPSULAS DE EUD; F- SUBSTRATO COM NANOCÁPSULAS DE EUD COM SÍLICA; G-SUBSTRATO COM NANOCÁPSULAS DE EUD COM LACTOSE.	94

LISTA DE ABREVIATURAS

EUD- Eudragit ® S 100

FEG - *field emission gun*

FIB - *focused ion beam*

MET - microscopia eletrônica de transmissão

MEV - microscopia eletrônica de varredura

NC - nanocápsulas

PCL - poli(ϵ -caprolactona)

AGRADECIMENTOS

À orientadora professora Dr^a. Silvia Guterres por todo o conhecimento compartilhado, pela excelente orientação, atenção e carinho para comigo durante todo o percurso deste projeto.

Às colegas de laboratório Denise Jornada, Karina Paese e Kelly Zatta por me ensinarem todos os passos da preparação de nanocápsulas poliméricas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais – UFRGS pela oportunidade de desenvolvimento acadêmico e ensino viabilizado.

Ao Centro de Microscopia e Microanálise – UFRGS pelos equipamentos disponibilizados. Ao Daniel Baptista, Fátima Guma e Raquel Wigg pelo apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo subsídio financeiro e fomento científico.

Aos meus pais, Tania e Gernani, e meus irmãos, Tanise e Emanuel, pela educação e amor incondicional desde sempre.

Ao Rafael dos Reis pelo auxílio nesse trabalho, bem como o grande carinho e companheirismo.

*Le cadeau de la microscopie, c'est au-delà, de la
beauté des images, de nous donner accès à l'Art de la
matière et de nous emmener au cœur des mécanismes, "de la
structure de la matière inerte à la complexité du vivant",
là où l'infiniment petit et l'infiniment grand sont reliés...*

Jeanne Ayache

RESUMO

Nanocápsulas poliméricas são biomateriais muito utilizados na indústria farmacêutica e cosmética como carreadores de fármacos, porém, o tamanho nanométrico desses nanomateriais se torna um desafio para a caracterização estrutural. Por isso, neste trabalho foram exploradas as técnicas de microscopia eletrônica de varredura por fonte de emissão de campo -FEG (*field emission gun*) e por feixe de íons focalizados - FIB (*focused ion beam*) para caracterização dos materiais selecionados para essa pesquisa, sendo nanocápsulas produzidas a partir de um poliéster, a poli(ϵ -caprolactona) – PCL ou de um acrilato, o Eudragit® S 100 - EUD e posteriormente aplicadas em substratos biológicos, sendo eles unha e cabelo humano, pele (de orelhas) e mucosa esofágica suína. As suspensões de nanocápsulas poliméricas foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (nanoprecipitação) para cada modelo de nanocápsulas estudadas nesse trabalho (PCL e EUD), e posterior secagem por aspersão mediante nebulização em *spray-dryer* com adjuvante de secagem lactose a 1% ou Aerosil® 200 a 3%. As nanocápsulas poliméricas tiveram o seu diâmetro de partícula e índice de polidispersão analisados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico e caracterização quanto ao seu tamanho e SPAN pela técnica de difração de laser. Após, cada tipo amostral foi aplicado em substrato tegumentar de unha e cabelo humano, pele e mucosa esofágica suína. E por fim, analisadas em equipamento *dual-beam* Auriga-Zeiss utilizando as técnicas FEG e FIB. Entre os resultados, das formulações de pós secos, a que apresentou morfologia mais constante foi a de nanocápsulas de PCL com adjuvante sílica. A aplicação das nanocápsulas em sistemas tegumentares e epiteliais foi muito válida para ilustrar os processos de interação das nanoestruturas e substratos biológicos, observando diferentes formas de dispersão e bioadesão, por exemplo. O equipamento *dual-beam* empregado representou uma ferramenta muito apropriada para caracterização em resolução melhorada desses nanomateriais estudados, em comparação a estudos anteriores, sendo possível trazer alguns novos dados, como por exemplo, a evidência da grande diferença morfológica entre microaglomerados de nanocápsulas de PCL em comparação às de EUD.

Palavras-chave: nanocápsulas poliméricas – poli(ϵ -caprolactona) – Eudragit® S 100 – FEG-MEV – FIB-MEV – microscopia eletrônica de varredura

ABSTRACT

Polymeric nanocapsules are biomaterials widely used in the pharmaceutical and cosmetic industry as carriers of drugs, however, the nanometric size of these nanomaterials becomes a challenge for the structural characterization. Therefore, in this work, scanning electron microscopy by field emission gun (FEG) and focused ion beam (FIB) were explored to characterize the materials selected for this research, being nanocapsules produced by a polyester, poly (ϵ -caprolactone) - PCL or an acrylate, Eudragit $\text{\textcircled{R}}$ S 100 - EUD, and subsequently applied to biological substrates, such as human nails and hair, swine skin (from ears) and esophageal mucosa. Polymer nanocapsules suspensions were prepared by the preformed polymer interfacial deposition method (nanoprecipitation) for each model of nanocapsules studied in this work (PCL and EUD), and after drying by spray-dryer with lactose 1% or Aerosil $\text{\textcircled{R}}$ 200 3%. The polymer nanocapsules had their particle diameter and polydispersity index analyzed by the technique of dynamic light scattering and characterization of their size and SPAN by the laser diffraction technique. Afterwards, each sample type was applied to tegumentary substrate of human nail and hair, swine skin and esophageal mucosa. And finally, analyzed in dual-beam equipment Auriga-Zeiss using FEG and FIB techniques. Among the results, of the dry powder formulations, the one that presented more constant morphology was PCL nanocapsules with silica adjuvant. The application of nanocapsules in tegumentary and epithelial systems was very valid to illustrate the interaction processes of nanostructures and biological substrates, observing different forms of dispersion and bioadhesion, for example. The dual-beam equipment employed was a very appropriate tool for the characterization of these nanomaterials in improved resolution, compared to previous studies. It was possible to bring some new data, such as the evidence of the morphological difference between PCL nanocapsules microclusters in compared to EUD.

Keywords: polymer nanocapsules - poly (ϵ -caprolactone) – Eudragit $\text{\textcircled{R}}$ S 100 - FEG-SEM - FIB-SEM - scanning electron microscopy

Müller R., Thaniele

1 INTRODUÇÃO

Caracterização estrutural de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) e de Eudragit® S 100 através de microscopia eletrônica de varredura por feixe de emissão de campo (FEG) e por feixe de íons focalizados (FIB)

Na área terapêutica, a ciência de nanomateriais traz inovações para atender à demanda de novos tratamentos médicos, tornando-os de ação biológica específica e controlada, diminuindo a toxicidade e efeitos colaterais ao organismo, beneficiando a saúde e o conforto do paciente. Além disso, é relevante o desenvolvimento de meios para a entrega direcionada de fármacos em alvos biológicos de difícil acesso, tais como tumores. Nesse contexto, a nanotecnologia se caracteriza como uma ferramenta promissora.

A microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (FEG-MEV; FEG- *field emission gun*) é uma técnica de alta resolução ideal para caracterização de materiais nanoestruturados. Por sua vez, a microscopia eletrônica de varredura por FIB (FIB-MEV) é uma poderosa técnica de imageamento interno de materiais biológicos, na qual a amostra pode ser repetidamente “fatiada” pelo feixe de íons focalizados (FIB-*focused ion beam*) e a imagem de cada nova face produzida é captada por microscopia eletrônica de varredura. Este processo conhecido como “slice and view” ou tomografia FIB/SEM, pode ser repetido, *ad libitum*, permitindo análise 3D de volumes relativamente grandes com um comprimento de vários micrômetros.

Para esta pesquisa, foram selecionadas nanocápsulas produzidas a partir de um poliéster, a poli(ϵ -caprolactona) ou de um acrilato, o Eudragit® S 100, que são muito utilizados na área farmacêutica e usados pelo grupo de pesquisa da orientadora deste trabalho. Através das tecnologias de microscopia citadas, pretendeu-se chegar ao detalhamento estrutural em escala nanométrica, além de realizar tomografias das nanocápsulas, estudos estes ainda não encontrados na literatura científica para esses tipos de nanomateriais.

As nanocápsulas poliméricas são produzidas na forma de suspensões aquosas. Com a finalidade de prolongar a sua estabilidade frente ao armazenamento e a sua portabilidade, foi desenvolvida uma tecnologia de secagem das mesmas, por *spray-drying*, a qual converte a suspensão em produtos pulverulentos, os quais são passíveis de incorporação em várias formas farmacêuticas finais, como pastas, formulações semi-sólidas e intermediários para a produção de comprimidos ou cápsulas de gelatina dura. Assim, as nanocápsulas em suas formas secas formam microaglomerados bastante úteis para a administração tópica, em pele e mucosas, por exemplo, importantes para o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas e cosméticas.

O tema foi consolidado mediante a necessidade de caracterização morfológica destas nanocápsulas microaglomeradas dada à ausência de dados na literatura no que diz respeito a este tópico. Como substrato de estudo, foram escolhidos unha e cabelo humano; pele (orelhas)

e mucosa esofágica suína, devido ao interesse de aplicabilidade de fármacos/cosméticos nesses tecidos para aprimoramento de formulações do grupo de pesquisa.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

* Explorar a técnica de microscopia eletrônica de varredura *dual-beam* por FEG e FIB para a caracterização morfológica das estruturas de nanocápsulas poliméricas microaglomeradas produzidas a partir de poli(ϵ -caprolactona) e Eudragit® S 100 e a interação dessas nanoestruturas com substratos biológicos.

1.1.2 Objetivos específicos

- I. Produzir e caracterizar suspensões de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) ou de Eudragit® S 100 e suas respectivas formas pulverulentas obtidas empregando dois tipos de adjuvantes de secagem, a lactose e a sílica coloidal;
- II. Obter tomografias das nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) e de Eudragit ® S 100;
- III. Analisar a morfologia de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) organizadas na forma de microaglomerados;
- IV. Analisar a morfologia de nanocápsulas de Eudragit ® S 100 organizadas na forma de microaglomerados;
- V. Verificar a interação de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) e Eudragit ® S 100 em suspensão aquosa ou na forma de microaglomerados secos com substratos orgânicos selecionados: pele, mucosa, cabelo e unha;

Müller R., Thaniele

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Caracterização estrutural de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) e de Eudragit ® S 100 através de microscopia eletrônica de varredura por feixe de emissão de campo (FEG) e por feixe de íons focalizados (FIB)

2.1 NANOPARTÍCULAS

Nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais de diâmetros inferiores a 1 μm . Como afirmado por muitos autores, esses sistemas são muito utilizados como carreadores de substâncias, devido a capacidade de transportar e liberar fármacos, podendo ser biocompatíveis com tecidos e células biológicas.^{1,2} Nanomateriais apresentam características diferentes de outros materiais por possuírem aumento relativo da superfície de contato, assim, uma quantidade de nanomateriais se torna muito mais reativa que a mesma quantidade de materiais de dimensões maiores, já que muitas reações químicas ocorrem na superfície das estruturas.³

Os diâmetros diminutos também tornam as nanopartículas capazes de cruzarem seletivamente várias membranas biológicas o que contribui para a uma capacidade de entrega direcionada de fármacos para alvos específicos. Ainda, modificações químicas realizadas na superfície das partículas podem proporcionar um direcionamento ativo a alvos específicos, mediante, por exemplo, mecanismos de reconhecimento molecular (*active targeting*).⁴

As suspensões de nanopartículas podem ser definidas como carreadores submicrométricos de fármacos e englobam as nanoesferas, nanocápsulas, e nanoemulsões, diferindo entre si pela composição da formulação, podendo ser obtidas através de uma mesma técnica de preparação. As potencialidades terapêuticas dessas suspensões coloidais para administração de fármacos têm sido muito pesquisadas nas últimas décadas.⁵

“Nanopartículas” é uma nomenclatura geral para nanocápsulas ou nanoesferas⁶ (Figura 1). Elas podem ser compostas por um ou por múltiplos componentes poliméricos, sendo estabilizadas por interações químicas e físico-químicas. As nanocápsulas são revestidas por uma camada polimérica disposta ao redor de um núcleo oleoso, onde o fármaco pode estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Elas são compostas de menor quantidade de polímero no sistema quando comparado a nanoesferas. As nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido. Elas não apresentam óleo em sua composição, diferentemente das nanocápsulas.^{1,2} Nanocápsulas e nanoesferas são produzidas na forma de suspensão aquosa, geralmente estabilizadas com tensoativos de elevado EHL, como é o caso do polissorbato 80.⁷

Nanoemulsões correspondem a um sistema micelar, constituído pela dispersão de tensoativos e óleo em água.⁵ Podem ser definidas como sistemas heterogêneos nos quais a fase interna, um líquido, é disperso na fase externa, outro líquido, na forma de gotículas, na

presença de um agente emulsionante e tem sido empregadas em sistemas de liberação de fármacos. Suas propriedades físico-químicas devem ser estritamente controladas, visando à administração por via parenteral e a estabilidade do sistema. Há distinção entre microemulsão e nanoemulsão, já que a primeira é um sistema termodinamicamente estável, mas podendo apresentar limitações para administração por via parenteral, na medida em que suas propriedades são fortemente afetadas por alterações de temperatura e/ou diluições. As nanoemulsões são sistemas cineticamente estáveis e apresentam diversas potencialidades como sistemas carreadores de fármacos, especialmente para aqueles de reduzida hidrossolubilidade, embora apresentem instabilidade termodinâmica. Estudos recentes descrevem a possibilidade de redução de toxicidade, aumento de atividade, janela terapêutica, biodisponibilidade e, em alguns casos, uma liberação controlada e direcionada de fármacos incorporados nesses sistemas.⁸

Entre as vantagens da utilização das nanocápsulas estão a sua elevada eficiência de encapsulação do fármaco, devido a otimização da solubilidade do fármaco no núcleo e a proteção contra fatores de degradação (como pH) e irritação do tecido biológico, reduzindo efeitos adversos do fármaco.¹ Esses sistemas são de grande importância também devido às inúmeras aplicações terapêuticas, principalmente, para administração parenteral, oral ou oftálmica. Uma das áreas mais promissoras na utilização das nanopartículas é a vetorização de fármacos anticancerígenos e de antibióticos.⁹

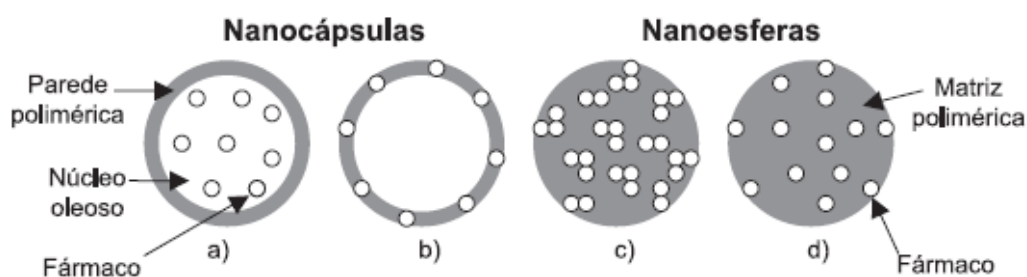


Figura 1: Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas.²

Há vários métodos relatados na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas,¹⁰ os quais podem ser classificados em métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (cianoacrilato de alquila) ou na precipitação de polímeros pré-

formados, tais como poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e, ainda, os copolímeros do ácido metacrílico e de um éster acrílico ou metacrílico.^{2,11,12} As principais etapas dos diferentes métodos de preparação de nanopartículas estão apresentadas na Figura 2.

Alguns estudos foram desenvolvidos com o objetivo de elucidar a organização supramolecular destes sistemas nanoparticulados, bem como a influência que cada componente da formulação apresenta sobre a capacidade de veiculação e entrega de fármacos lipofílicos. Em seu conjunto, os resultados indicam que para cada sistema nanoestruturado há uma conformação única, que é consequência das matérias-primas empregadas para a produção das partículas, do método de preparação, bem como das condições operacionais empregadas.^{13,14,15}

Geralmente, as nanopartículas e as nanocápsulas são apresentadas em formas farmacêuticas líquidas, o que pode levar a uma limitação em termos de estabilidade físico-química devido ao alto teor de água, podendo haver degradação química dos componentes e crescimento microbiano. Assim, a extração da água destes sistemas líquidos pode promover um aumento na estabilidade físico-química das formulações. A técnica de *spray-drying* (secagem por aspersão) é uma ferramenta útil na obtenção de formas farmacêuticas pulverulentas a partir de formas líquidas, como soluções, emulsões, suspensões ou dispersões. Trata-se de uma técnica rápida, de baixo custo e passível de transposição para escalas piloto e industrial. Existem três estratégias para a secagem de nanopartículas através de *spray-drying*: 1) secagem de soluções para obtenção de nanopartículas (processo tipo “bottom up”); 2) secagem de emulsões/dispersões para obtenção de nanopartículas e 3) secagem de nanopartículas pré-formadas.¹⁶

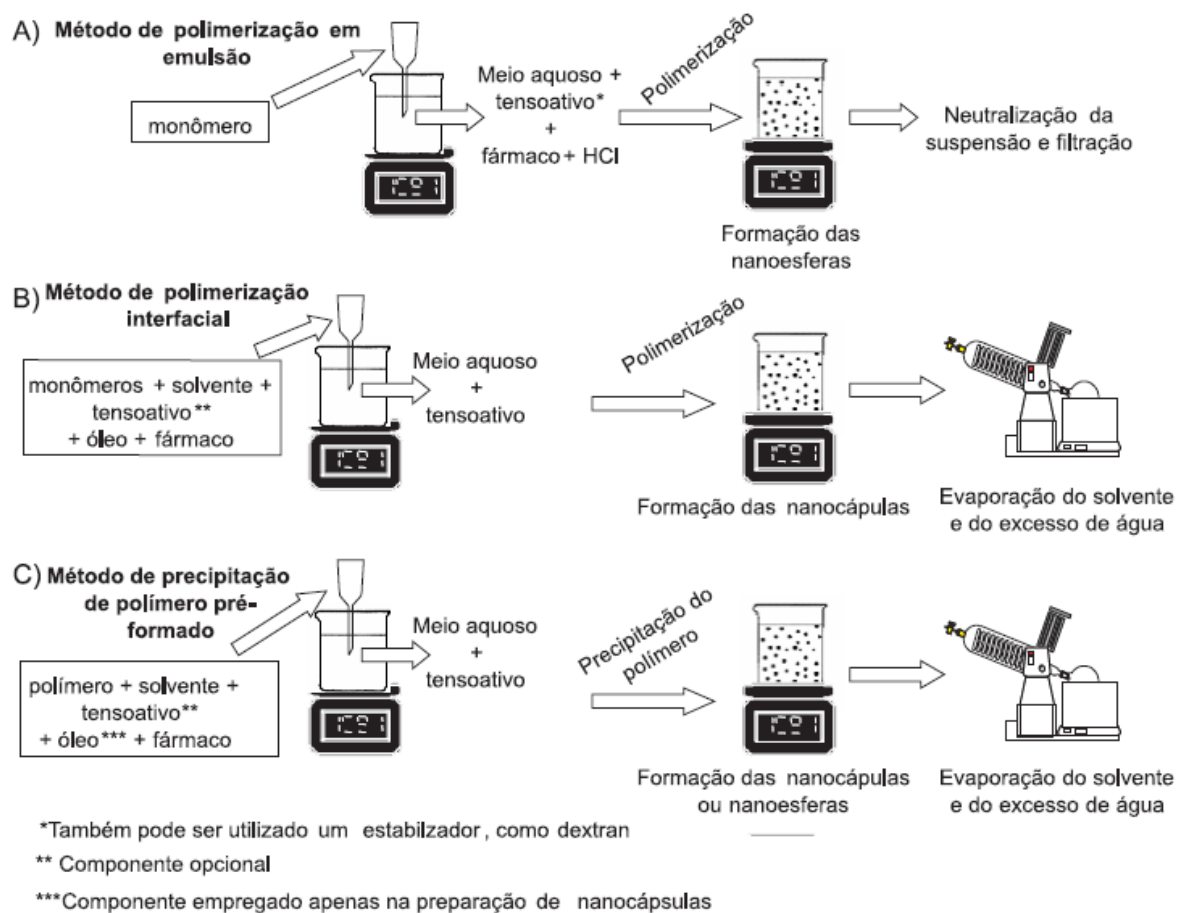


Figura 2: Métodos usuais empregados na preparação de nanopartículas poliméricas, baseados na utilização de monômeros dispersos ou na precipitação de polímeros pré-formados.²

A técnica *spray-drying* tem trazido resultados satisfatórios na preparação de sistemas carreadores microparticulados, com preservação das estruturas supramoleculares (nanoesferas ou nanocápsulas, sendo essas últimas as mais importantes nanopartículas na área de *drug delivery*) de sistemas coloidais, como as nanocápsulas, com a adição de adjuvantes de secagem às suspensões coloidais antes da secagem, sendo frequentemente utilizado na preparação de pós com propriedades farmacológicas e características específicas, tais como tamanho, densidade e forma da partícula. Produtos sólidos são muito mais estáveis do que formas líquidas, trazendo grandes vantagens. A secagem por aspersão oferece vários benefícios como ser um processo de fabricação rápido e de baixo custo, propiciar aumento da escala de produção do material, levar a obtenção de produtos com prazo de validade longo e aplicação em materiais sensíveis ao calor, etc..^{1, 10, 16, 17}

Spray-drying é mais frequentemente proposto como um processo de desidratação e, também, utilizado para microencapsular fármacos. A técnica também tem sido empregada na

preparação de partículas finas redispersíveis usando polímeros como estabilizantes ou inibidores de crescimento de cristais. A produção de partículas finas é muito útil para sólidos pouco solúveis para contornar a baixa biodisponibilidade, aumentando a área de superfície específica de pós, tornando-os muito fluídos. Vários estudos mostram que o tamanho das partículas após *spray-drying* são diretamente proporcionais ao tamanho das gotas da emulsão primária, sendo essa correlação explicada pelo coeficiente do gradiente de tensão superficial, assim como outros fatores, como tempo e modo de cisalhamento das partículas.^{10, 16}

A primeira vez que foi relatado o uso da técnica de *spray-drying* para converter suspensões líquidas contendo matriz ou vesículas de nanopartículas poliméricas foi em 1999, relatado por Guterres e colaboradores,¹⁸ que descreveram esse processo de secagem para suspensões de nanopartículas poliméricas com ou sem fármacos, visando melhorar a estabilidade físico-química das mesmas. Nesse trabalho, foi utilizado o dióxido de silício como adjuvante de secagem que proporcionou um suporte para a secagem das nanopartículas. Essa estratégia é eficiente na preparação de nanopartículas secas como produtos finais ou intermediários na preparação de formas farmacêuticas de administração oral ou dermatológicas.^{16,18,19}

Posteriormente, pesquisas²⁰ propuseram o uso da técnica de *spray-drying* na obtenção de partículas de matriz micrométrica compostas por nanopartículas de fármacos dispersas em uma matriz sólida. As nanopartículas de fármacos, de tamanho menores que 500nm, são formadas por um método anti-solvente usando ao menos um polímero como excipiente para recobrir ou encapsular as nanopartículas, evitando a agregação. É fundamental para obter o tamanho inicial em escala nanométrica das suspensões o uso de ambiente de micromixagem e elevada impregnação ou alta força de cisalhamento. Esse método proposto, em comparação ao convencional, apresenta menor tempo de preparação, baixo custo e conduz a pós mais estáveis contendo nanopartículas com fármacos, sendo o processo aplicado para obter formas farmacêuticas orais, tais como pós, comprimidos, cápsulas ou grânulos, já que aumentam a solubilidade, dissolução e biodisponibilidade de fármacos de baixa solubilidade em água. A maioria dos fármacos aplicados às partículas pré-formadas apresentam característica lipofílica, justamente porque essas partículas tem natureza hidrofóbica.^{16, 20}

Há outros estudos/patentes que focam na aplicação de técnicas por *spray-drying* na produção de nanopartículas poliméricas; no entanto, a técnica clássica de *spray-drying* tem sido melhor estabilizada na obtenção de nanopartículas poliméricas por uma técnica chamada *Nano Spray-Drying*. Estudos têm procurado encontrar a otimização das etapas de produção de diferentes tipos de nanopartículas para aplicação desse método, além de obter uma

compreensão completa dos parâmetros que influenciam as propriedades finais dos pós secos e a viabilidade de produção em alta escala.¹⁶ Pesquisas têm discutido a diminuição dos efeitos colaterais da administração oral de nanopartículas, principalmente focando-se nos antiinflamatórios não-esteróides ou a proteção de fármacos degradáveis no trato gastrointestinal, como peptídios e proteínas.^{5,19}

2.2 ADJUVANTES DE SECAGEM

Amostras são analisadas à temperatura ambiente e sob alto vácuo em todos os microscópios eletrônicos convencionais, já que as moléculas de gás podem espalhar os elétrons/íons e afetar a formação do feixe. Nestas condições, apenas os sistemas farmacêuticos sólidos, tais como pós ou nanopartículas, podem ser vistos com precisão por esse tipo de microscopia. Sendo assim, formulações hidratadas, tais como emulsões, suspensões ou lipossomas, são fortemente afetados durante a análise, ocorrendo a destruição inerente de sua morfologia nativa, além de acometer o próprio equipamento. Assim, para uma análise bem sucedida na câmara de vácuo, a secagem do material é imprescindível, havendo a necessidade do emprego de adjuvantes para tal fim.²¹

As suspensões coloidais poliméricas contendo fármacos em suspensões aquosas são bastante suscetíveis a alterações físico-químicas e crescimento microbiológico durante o armazenamento, apesar de apresentarem potencialidades no aumento da eficácia de fármacos, na diminuição da toxicidade ou, ainda, no desenvolvimento de sistemas de liberação modificados. Dessa forma, a secagem por aspersão (*spray-drying*) foi proposta por nosso grupo de pesquisa para a conversão desses sistemas dispersos aquosos em sistemas sólidos micro- e nanoparticulados, empregando o dióxido de silício coloidal 3% (Aerosil® 200) ou lactose 1% como adjuvantes de secagem. Conforme os estudos, os produtos secos com sílica são compostos pelo adjuvante na forma de aglomerados micrométricos, revestidos com nanopartículas poliméricas.^{6, 22, 23}

As análises morfológicas por microscopia eletrônica de varredura das suspensões de nanocápsulas secas mostraram, após aspersão, a presença de nanoestruturas na superfície das micropartículas com tamanhos compatíveis àqueles determinados nas suspensões originais (diâmetros médios entre 200 e 300 nm).²² Porém, estudos⁶ mostraram que após a secagem de suspensão de nanoesferas, houve uma diminuição no diâmetro das nanoestruturas presentes na superfície das micropartículas, ocorrendo alteração da sua organização estrutural durante a

aspersão, sendo essa alteração atribuída à liberação do tensoativo lipofílico durante o processo de secagem.^{6, 22, 24}

A associação do fármaco ao adjuvante de secagem empregados à suspensão nanoestruturada apenas como um sistema de revestimento e controle da liberação do fármaco foi uma estratégia desenvolvida por pesquisadores para ultrapassar as limitações da secagem por aspersão, que somente era aplicável a fármacos de elevada potência, normalmente administrados em baixas dosagens. Esses novos sistemas foram chamados de micropartículas revestidas com nanopartículas (*nanoparticle-coated microparticles*).^{22, 25}

2.2.1 Dióxido de silício coloidal

O dióxido de silício coloidal apresenta elevada superfície específica e alto poder sorvente, apresentando excelentes resultados na obtenção de produtos secos por aspersão,²⁶ além de proporcionar uma boa estabilidade física, mantendo o aspecto de pó fino e solto, e conferindo maior rendimento ao processo de secagem. De acordo com a literatura, essa boa estabilidade física foi atribuída a uma possível microencapsulação das partículas do pó pelo Aerosil® 200.^{2, 27-29}

Em estudos, amostras com aplicação de altas concentrações de Aerosil® 200 em processo de secagem em temperaturas mais elevadas apresentaram uma maior resistência aos efeitos da higroscopicidade a qual estavam sendo expostos, sendo esse fato atribuído a menor retenção de água pelo extrato seco durante o processo de secagem, como também às propriedades tecnológicas do adjuvante adicionado.^{29, 30}

Segundo estudos³¹, a sílica pirogênica hidrofílica, como o Aerosil® 200, possui em sua superfície grupos silanóis ao final do seu processo de fabricação. Como esses grupos podem liberar prótons para o meio aquoso, é originada uma superfície sólida carregada negativamente. Porém, como todo o sistema de dispersão é eletricamente neutro, esse efeito é compensado nos sítios de carga superficial negativa por contra-íons positivos, onde a primeira camada de carga é fixa e ao redor da partícula na área de uma segunda camada difusa de contra-cargas o potencial elétrico diminui lentamente.³¹

2.2.2 Lactose

A lactose é um carboidrato primário, sendo um dissacarídeo formado por uma glicose e uma galactose. A lactose seca por aspersão é um composto usualmente empregado nas preparações de alimentos e amplamente utilizada no mercado farmacêutico como excipiente quimicamente inerte, aumentando a compressão direta, protegendo a disponibilidade biológica dos fármacos,³² apresentando ação aglutinante e diluente na produção de comprimidos e cápsulas.³³⁻³⁵ Ela é produzida através de uma suspensão aquosa saturada de cristais de α -lactose monoidratada e outros processos que resultam em um material com estreita faixa de granulometria, tornando mais eficazes suas propriedades de fluxo. Durante o processo de compressão, ocorre a deformação das partículas de lactose, ocasionando a redução do volume das mesmas. A deformação controla a área de contato formada entre as partículas durante a compressão, as quais controlam as forças de tensão ou resistência do comprimido. Assim, formam-se ligações entre as partículas por adsorção e ligações por pontes sólidas sob altas pressões de compactação. Geralmente, a α -lactose apresenta morfologia prismática, piramidal e acicular dos cristais presentes.³³

As partículas de lactose se aglomeram devido à fragmentação causada sob intensa pressão. Já a sílica apresenta alta compactabilidade, mesmo em baixa força de compactação, tornando-se vantajosa no desenvolvimento de formulações de encapsulação e apresenta também dureza elevada em relação à lactose.^{2,33} Estudos mostram que a morfologia dos adjuvantes de secagem e das nanocápsulas *spray-dried* variam consideravelmente, sendo que a lactose seca apresenta grandes aglomerados, enquanto as nanocápsulas secas por *spray-drying* apresentam microaglomerados rugosos em um pó homogêneo.³⁶

2.3 POLÍMEROS

2.3.1 Poli(ϵ -caprolactona)

A poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é um poliéster obtido por polimerização de abertura do anel do monômero cíclico ϵ -caprolactona (como é mostrado na Figura 3) utilizando mecanismo aniônico, catiônico, de coordenação ou de catálise de radical.³⁷ PCL é um polímero semicristalino alifático, sendo a cristalinidade diretamente relacionada com o peso molecular, que pode variar entre 10.000 a 80.000 g/mol.^{37, 38} Esse polímero apresenta

características mecânicas flexíveis, como elasticidade e força de tensão que são importantes para a aplicação farmacêutica.³⁷

A poli(ϵ -caprolactona) é biodegradável, biocompatível, apresentando temperatura de transição vítrea muito baixa (-60°C) e ponto de fusão entre 59 e 64°C , dependendo da sua natureza cristalina. A PCL, quando empregada em nanocápsulas apresenta, como propriedade a alta permeabilidade a substâncias, principalmente, se de baixo peso molecular.³⁸ Este polímero é amplamente empregado em estruturas devido a sua biocompatibilidade, sendo um dos mais importantes polímeros biodegradáveis usados como biomateriais. Poliésteres como a PCL apresentam propriedades bioadesivas, conferindo um acréscimo na deposição das partículas em regiões do trato gastrointestinal, aumentando a absorção sistêmica de fármacos. A degradação da PCL em ambientes aquosos é favorecida pelo meio alcalino e por altas temperaturas, ocorrendo por hidrólise química e/ou enzimática, principalmente da ligação éster.^{39,40}

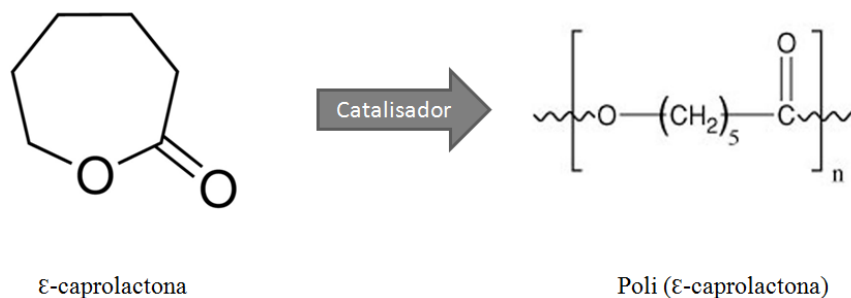


Figura 3: Esquema da síntese do polímero poli(ϵ -caprolactona).⁴¹

2.3.2 Eudragit® S 100

Polímeros polimetacrilatos, como o Eudragit® S 100, têm sido muito utilizados em sistemas de liberação controlada de diversos fármacos. O Eudragit® S 100 apresenta o nome químico de poli(acrilato etila-co-metacrilato de metila-co-metacrilato de trimetilamônio clorídrico). Ele é biocompatível, mas não biodegradável, sendo um copolímero aniônico (apresentando superfície aniônica) baseado nos monômeros de ácido metacrílico e metilmetacrilato (Figura 4) com baixo conteúdo de grupamentos amônio e quartenário (5%), apresentando peso molecular entre 20000 e 25000 g/mol^{-1} . Ele é muito utilizado para produzir sistemas carreadores de fármacos modificados para resistir ao meio gástrico. Durante a

liberação do fármaco, o material não degradável desses polímeros acrílicos apresenta importante fenômeno de transporte de massa.^{25, 38, 42-44}

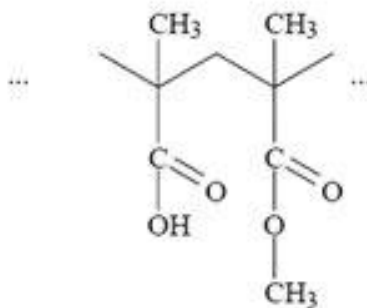


Figura 4: Estrutura química do Eudragit® S 100.⁴²

2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

A microscopia eletrônica de varredura é uma importante ferramenta na caracterização morfológica de nanocápsulas poliméricas, pois possibilita avaliar, além da forma e da superfície das nanoestruturas geradas, o tamanho e a sua distribuição, permitindo aumentos acima de 50.000 vezes e imagens tridimensionais de alta resolução (>1 nm), o que torna essa técnica bastante versátil.⁴⁵ A Figura 5 compara a média do tamanho do diâmetro de nanopartículas poliméricas com a de outras estruturas biológicas comumente analisadas por microscopia eletrônica ou óptica. Observando-se essa figura, é possível verificar que as estruturas que são estudadas nesse trabalho, encontram-se entre as menores pesquisadas, necessitando de poderosas técnicas de análise para serem investigadas.

As nanopartículas são estruturas extremamente pequenas, necessitando de equipamentos com grande poder de resolução para serem bem analisadas. Há inúmeras pesquisas anteriores de vários modelos de nanocápsulas analisadas por microscopia eletrônica, tanto por transmissão, quanto por varredura, como podem ser vistos alguns exemplos da literatura selecionados e expostos na Figura 7. No entanto, as imagens resultantes não apresentam resolução suficiente para uma boa caracterização morfológica. Na literatura, as imagens são registradas principalmente de microcápsulas, em comparação às nanocápsulas, justamente por essas últimas serem muito difíceis de visualizar com detalhes. As técnicas mais usadas são MET e MEV convencional, onde a magnificação não ultrapassa

muito além de 50kx. Sendo assim, a microscopia eletrônica de varredura por FEG (FEG-MEV) corresponde uma opção de análise apurada das estruturas dos modelos de nanocápsulas deste estudo.

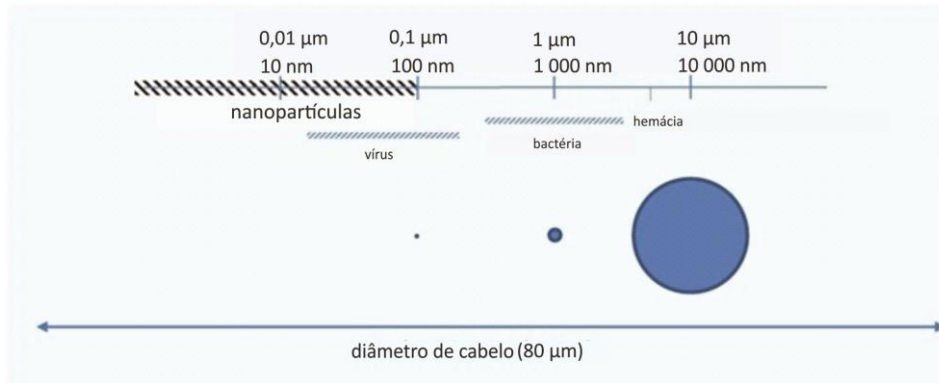


Figura 5: Comparação do tamanho de diâmetro de nanopartículas poliméricas com estruturas biológicas.⁴⁶

A resolução de um microscópio de varredura depende basicamente do diâmetro do feixe de elétrons e da corrente utilizada, assim, o FEG-MEV consegue alta resolução por produzir um feixe com alta corrente e diâmetros entre 5-10nm.^{47, 48} Na Figura 6 é possível observar a diferença entre os filamentos de MEV convencional, MET e FEG-MEV, onde este último apresenta-se extremamente fino, formando um feixe de elétrons de diâmetro muito menor que os outros dois filamentos.

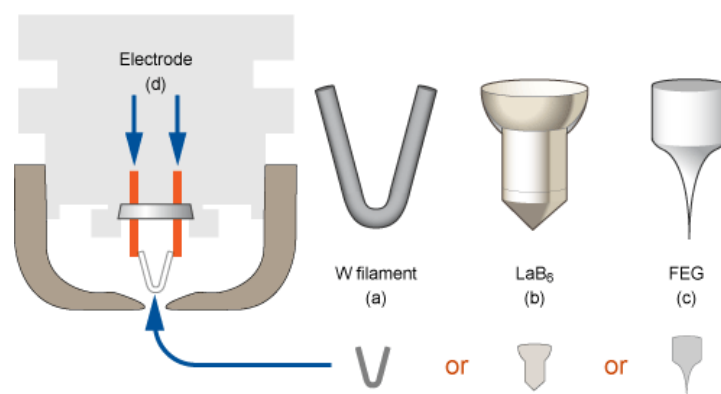
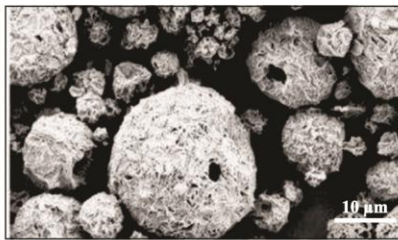
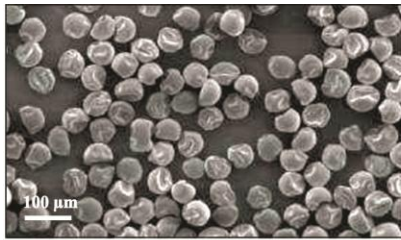


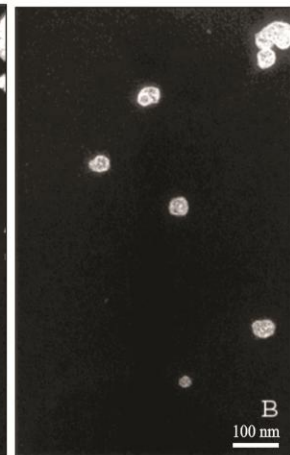
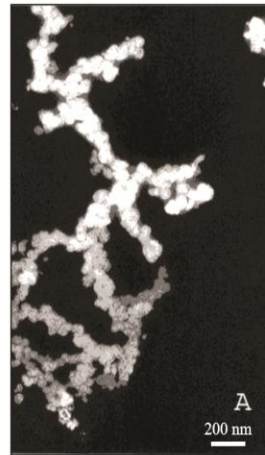
Figura 6: Comparação entre três diferentes filamentos para microscopia eletrônica de varredura: (a) filamento de tungstênio; (b) filamento de hexaboreto de lantânio; (c) filamento FEG.⁴⁹



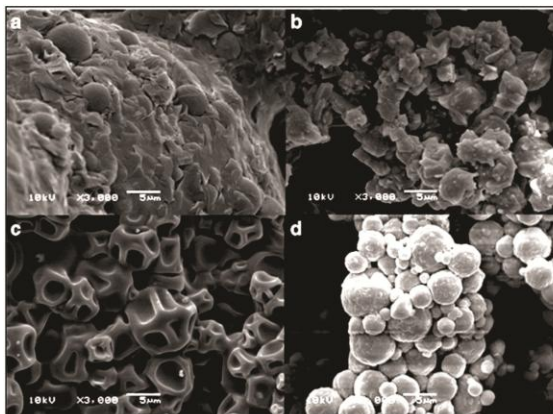
Microcápsulas de Eudragit® RS 30D secas através de sílica (esquerda), fotomicrografia por FEG-MEV, modelo JEOL 700 1F. (Liu, W. et al., 2011).
Microcápsulas de ácido polilático (direita) por FEG-MEV, modelo LEO 982. (Yin, W. & Yates, M. Z., 2009)

Fotomicrografias de suspensões de nanocápsulas de PLA (ácido polilático) por microscopia eletrônica em modo transmissão em microscópio Jeol 1010.

Neckel, G. L. & Lemos-Senna, E., 2005



A:Lactose pura seca por *spray-drying*; B:Nanocápsulas de Eudragit® S100 secas com lactose como adjuvante de secagem; C:Maltodextrina pura e D:Nanocápsulas de Eudragit® S100 secas com maltodextrina como adjuvante de secagem. Fotomicrografias por microscópio eletrônico de varredura convencional, modelo SEM-Jeol 6060.



Hoffmeister et. al, 2012

Fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura de partículas de Eudragit® L100 (esquerda) e partículas de Eudragit® L100 contendo Nifedipino (direita).

Santos, 2013

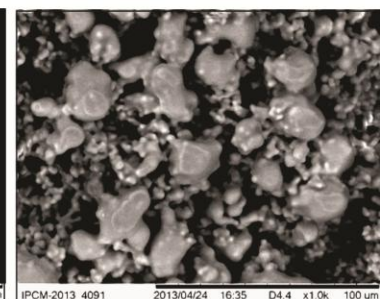
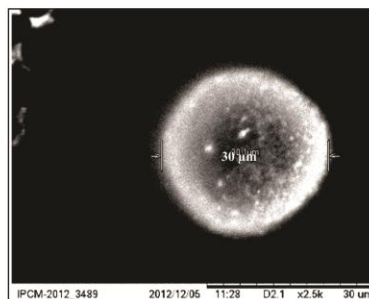


Figura 7. Imagens de modelos de nanocápsulas e microcápsulas extraídas da literatura.^{36, 50-52}

Outra vantagem do FEG-MEV é que nele é possível obter a emissão de elétrons à temperatura ambiente, justamente por nele ser possível elevar o campo elétrico por sua forma pontiaguda, fornecendo intensidade eletrônica 10 mil vezes maior que o filamento de tungstênio comum e no mínimo 100 vezes maior que o filamento de LaB₆ (hexaboreto de lantânio, muito comum em microscopia eletrônica de transmissão). Ele é composto de

monocristais de tungstênio (W) afilados a um raio menor que 100nm, diferentemente do que ocorre nos MEVs convencionais, onde a fonte de elétron é termoiônica.^{53, 54}

O feixe de íons focalizados (FIB) é semelhante ao microscópio eletrônico de varredura, o que difere é o feixe que varre a amostra, onde no FIB é um feixe de íons e no MEV convencional é um feixe de elétrons. No FIB, elétrons secundários são gerados pela interação do feixe de íons com a superfície da amostra, onde se pode obter imagens de alta-resolução. Comumente, são utilizados íons de gálio para formação do feixe. Quando se utiliza a expressão “FIB-MEV”, trata-se de um equipamento acoplado com uma coluna de MEV, além do FIB, que é também chamado de “dual-beam”. O equipamento também possui micromanipulador e injeção de gás para deposição química de vapor (Figura 8).⁵⁵

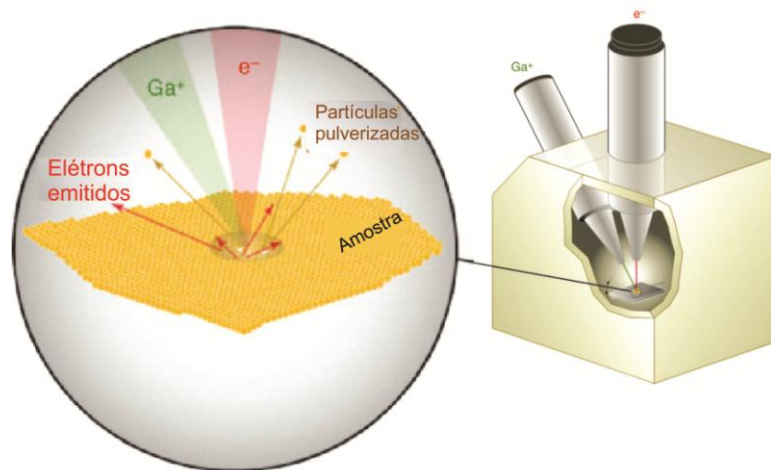


Figura 8: Ilustração esquemática de um equipamento *dual-beam* FIB-MEV.⁵⁵

O FIB-MEV não possui um poder de resolução em nível de MEV, pois seu feixe de íons focalizados apresenta dimensões de poucos nm a poucos μm de diâmetro. Assim, ele não é usado para a geração de imagens, mas sim, para “esculpir” o material, onde é possível, por exemplo, preparar tomografias do material. Quando o feixe de elétrons e de íons são combinados, eles permitem seccionar e visualizar uma amostra com o mesmo aparelho quase instantaneamente. Outro ponto relevante também é que o FIB apresenta pequena condução de calor para a amostra durante corte e excelente precisão. Porém, no início do corte, há uma pequena degradação do material, o que é irrelevante em escala micrométrica, mas impossível de ser ignorada em escala nanométrica.⁵⁵⁻⁵⁷

Equipamentos *dual-beam* FIB-MEV permitem a análise de amostras fraturadas e são uma poderosa alternativa à microscopia eletrônica de transmissão quando é preciso analisar uma amostra biológica de grande volume. Com esse tipo de equipamento, a combinação dos dois feixes que se encontram em seus pontos focais permite que uma imagem da superfície da amostra recém fatiada seja observada.⁵⁸ Até o momento, estudos utilizam preferencialmente a microscopia eletrônica de transmissão para análise morfológica de nanocápsulas.³⁷ No entanto, estudos mais atuais mostram que em comparação com métodos convencionais demorados e pouco viáveis de preparação de amostras, a técnica FIB-MEV demonstra-se completamente confiável e capaz de preparar amostras orgânicas para análise, onde as películas mais finas preparadas por FIB-MEV possibilitam um processo de análise microestrutural muito mais abrangente.⁵⁹

A técnica do feixe de íons focalizados (FIB) é frequentemente empregada na indústria de semicondutores e na ciência dos materiais, onde cada vez mais está sendo utilizada nos campos biológico e farmacêutico para análise de locais específicos, deposição e ablação de materiais, entre outras aplicações. A principal limitação da abordagem FIB-MEV para materiais farmacêuticos é a necessidade de condições de alto vácuo, o que inevitavelmente leva a uma perda de massa da amostra, sendo este efeito particularmente severo em sistemas congelados-hidratados.²¹ A microscopia eletrônica por FEG e FIB ainda não foram empregadas para caracterizar as nanocápsulas específicas desse estudo.

Müller R., Thaniele

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização estrutural de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) e de Eudragit® S 100 através de microscopia eletrônica de varredura por feixe de emissão de campo (FEG) e por feixe de íons focalizados (FIB)

3.1 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO (BUDNC)

As suspensões de nanocápsulas poliméricas foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (nanoprecipitação) proposto por Fessi e colaboradores e otimizado pelo nosso grupo de pesquisa.⁶⁰

3.1.1 Preparação de nanocápsulas com PCL e Eudragit® S 100

A preparação das suspensões consistiu em duas fases distintas para cada modelo de nanocápsulas estudadas nesse trabalho (PCL e EUD), uma fase orgânica e outra aquosa. A fase orgânica, ou lipofílica, continha o polímero PCL ou Eudragit® S 100 (0,1g), triglicerídeos de cadeia média (TCM) (160 µL), tensoativo de baixo equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) monoestearato de sorbitano (Span® 60) (0,038 g), solubilizados em 27 mL de acetona em banho-maria a 40 °C. Após, esta fase foi injetada dentro de uma fase aquosa contendo 53 mL de água destilada e tensoativo de elevado equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) (Tween® 80) (0,077 g), sob agitação magnética moderada. As suspensões de nanocápsulas foram, então, levadas ao evaporador rotatório (modelo Rotavapor R II - Buchi B-740, a 40 °C em velocidade de nível 6) e posterior secagem por aspersão. A secagem das suspensões de nanocápsulas para a obtenção dos pós-secos, ocorreu mediante nebulização em *spray-dryer* (Mini Spray Dryer B-290, Büchi – Switzerland) com adjuvante de secagem lactose a 1% ou Aerosil® 200 a 3%. Pelo *spray-dryer*, também foram secas as amostras controles, compostas ou por lactose a 1% ou por Aerosil® 200 a 3% mais adição de 53 ml de água destilada.^{16,23} Após, cada amostra recebeu contrastação, sendo colocada uma gota de uranila por 5 min e exposição ao vapor de tetróxido de ósmio por 30 min nos pós, adaptando o processo de acordo com a literatura consultada.^{47,48}

3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS MICROAGLOMERADAS

3.2.1 Espalhamento de luz dinâmico

As suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico produzidas com PCL ou EUD tiveram o seu diâmetro de partícula e índice de polidispersão analisados pela técnica de

espalhamento de luz dinâmico (Zeta Sizer® ZS, Malvern Instruments, Reino Unido). Para tal, as amostras, em triplicatas, foram diluídas 500 vezes em água previamente filtrada (0,45 µm) e o experimento conduzido à temperatura ambiente.

3.2.2 Difração de laser

Análise do tamanho de partícula por difração de laser (LD): as nanocápsulas microaglomeradas e os grupos controles (lactose e Aerosil® 200) foram redispersas em água e caracterizadas quanto ao seu tamanho e SPAN (distribuição de tamanho), utilizando a técnica de difração de laser através do equipamento Master Sizer – Hydro 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido) .

3.3 APLICAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS EM SUBSTRATOS ORGÂNICOS

3.3.1 Aplicação em substrato tegumentar

Como substrato tegumentar, foram escolhidos cabelos e unhas humanas (doação autorizada por um indivíduo). Cada substrato foi imerso em um *eppendorf* contendo ou suspensão de nanocápsulas de PCL ou de EUD por 10 min. Após, o material foi colocado em *stubs* para posterior metalização e análise microscópica. Amostras-controle também foram preparadas.

3.3.2 Aplicação em substrato epitelial

Como substrato epitelial, foram utilizados pele de orelha suína e mucosa esofágica suína (adquiridas em frigorífico). As amostras de pele/mucosa foram divididas em sete processos:

1. Controle
2. Aplicação no tecido de nanocápsulas secas de PCL com lactose por 10min;
3. Aplicação no tecido de nanocápsulas secas de PCL com sílica por 10min;
4. Aplicação no tecido de nanocápsulas secas de EUD com lactose por 10min;
5. Aplicação no tecido de nanocápsulas secas de EUD com sílica por 10min;
6. Aplicação de suspensões de nanocápsulas de PCL por 10min;
7. Aplicação de suspensões de nanocápsulas de EUD por 10min.

Após, cada amostra foi submersa em fixador por 7 dias, seguindo o protocolo básico de preparação de amostras orgânicas para microscopia eletrônica de varredura disponível pelo Centro de Microscopia e Microanálise – UFRGS (ANEXO 1).

Depois, cada subtipo amostral recebeu contrastação, sendo colocada uma gota de uranila no tecido por 5 min e exposição ao vapor de tetróxido de ósmio por 30 min, adaptando o processo de acordo com a literatura consultada.^{47,48} Em seguida, continuaram-se os passos de preparação (lavagem, desidratação, dessecação e metalização) conforme o protocolo mencionado.

3.4 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Com as etapas anteriores, cada tipo amostral foi depositado em *stubs* (suporte para microscopia eletrônica de varredura), sendo fixados por uma fita adesiva de carbono. Todos os tipos amostrais foram, então, analisados em microscópio eletrônico de varredura por feixe de emissão de campo e por feixe de íons focalizados, modelo *Dual-Beam Auriga-Zeiss* (realizadas no Centro de Microscopia e Microanálise – UFRGS), onde se realizaram imagens/tomografias das nanocápsulas e imagens dos substratos. Alguns microaglomerados de nanocápsulas precisaram ser recobertos com platina antes do corte, pois estavam deformando-se muito durante o fraturamento.

Os ajustes do equipamento foram: alta tensão de 2kv, distância de trabalho (WD-*work distance*) de 5 mm, sistema de vácuo em torno de 2.42×10^{-6} mbar, FIB Probe em 30KV.

Müller R., Thaniele

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização estrutural de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) e de Eudragit® S 100 através de microscopia eletrônica de varredura por feixe de emissão de campo (FEG) e por feixe de íons focalizados (FIB)

4.1 DIÂMETRO DAS SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS EM SOLUÇÃO AQUOSA E MICROAGLOMERADAS

O estudo da distribuição de tamanho e tamanho das nanocápsulas é necessário devido ao fato dessas características alterarem comportamentos físico-químicos e biofarmacêuticos de compostos encapsulados.^{8,37} A Tabela 1 e a Figura 9 apresentam dados referentes aos tamanhos de partículas D [4,3] (mostra a média da distribuição do diâmetro de partículas medida pelo seu volume) e SPAN (mostra uma descrição da largura da distribuição, independente do tamanho médio das partículas), das suspensões de nanocápsulas microaglomeradas e do grupo controle dos adjuvantes de secagem (sílica ou lactose).

Verificando os resultados apresentados na Tabela 1 e Figura 9, observa-se que suspensões de sílica microaglomeradas são as que apresentaram menor tamanho de diâmetro e pequena amplitude de distribuição de tamanho encontrada. As suspensões de nanocápsulas microaglomeradas, tanto de PCL, como de EUD, nas quais foram utilizadas a sílica como adjuvante de secagem apresentaram menor SPAN e menor diâmetro em relação às demais. No entanto, o tamanho de diâmetro das nanopartículas se diferencia em muito devido ao adjuvante de secagem empregado no preparo, sendo que as formulações com adição de sílica apresentaram tamanhos médios menores e as de lactose, diâmetros maiores em relação às demais formulações avaliadas. As suspensões de lactose microaglomeradas apresentaram o maior SPAN entre os materiais estudados, seguidas das formulações poliméricas de EUD ou PCL com adjuvante lactose. Estes valores são similares aos descritos para estes tipos de sistemas e decorrentes da composição das mesmas.^{6, 18, 23, 38}

Tabela 1: Tamanhos de partícula por difração de laser das suspensões de nanocápsulas microaglomeradas e grupo controle, apresentando diâmetro e SPAN (distribuição de tamanho).

Microaglomerados	D4,3 (µm)	SPAN
Sílica	3,51	1,59
Lactose	25,29	6,26
NC PCL + Sílica	41,50	1,51
NC EUD + Sílica	5,60	1,17
NC PCL + Lactose	110,53	2,07
NC EUD + Lactose	392,12	3,38

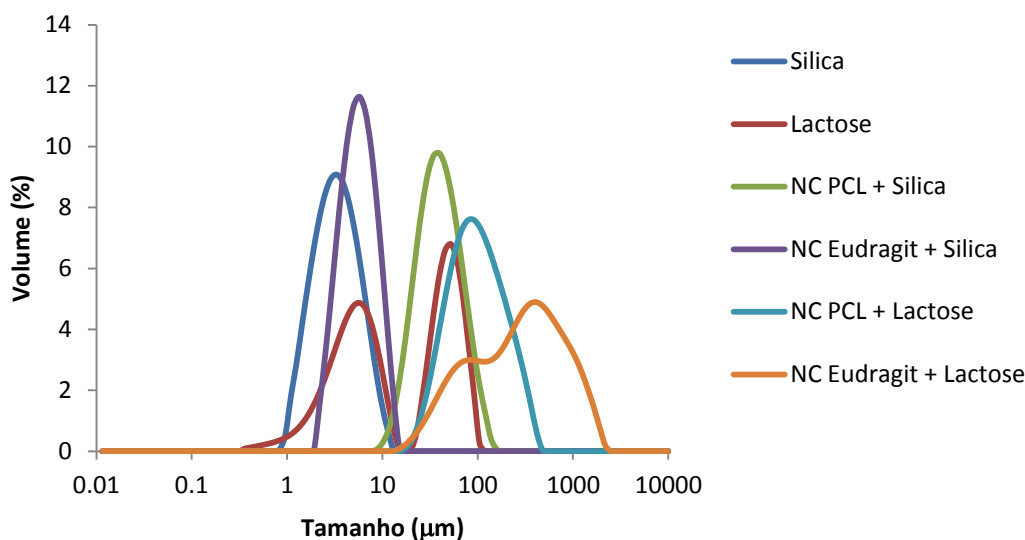


Figura 9: Perfis de distribuição de tamanho das suspensões de nanocápsulas microaglomeradas e grupo controle.

Segundo estudos, entre os fatores que afetam o diâmetro das nanopartículas estão a composição quantitativa dos reagentes, método de preparação e natureza do óleo utilizado como núcleo, sendo ocasionado pela diferença de viscosidade, hidrofobicidade ou tensão interfacial das substâncias usadas.⁶¹ O espalhamento de luz dinâmico é uma técnica não invasiva e bem estabelecida de medição do tamanho e da distribuição do tamanho de moléculas e partículas, normalmente na região dos submicrométricos e nanométricos. Em geral, essa técnica é aplicada na caracterização de partículas, emulsões e moléculas que foram dispersas ou dissolvidas em um líquido. O movimento browniano das partículas ou moléculas em suspensão faz com que a luz laser seja espalhada com intensidades diferentes. A análise dessas flutuações de intensidade resulta na velocidade do movimento browniano e assim, o tamanho de partícula usando a relação Stokes-Einstein.⁶²

A Tabela 2 apresenta os resultados do tamanho de diâmetro de partícula e índice de polidispersão das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico produzidas com PCL ou EUD e analisadas pela técnica de espalhamento de luz dinâmico. De acordo com o que foi observado, o diâmetro médio das partículas das suspensões de nanocápsulas variou em função do tipo de polímero da formulação, sendo 283nm o diâmetro médio para as suspensões de nanocápsulas produzidas com PCL e de 184nm para as produzidas com EUD. O índice de polidispersão, que fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos, apresentou-se baixo ($< 0,3$) para as duas dispersões obtidas, indicando a formação de sistemas monodispersos.⁶³

Tabela 2: Diâmetros de partículas e índices de polidispersão (PDI) das suspensões de nanocápsulas de PCL (NC PCL) e de Eudragit® S 100 (NC EUD) medidas por espalhamento de luz dinâmico.

Amostra	Diâmetro (nm)	PDI
NC PCL	283 ± 15	0,30 ± 0,05
NC EUD	184 ± 21	0,15 ± 0,02

4.2 FOTOMICROGRAFIAS DOS MICROAGLOMERADOS DE SÍLICA

A Figura 10 apresenta as imagens dos microaglomerados de sílica pura, sem a presença das nanocápsulas na composição, após a técnica de *spray-drying* e analisados por microscopia eletrônica de varredura, em diferentes escalas. Os microaglomerados apresentam em torno de 7µm.

As Figuras 10-A e 10-B apresentam microaglomerados de sílica em escala de 1µm. Nelas, verifica-se a morfologia tipicamente arredondada, onde na superfície é possível observar que a formação ocorre por deposição e justaposição de nanoestruturas circulares de sílica, resultando em uma massa de material homogêneo, sendo possível verificar o seu interior na Figura 10-F. A diferença de contraste na fatia mostra as áreas com a massa (mais claras) e lacunas/poros (pontos escuros). As Figuras 10-C e D diferem pelo tipo de detecção dos elétrons. Em C, foram capturados elétrons secundários e em D, retroespalhados. Como os retroespalhados permitem distinguir regiões com diferentes composições,⁴⁸ sabe-se que a parte clara corresponde aos elementos de maior número atômico, que deve resultar da aplicação de contrastantes na amostra: tetróxido de ósmio e acetato de uranila. O tetróxido de ósmio é um agente oxidante muito utilizado na fixação e contrastação de materiais biológicos, sendo eficiente na coloração de polímeros insaturados e fixador/corante de lipídios.⁶⁴ A fase amorfa (menor densidade eletrônica) polimérica apresenta-se em tom escuro, enquanto a fase cristalina apresenta-se mais clara. O acetato de uranila é muito utilizado para contrastação de biomateriais, onde nos polímeros, intensifica o contraste da fase cristalina. É utilizado também na contrastação de ácidos nucleicos.^{47,65}

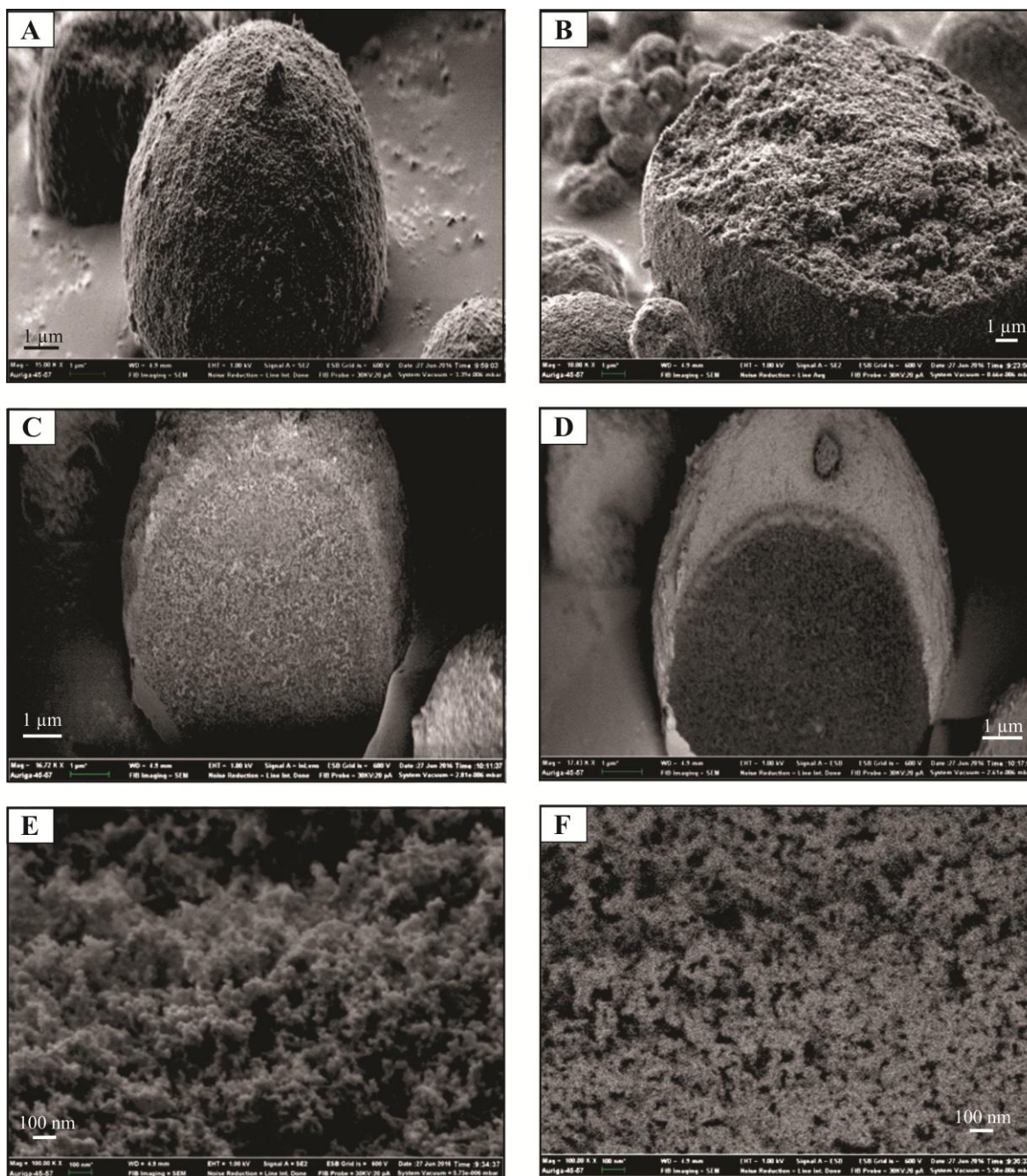


Figura 10: Microaglomerados secos utilizando o adjuvante sílica. A: microaglomerado antes do corte; B: microaglomerado partido encontrado ao acaso; C: microaglomerado fatiado detectado por elétrons secundários InLens; D: microaglomerado fatiado detectado por elétrons retroespalhados; E: superfície do microaglomerado; F: superfície da fatia do microaglomerado.

4.3 FOTOMICROGRAFIAS DOS MICROAGLOMERADOS DE LACTOSE

A Figura 11 traz imagens dos microaglomerados de lactose pura, sem a presença das nanocápsulas na composição, após a técnica de *spray-drying* e analisadas por microscopia eletrônica de varredura, em diferentes escalas.

A Figura 11-A mostra a visão geral de microaglomerados de lactose, com medidas em torno de 200 μ m de diâmetro. As Figuras 11-B, 11-C e 11-D apresentam progressivamente um aumento na magnificação da análise de um dos aglomerados da amostra. Nessas imagens é possível ver a formação desses microaglomerados, que é a junção de micropartículas de morfologia piramidal/cristalina. As imagens 11-E, F e G apresentam microaglomerados que diferem muito entre si quanto ao tamanho, onde o presente na imagem E se assemelha em tamanho ao que foi visto na figura 11-A (escala micrométrica), mas já os encontrados nas Figuras 11-F e G apresentam tamanhos muito menores, estando em escala nanométrica. Isso mostra a pouca homogeneidade da formação dos aglomerados do grupo controle, podendo-se inferir que os pós de lactose são menos homogêneos com relação a tamanho, o que explica o maior tamanho de SPAN (=6,26). As Figuras 11-H, I e J mostram o interior do microaglomerado. Esse material provavelmente é poroso no interior, assim como os microaglomerados de sílica, pois é possível ver alguns poros na extensão do corte, porém, durante a tomografia, o material sofreu deformação, como se conclui pela presença de saliências longitudinais provocadas pelo feixe de íons.

As amostras mostram morfologia mais irregular do que os aglomerados de sílica, sendo os mesmos na forma prismática e bastante angulosa, como já visto em estudos anteriores.³³ Não possuem formato esférico e se formam pela sobreposição e justaposição de nanopartículas geométricas, provavelmente por sua característica de alta compactabilidade mostrada em estudos anteriores.^{2,33} Devido ao fato de a amostra se deformar muito durante o corte, foi necessário o recobrimento com platina antes da tomografia (isso explica a diferença na superfície do microaglomerado antes e depois do corte). Esse recurso é facilmente realizado pelo próprio equipamento de análise microscópica e foi indicado pelos técnicos responsáveis do CMM-UFRGS, local onde as análises desse trabalho foram realizadas.

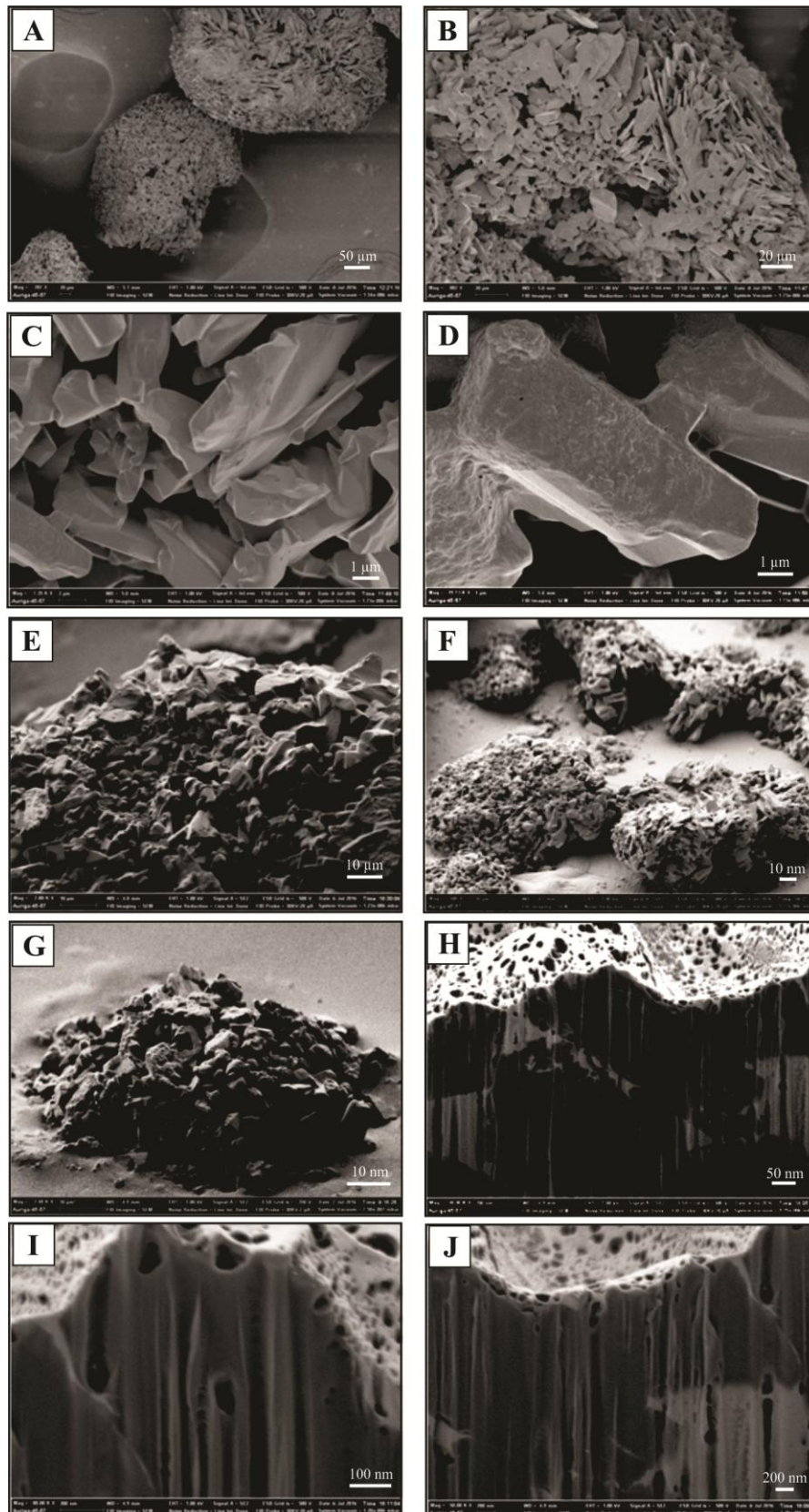


Figura 11 Microaglomerados secos utilizando o adjuvante lactose. A-G : microaglomerados vistos em diferentes magnificações; H-J: microaglomerado fatiado recoberto com platina.

4.4 FOTOMICROGRAFIAS DOS MICROAGLOMERADOS DE NANOCÁPSULAS DE PCL COM ADJUVANTE SÍLICA

Em geral, as nanopartículas poliméricas apresentam tamanho de diâmetro com distribuição unimodal, apresentando uma média entre 100 e 300 nm. No entanto, fatores como composição quantitativa dos reagentes, método de preparação e natureza do óleo utilizado como núcleo afetam o tamanho, devido a características como as diferenças de viscosidade, hidrofobicidade ou tensão interfacial das substâncias usadas.⁶¹ Quando as nanocápsulas de núcleo lipídico são secas por *spray-drying* na presença de adjuvantes de secagem, convertendo-se em produtos pulverulentos, os mesmos se apresentam na forma de microaglomerados redispersíveis.³⁶

A Figura 12 apresenta imagens de microaglomerados de nanocápsulas de PCL com adjuvante sílica em diferentes escalas. Observando as imagens 12-A, B e C verifica-se a ocorrência de microaglomerados em formato esférico, de diâmetro em torno de 15µm, pela justaposição de nanocápsulas, também esféricas. A Figura 12-D apresenta com maior clareza a presença das nanocápsulas esféricas, de diâmetro em torno de 1µm. As Figuras 12-E e F apresentam o interior do microaglomerado, que é composto homogeneamente por poros ao longo de toda sua extensão.

De acordo com estudos,²⁹ o Aerosil ® 200 contribui para a estabilidade física dos pós que pode ser explicada pela possível encapsulação das partículas do pó pelo adjuvante de secagem. O pó final apresenta-se fino e solto, resultando em maior rendimento ao processo.²⁹

Assim, fica evidente o que já foi descrito em estudos anteriores, observando a formação de micropartículas do adjuvante com as nanocápsulas poliméricas,^{22,25} onde as nanoestruturas formam microaglomerados com as partículas de dióxido de silício coloidal, com diâmetros equivalentes às nanopartículas presentes nas suspensões originais.⁶⁶

É importante salientar o fato de que as nanocápsulas resistiram ao processo de secagem, já que é possível identificá-las claramente nas imagens. Comparando-se as imagens desse trabalho com a de outros autores, é possível reconhecer a qualidade superior das imagens adquiridas por meio de equipamento *dual-beam* por FIB e FEG. A Figura 13 realiza essa comparação.

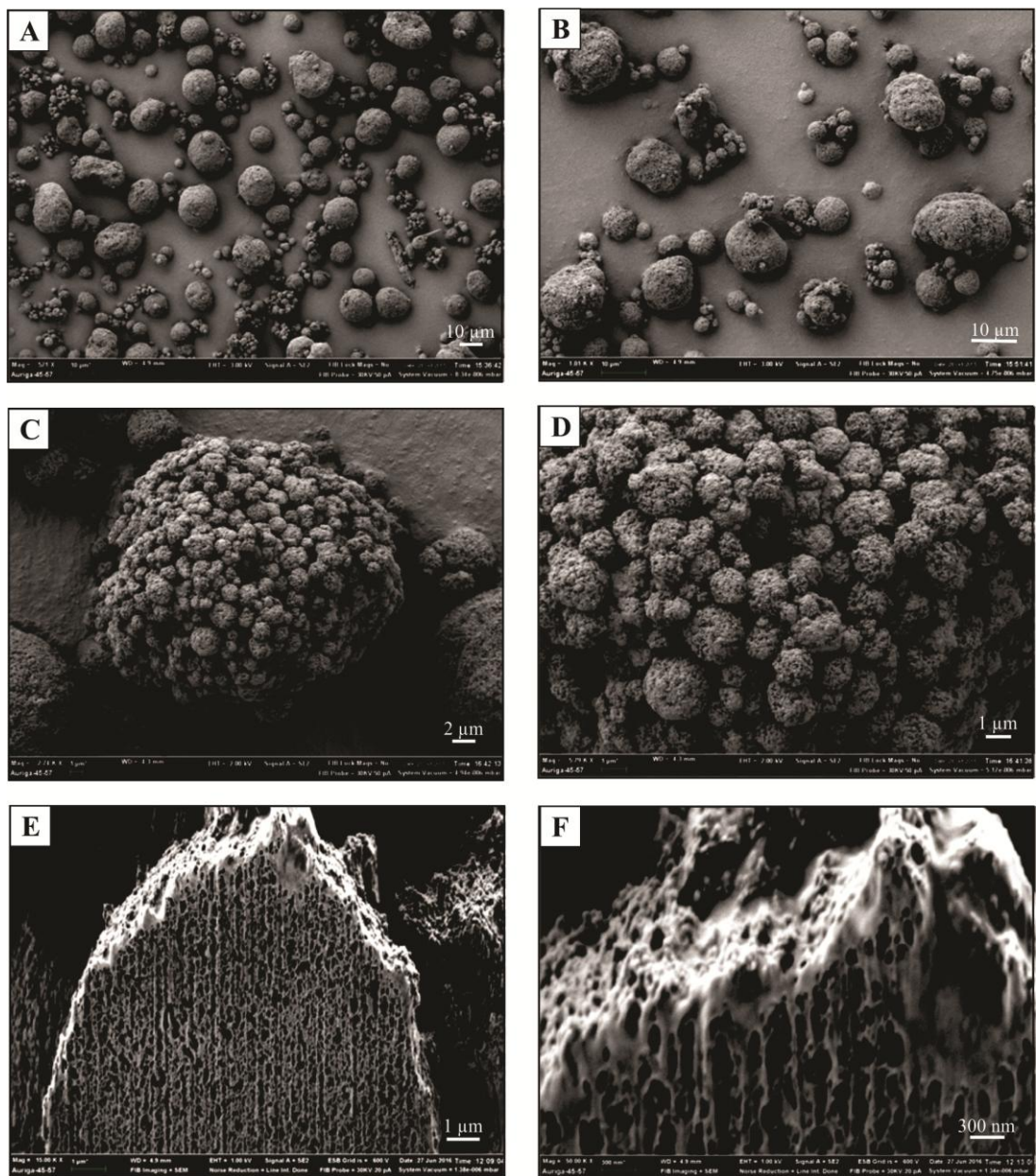


Figura 12: Microaglomerados secos de nanocápsulas de PCL utilizando o adjuvante sílica. A-D: microaglomerados vistos em diferentes magnificações; E, F: microaglomerado fatiado.

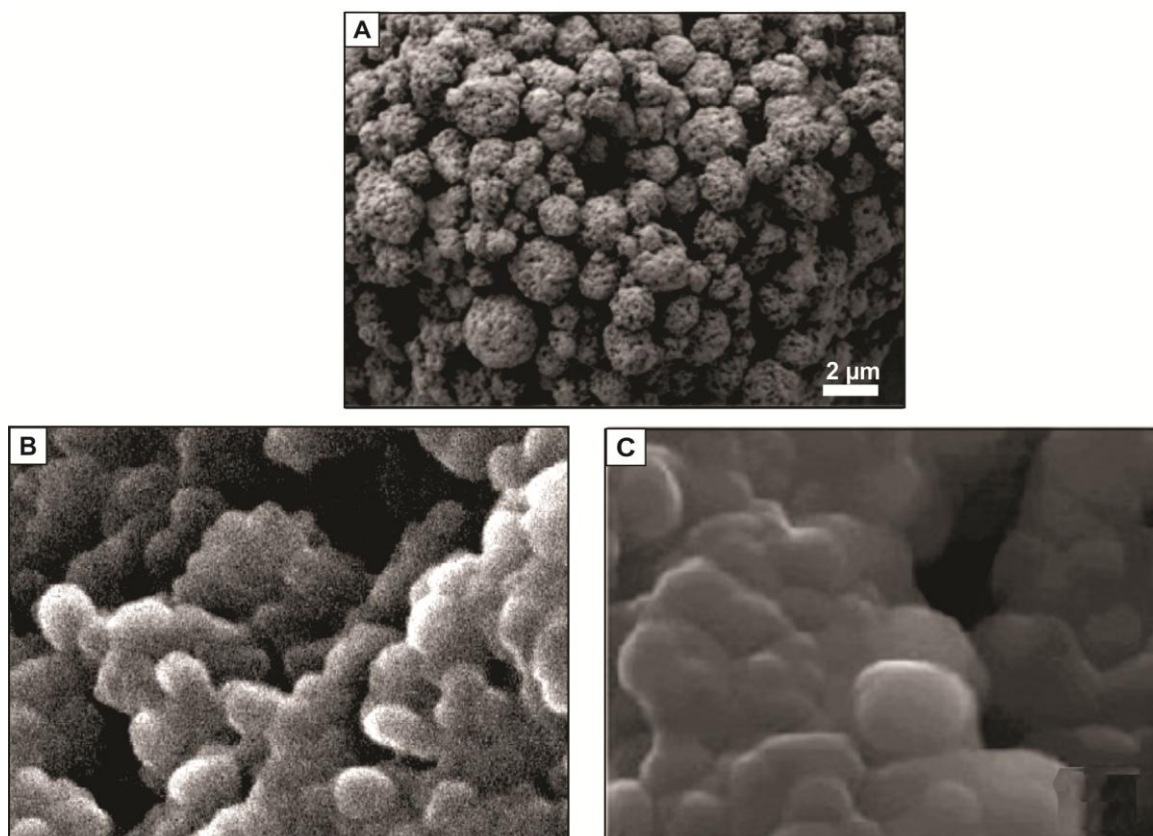


Figura 13: Comparação de imagens de microaglomerados de PCL com adjuvante sílica de outros estudos com a imagem obtida nesse trabalho. A= microaglomerados de PCL com adjuvante sílica do presente estudo, escala 2 μ m; B= microaglomerados de PCL com adjuvante sílica do estudo de *Pohlmann et al.* 2002,⁶ escala 1.39 μ m; C= microaglomerados de PCL com adjuvante sílica do estudo de *Raffin et al.* 2003,⁵ escala 2,93 μ m.

Ambos os estudos citados e comparados na Figura 13 adquiriram as imagens através de um microscópio eletrônico de varredura convencional, composto de um filamento de tungstênio. Esse filamento difere de um filamento de FEG (conforme já discutido na seção 2 desse trabalho e ilustrado na Figura 6), o qual possui tamanho de diâmetro extremamente pequeno, o que resulta em imagens de alta resolução como as alcançadas nesse estudo.

4.5 FOTOMICROGRAFIAS DOS MICROAGLOMERADOS DE NANOCÁPSULAS DE PCL COM ADJUVANTE LACTOSE

A Figura 14 apresenta microaglomerados de nanocápsulas de PCL preparados com o adjuvante lactose. A imagem 14-A apresenta visão geral de um desses microaglomerados, que apresentam disformes, onde o lado de menor largura apresenta em torno de 35 μ m. As

imagens 14-B até F exibem as amostras em magnificações maiores, nas quais é possível observar melhor a superfície dos microaglomerados. As imagens 14-G e H apresentam detalhes da superfície dos microaglomerados.

Os microaglomerados apresentam-se disformes, com formato próximo ao semicircular, formados pelo contato de nanocápsulas unidas entre si pelo material da superfície. As nanocápsulas apresentam em torno de 1 μm , como pode ser melhor visualizado nas imagens 14-B, C e D. A superfície apresenta o formato de “placas” recobrando o microaglomerado como um todo, não sendo possível definir com exatidão os limites da parede das nanocápsulas. Segundo relato anterior,³² foi visto que partículas secas na presença de lactose, apresentam superfície irregular, onde o adjuvante lactose envolve as nanopartículas. Assim, pode-se levantar a hipótese de que o material que une as nanocápsulas da superfície seja a lactose.

Em vista do que foi discutido até o momento, pode-se inferir que, enquanto micropartículas formadas de sílica servem de suporte para adesão em sua superfície por nanocápsulas poliméricas após o processo de secagem por aspersão, os microaglomerados produzidos com lactose são formados por adesão de nanocápsulas poliméricas, cada uma recoberta pelo adjuvante, durante toda a extensão da micropartícula. Por isso, explica-se também o tamanho maior dos microaglomerados de nanocápsulas de PCL secas com lactose ($\pm 35\mu\text{m}$) em relação às produzidas com sílica ($\pm 14\mu\text{m}$). Os microaglomerados com sílica são mais compactados, formando um núcleo, cobertas pelas nanocápsulas. Por sua vez, os produzidos com lactose não possuem núcleo, sendo cada nanocápsula revestida por lactose.

De acordo com a literatura, a porção amorfa do composto final à técnica de *spray-drying* é responsável pela otimização das propriedades de compressibilidade da lactose seca por aspersão.^{30,35} De natureza adesiva,⁶⁶ adjuvantes como a lactose apresentam uma forma amorfa facilmente atingível que supostamente aumenta a preservação da atividade de compostos nela inseridos.⁶⁷ A redução do volume das nanopartículas secas de lactose ocorre devido à sua deformação durante o processo de produção, onde a deformação controla a área de contato formada entre as nanocápsulas.³⁵

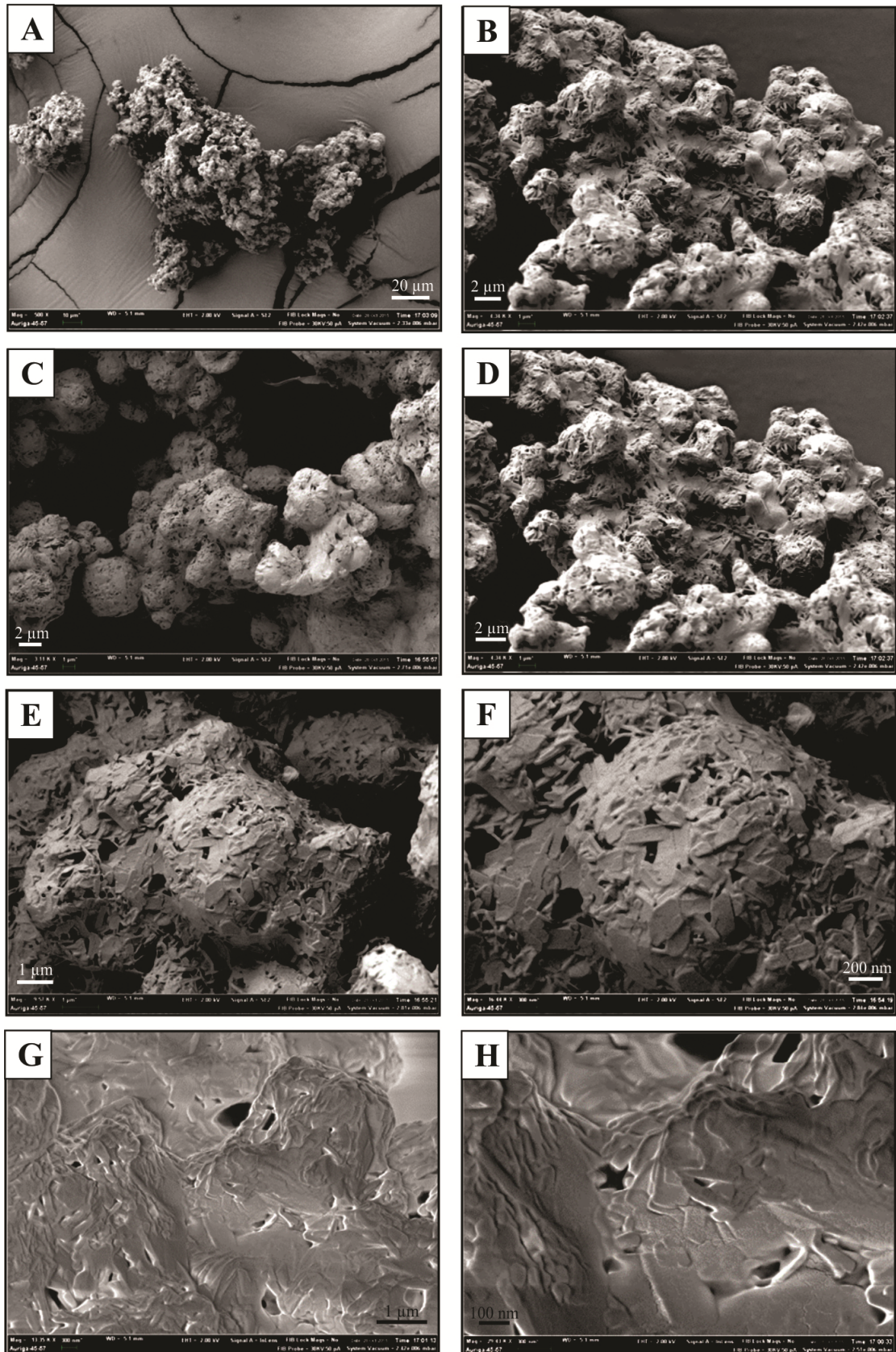


Figura 14: Microaglomerados de nanocápsulas formadas por PCL e o adjuvante lactose. A- H : microaglomerados vistos em diferentes magnificações.

4.6 FOTOMICROGRAFIAS DOS MICROAGLOMERADOS DE NANOCÁPSULAS DE EUDRAGIT® S 100 COM ADJUVANTE SÍLICA

A Figura 15 apresenta imagens de microaglomerados de nanocápsulas de EUD secas na presença do adjuvante sílica. A imagem 15-A apresenta visão geral de um microaglomerado desse tipo amostral, sendo esses aglomerados com média de diâmetro de 22 μ m. As Figuras 15-B apresenta em maior magnificação a superfície desse microaglomerado e as Figura 15-C, D e E apresentam a região interna da microestrutura das imagens 15-A e B após tomografia. Nessas imagens após o corte, verificamos que a superfície e o interior apresentam as mesmas características, tornando o microaglomerado homogêneo tanto no interior, quanto exterior.

A Figura 15-F apresenta uma comparação entre a mesma imagem do interior do aglomerado, porém na esquerda a detecção foi de elétrons secundários (SE- *Secondary Electrons*) e, na direita, por elétrons retroespalhados (ESB- *Energy Selective Backscattered* ou BSE- *Backscattered Electrons*). Essa análise comparativa dá suporte para concluir que há homogeneidade estrutural e química da estrutura do microaglomerado, pois a imagem por elétrons retroespalhados é formada por regiões claras e escuras pela diferença de número atômico, onde a parte clara representa a parte cristalina de maior número atômico.⁴⁷ Na imagem, as regiões escuras são as regiões de poros e a diferença de tom relaciona-se a diferença de profundidade do material e não pela composição do material.

As imagens 15-G, H, I e J apresentam detalhes no interior do microaglomerado após a tomografia, nas quais é possível distinguir com clareza a presença de nanoestruturas esféricas dentro dos poros e aderidas à matriz do material. As Figuras 15-K e L mostram as regiões dos poros em altas magnificações, nas quais estão marcadas algumas das esferas encontradas e medidas os diâmetros, que resultaram em média 49nm e medidas as áreas, com média de 1904nm³.

Segundo o fabricante,⁴² o polímero Eudragit® S 100 apresenta propriedades de termoplásticas excelentes, alta termoestabilidade e estabilização de estados amorfos em soluções sólidas. Sendo assim, esse material pode ser facilmente moldado e conformado, devido à sua característica de alta viscosidade.⁶⁸ De acordo com esses dados e com as imagens adquiridas, podemos inferir que as nanocápsulas poliméricas de EUD formam agrupamentos entre si e o adjuvante de secagem consegue contornar esses agrupamentos, devido a alta viscosidade do polímero, como já mencionado. Por isso, a morfologia dos microaglomerados de EUD com sílica é composta por grandes poros, nos quais há concentração de nanocápsulas.

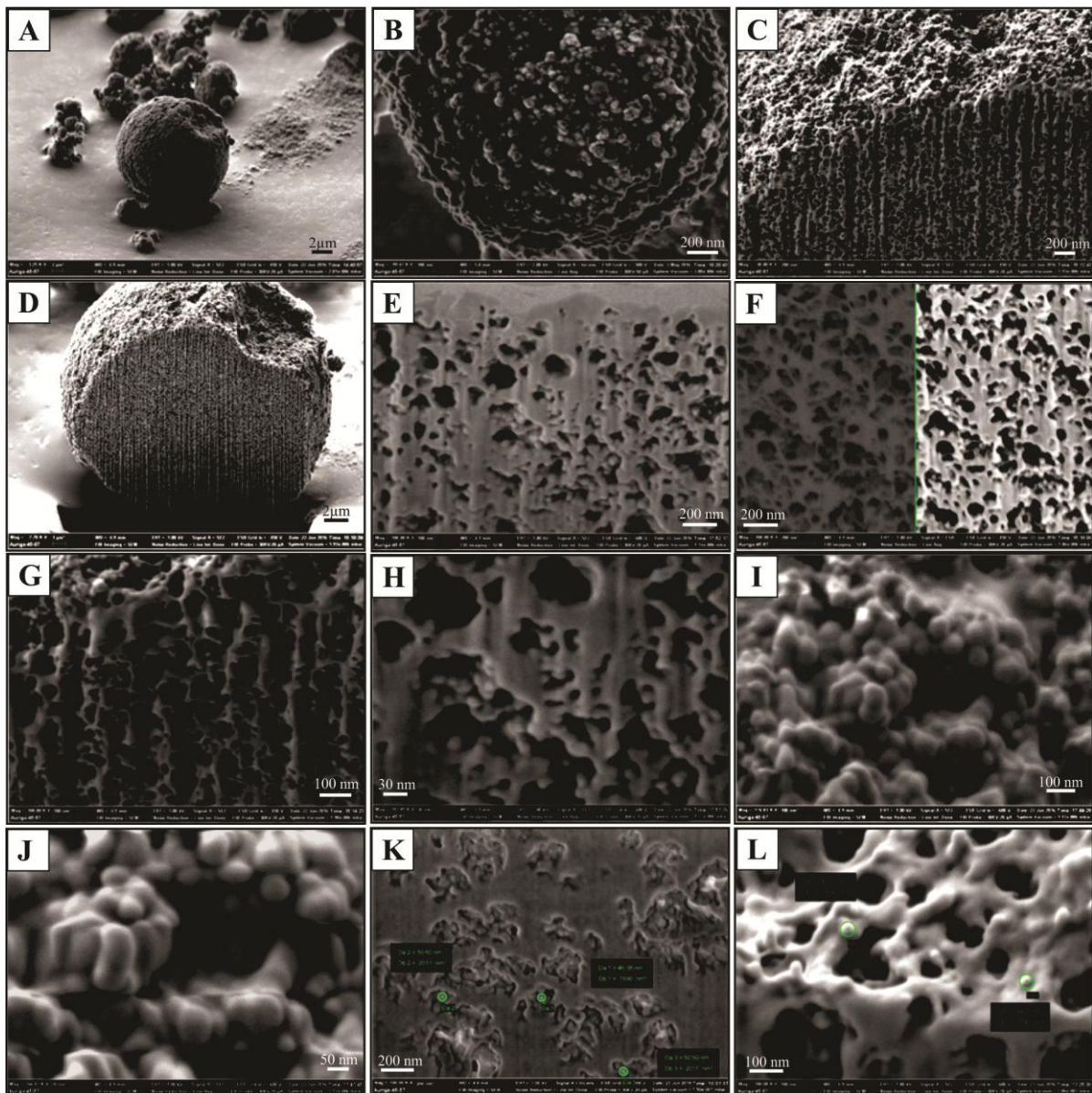


Figura 15: Microaglomerados secos de EUD utilizando o adjuvante sílica. A, B: microaglomerado antes do corte; C,D: tomografia do microaglomerado; E: visualização do interior do microaglomerado; F: comparação do interior do microaglomerado detectado por elétrons secundários (esquerda) e retroespalhados (direita); G-L: nanocápsulas entre os poros do interior do microaglomerado.

A Figura 16 traz uma comparação entre a imagem da superfície dos microaglomerados de PCL com adjuvante sílica (Figura 16-A) e a superfície de microaglomerados de EUD com o mesmo adjuvante de secagem.

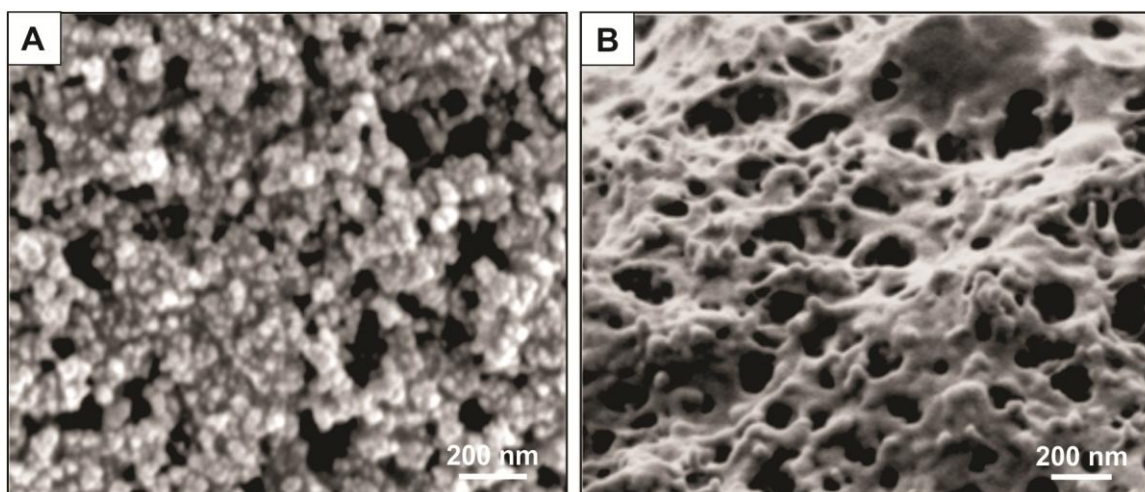


Figura 16: Comparação entre microaglomerados de PCL com adjuvante de secagem sílica e a superfície de microaglomerados de EUD com adjuvante de secagem sílica.

A PCL, com suas propriedades bioadesivas,^{11,12} baixa viscosidade,⁶⁹ e alta permeabilidade a substâncias,⁹ adere ao adjuvante sílica, o qual forma uma base coberta de nanocápsulas poliméricas, como podemos ver na imagem 16-A. Já a imagem 16-B, mostra a alta porosidade dos microaglomerados de EUD com sílica, em que se observa a presença de nanocápsulas poliméricas no interior dos poros, conectadas à matriz do adjuvante por meio de hastes de fixação.

4.7 FOTOMICROGRAFIAS DOS MICROAGLOMERADOS DE NANOCÁPSULAS DE EUDRAGIT® S 100 COM ADJUVANTE LACTOSE

A Figura 17 apresenta microaglomerados de nanocápsulas de EUD secas na presença do adjuvante lactose, em diferentes escalas. As Figuras 17A-E apresentam uma visão geral do microaglomerado, com características morfológicas bastante disformes e largura do menor eixo de medida de cerca de 20µm. Nessas imagens, o material ainda não havia recebido cobertura de platina. A partir das imagens seguintes deste grupo amostral, observa-se a presença de uma camada espessa de platina bastante clara que recobre o todo o microaglomerado. Houve a necessidade de empregar o recobrimento, porque o material estava sofrendo grande deformação durante as tomografias. Assim sendo, a camada de platina é utilizada para proteger o material durante o corte.

As Figuras 17-G e H mostram o interior do microaglomerado em tomografia em área mais externa da microestrutura, onde se verifica a formação de um grande poro. A Figura 17-

F apresenta uma tomografia da região central do mesmo microaglomerado, no qual o grande poro não é mais visualizado. As imagens 17A-E foram realizadas por sinal de elétrons secundários, que apresentaram algumas regiões internas claras e outras escuras. Para certificar-se da ausência de diferença de composição química no material, realizaram-se as imagens 17F-H por detecção de elétrons retroespalhados, concluindo que o interior do material é homogêneo quimicamente e o exterior mais claro deve-se a impregnação de platina (material de maior densidade atômica que o interior, apresentando-se com tom mais claro).⁴⁷

As Figuras 17F-H apresentam visão geral do microaglomerado após as tomografias, evidenciando matriz interna homogênea e porosa. Não é possível reconhecer as nanocápsulas entre os poros ou na superfície, presumindo que essas fundem entre si, formando uma só massa, após a impregnação de platina para a tomografia. Porém, nas imagens 17-B, C e D é possível analisar que, assim como os microaglomerados de nanocápsulas de PCL com lactose, os microaglomerados de EUD com lactose formam uma aglomeração de nanocápsulas de EUD envoltas por uma matriz de lactose. As nanocápsulas apresentam cerca de 1µm.

A Figura 18 traz uma comparação entre os microaglomerados deste estudo, incluindo o grupo controle, e imagens obtidas em outro estudo que também empregou a lactose como adjuvante de secagem.³⁶ A imagem 18-A apresenta a superfície de microaglomerados de lactose pura obtidas nesse trabalho. Nela, observamos a composição de nanoestruturas prismáticas, conforme já relatado em estudos anteriores.³³ A Figura 18-B apresenta a superfície de PCL com adjuvante de secagem lactose, na qual é possível observar microaglomerado coberto por nanoestruturas semelhantes à lactose pura, porém bastante aderidas ao microaglomerado. De acordo com a literatura, a PCL possui propriedades bioadesivas,^{11,12} o que explica a forte aderência das nanoestruturas. Conforme já mencionado, infere-se que cada nanocápsula de PCL é coberta pelo adjuvante de secagem, diferentemente do que ocorre no caso da sílica (com o adjuvante de secagem sílica, é formado um suporte de sílica com nanocápsulas poliméricas vinculadas ao suporte).

A Figura 18-C apresenta superfície de microaglomerados de EUD com adjuvante de secagem lactose obtidos nesse trabalho. A Figura 18-D mostra a superfície de microaglomerados de lactose pura obtidos em outro estudo³⁶ e a imagem 18-E traz a superfície de microaglomerados de EUD com adjuvante lactose obtidos em outro estudo.³⁶

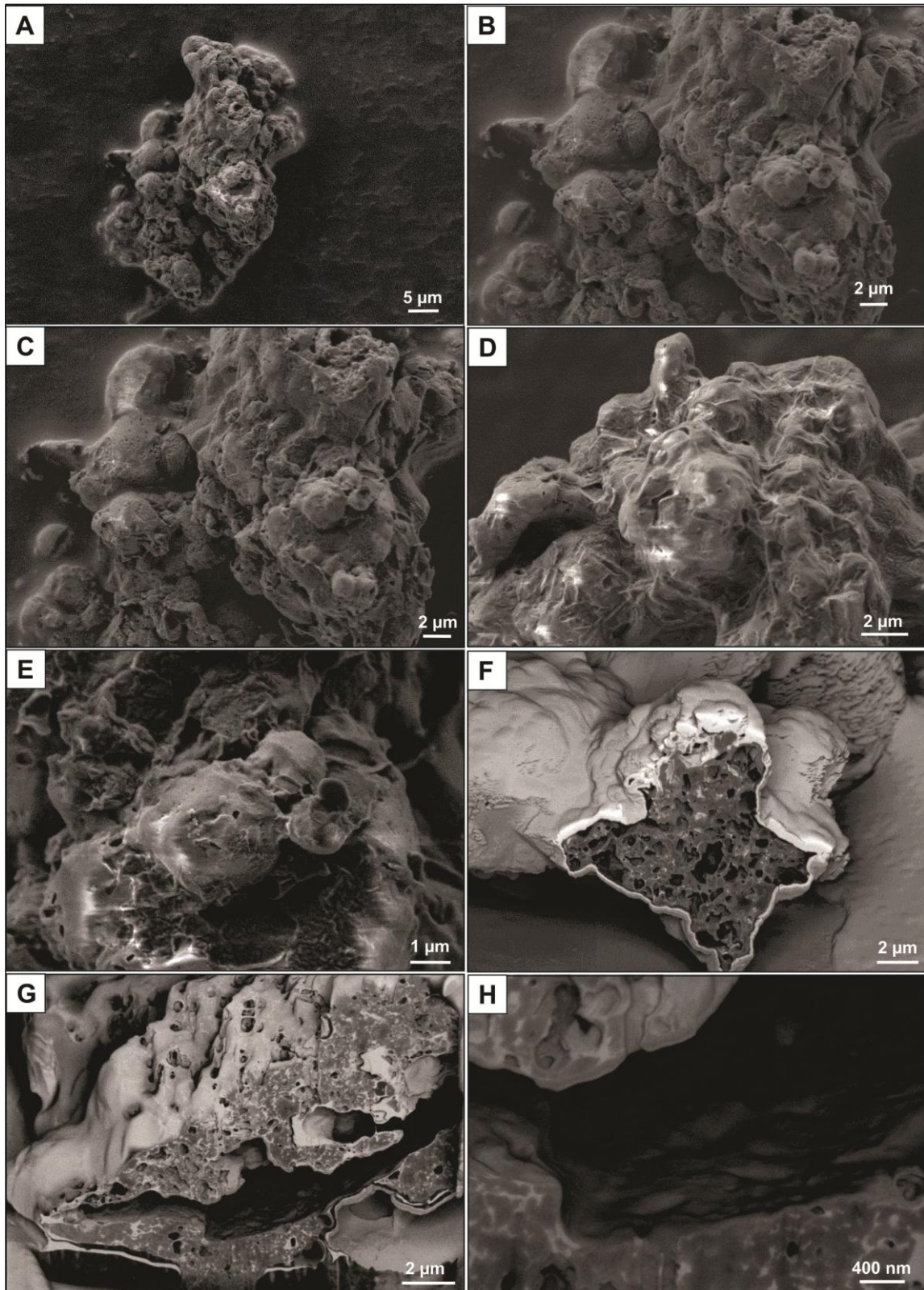


Figura 17: Microaglomerados secos de EUD utilizando o adjuvante lactose. A-E: microaglomerado antes do corte; F-H: tomografias do microaglomerado e imagens realizadas por detecção de elétrons retroespalhados.

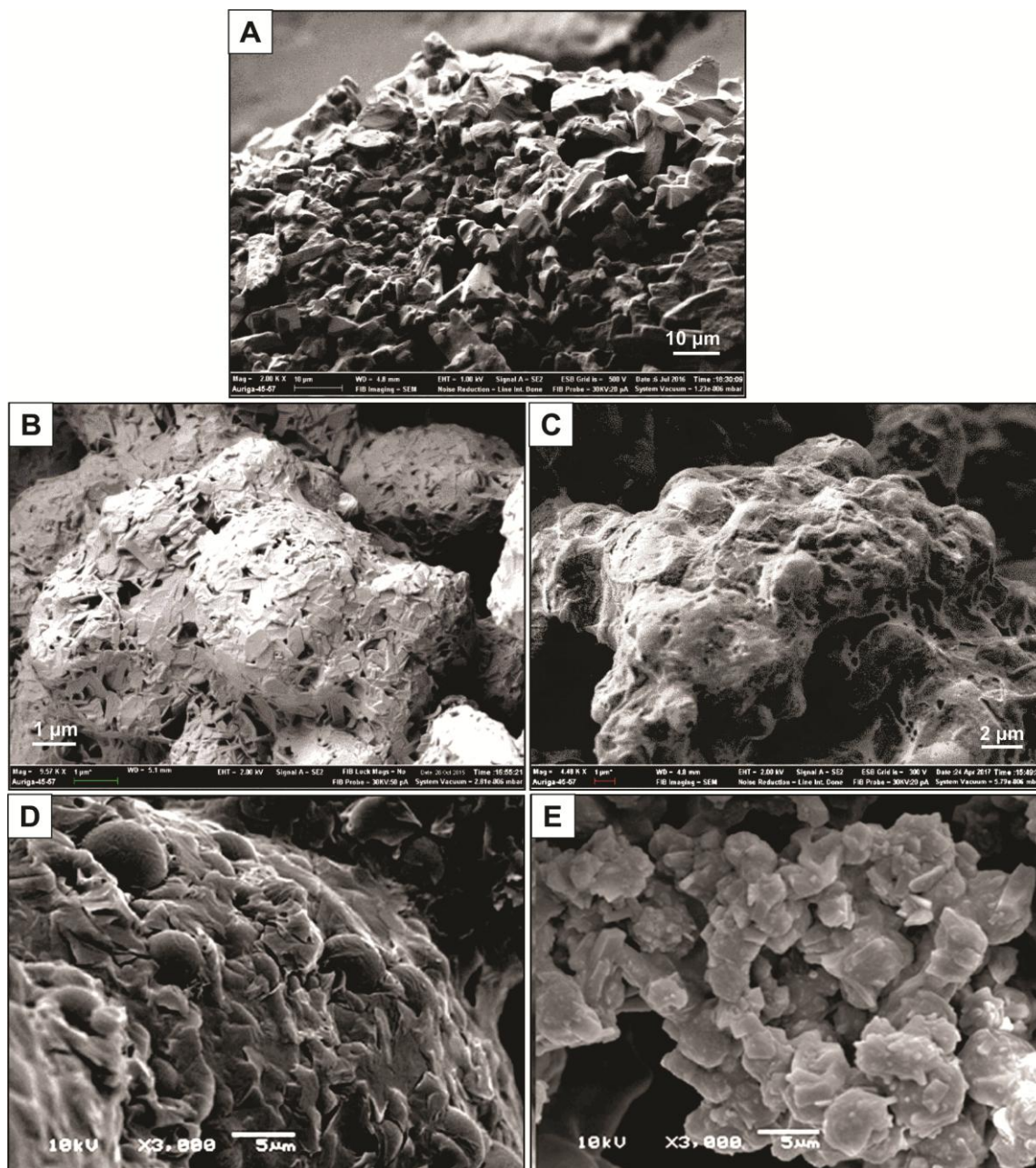


Figura 18: Comparação de imagens entre microaglomerados de: A- superfície de microaglomerados de lactose pura obtidas nesse trabalho; B- superfície de PCL com adjuvante de secagem lactose obtida nesse trabalho; C- superfície de microaglomerados de EUD com adjuvante de secagem lactose obtida nesse trabalho; D- superfície de microaglomerados de lactose pura obtidas em outro estudo,³⁶ E- superfície de microaglomerados de EUD com adjuvante lactose obtidos em outro estudo.³⁶

Como os próprios autores do estudo da Figura 18-D e E mencionaram, a lactose pura apresenta tamanho de microaglomerado bastante grande e a superfície dos microaglomerados de EUD com lactose apresentam morfologia rugosa em sua superfície.³⁶ As morfologia dos

microaglomerados de EUD com lactose obtidos na presente pesquisa convergem com a morfologia da superfície do mesmo grupo amostral do estudo utilizado na comparação. Em ambos, observam-se superfície rugosa dos microaglomerados de EUD com lactose, porém, os microaglomerados do estudo apresentam maior organização. No entanto, comparando-se os grupos controles dos dois estudos (Figura 18 A e D), há concordância entre as observações sobre a grande largura dos microaglomerados, porém, a morfologia distingue-se, sendo os microaglomerados de lactose desse estudo com aspectos morfológicos que coincidem ao exposto na literatura. Além disso, na figura do grupo controle de lactose do estudo analisado há presença de superfície irregular, se assemelhando com as imagens dos grupos amostrais das Figuras 18-C e E.

A Figura 19 apresenta uma comparação entre as formulações analisadas, sendo as Figuras 19-A e B referentes aos adjuvantes de secagem puros (sílica e lactose, respectivamente), as Figuras 19-C e D apresentando as nanocápsulas de PCL secas na presença de sílica e lactose, respectivamente e as Figuras 19-E e F ilustrando as nanocápsulas de EUD secas por sílica (19-E) e lactose (19-F).

Observando-se a Figura 19, verifica-se o padrão esférico nas nanocápsulas e microaglomerados secos com adjuvante sílica, inclusive o material puro (imagens 19-A, C e E). Nos microaglomerados de nanocápsulas de PCL ou EUD secas com adjuvante sílica, o excipiente de secagem manteve-se como um suporte para fixação das nanocápsulas em sua superfície, em que nas formulações de PCL com sílica, as nanocápsulas se mantiveram bem aderidas ao suporte (como visto na imagem 19-C) e as formulações de EUD com sílica mantiveram-se unidas ao adjuvante através de pequenas hastes (como visto na imagem 19-E). Os microaglomerados de nanocápsulas de PCL ou EUD secas com adjuvante lactose (Figuras 19-D e F, respectivamente), apresentaram núcleo composto por nanocápsulas, ao contrário das formulações com sílica que apresentaram o adjuvante no interior, envolvidos por uma camada do adjuvante lactose cuja estrutura prismática confere com o observado na imagem de lactose pura (Figura 19-B). Os microaglomerados contendo lactose (Figuras 19-B, D e F) apresentaram morfologia disforme em relação aos microaglomerados contendo sílica (Figuras 19-A, C e E), que apresentaram estrutura esférica.

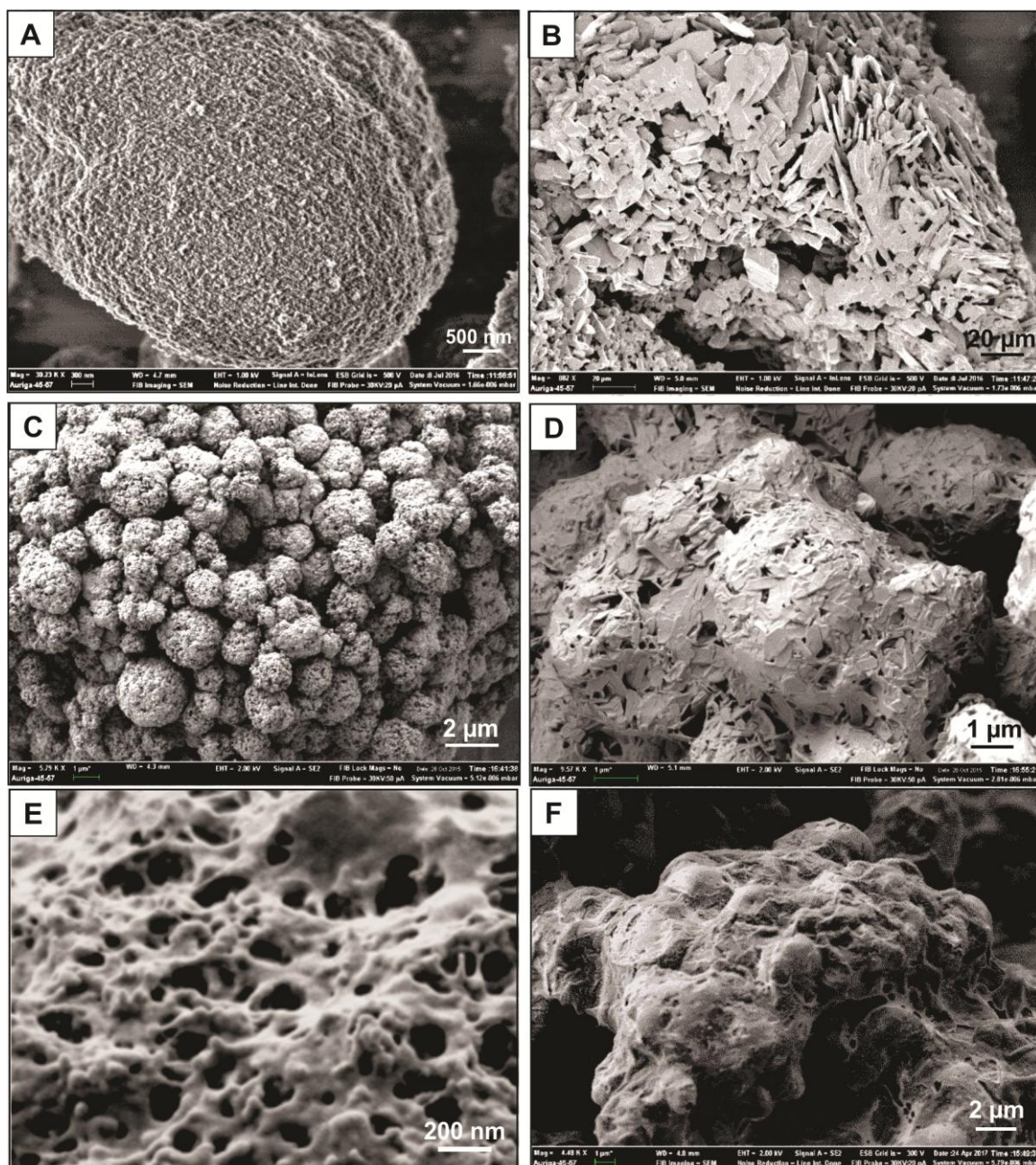


Figura 19: Comparação das formulações analisadas: sílica pura (A), lactose pura (B), nanocápsulas de PCL secas com adjuvante sílica (C), nanocápsulas de PCL secas com adjuvante lactose (D), nanocápsulas de EUD secas com adjuvante sílica (E), nanocápsulas de EUD secas com adjuvante lactose (F).

4.8 SUBSTRATO TEGUMENTAR: ANEXOS

As nanocápsulas são amplamente utilizadas como transportadoras de fármacos, como já citado, sendo bastante empregadas nas vias de administração tanto tópicas, como sistêmicas. Assim, o estudo do emprego dessas nanoestruturas em substratos biológicos, tais

como tegumentar, mucoso e epidérmico são importantes para a compreensão da interação das nanocápsulas *versus* o substrato no qual serão administradas.^{36,70,71} Portanto, para esse trabalho, foram empregadas suspensões de nanocápsulas poliméricas de PCL ou EUD em cabelos e unhas humanas; e nanocápsulas secas de PCL ou EUD com adjuvantes de secagem sílica ou lactose em pele (orelha) e esôfago suíno, com base em estudos/patentes da literatura.^{36, 70-78}

4.8.1. Fio de cabelo: amostra controle

A Figura 20 apresenta a amostra controle de fio de cabelo humano. A Figura 20-A apresenta visão geral da estrutura do fio. As imagens 20-B, C e D mostram detalhes das escamas capilares. A Figura 20-E apresenta tomografia em meio à estrutura capilar e a Figura 20-F apresenta a visão interna da região capilar seccionada.

Na Figura 20, verifica-se a presença de cutículas de formas irregulares e contorno arredondado, com algumas partículas esféricas, mas que devem originar-se de impurezas, por tratar-se de amostra controle e ser semelhante às imagens capilares encontradas na literatura.⁷⁹⁻⁸¹ Na Figura 20-F, a diferença da superfície mais clara para o interior escuro deve-se ao recobrimento com ouro do processo de metalização. O recobrimento metálico apresenta aspecto “craquelado” ao longo de toda a superfície e será possível de ser reconhecido nas demais amostras.

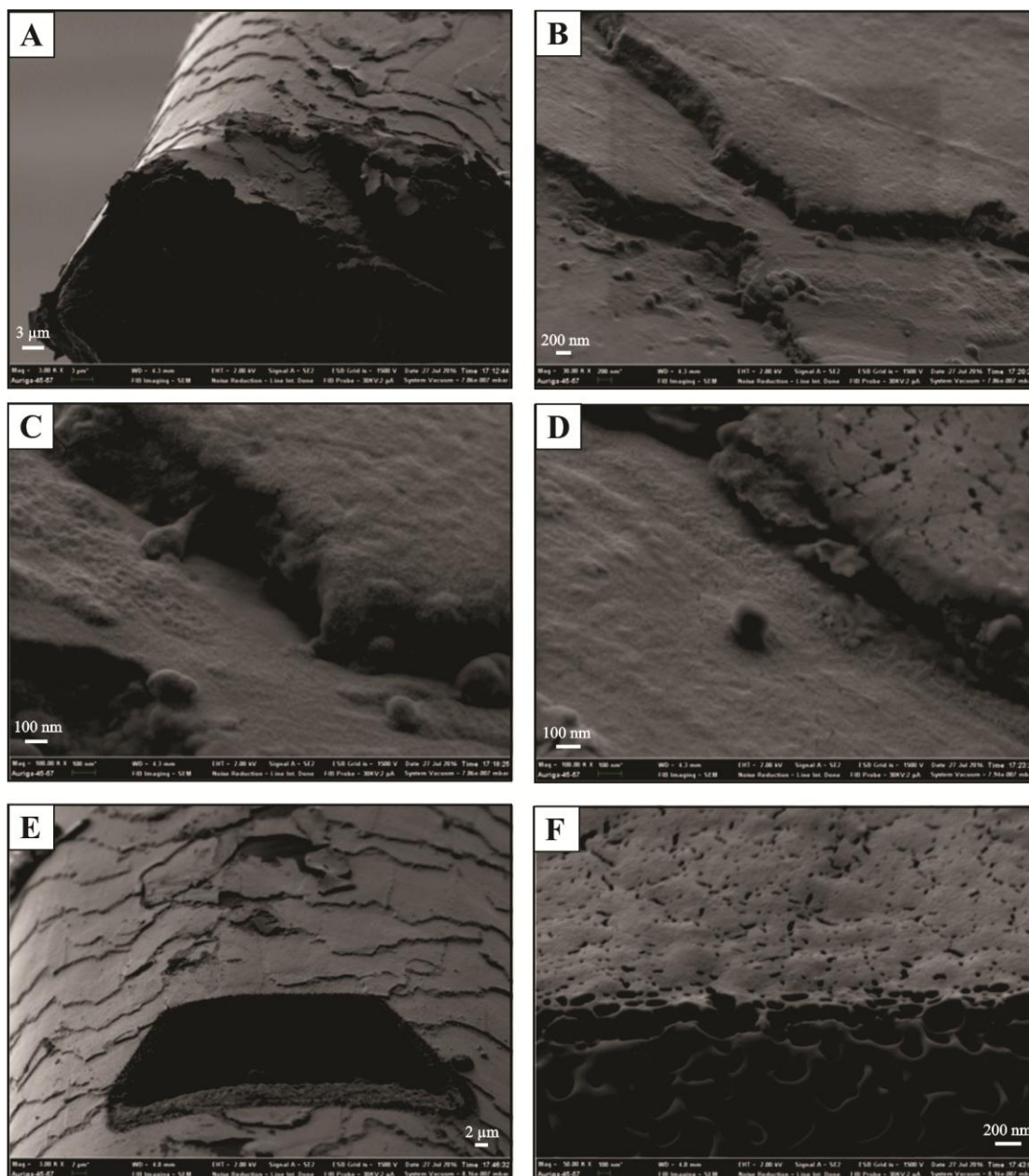


Figura 20: Amostra controle de fio de cabelo humano. A-D: superfície de fio de cabelo humano; E, F: análise do interior da estrutura capilar.

4.8.2 Fio de cabelo tratado com adição de suspensão de nanocápsulas de PCL

A Figura 21 apresenta fio de cabelo humano tratado com suspensão de nanocápsulas de PCL. As imagens 21-A e B trazem a região das escamas do cabelo com visão geral e em detalhes nas escamas do cabelo, respectivamente. A Figura 21-C apresenta nanoestruturas

aderidas sobre as escamas capilares. E as Figuras 21-D, E e F mostram detalhes em uma tomografia realizada sobre a superfície do cabelo.

Observando-se a Figura 21, é possível reconhecer a presença de nanocápsulas de PCL acumuladas nas regiões de contorno das escamas capilares, conforme o que é visto nas imagens 21-A e B. Essas nanocápsulas apresentam tamanho em torno de 300nm, bastante aderidas ao substrato, como se pode ver nas Figuras 21-E e F. Segundo estudos,⁷³ para que uma formulação seja efetiva, é necessário que a mesma seja capaz de promover a penetração e retenção do fármaco em seu local de ação. Produtos de uso tópico para cabelos apresentam baixo alcance de resultados, devido a pouca permeabilidade de alguns fármacos através da camada de queratina, sendo somente uma fração da dose aplicada penetrada nos poros capilares e folículos, que são os locais de maior ação de fármacos para tratamentos capilares.⁷³ No caso de suspensão de nanocápsulas de PCL, as nanoestruturas mantiveram-se aderidas ao fio de cabelo, mas com pouca permeabilidade nas escamas.

As imagens 21-E e F mostram uma tomografia realizada no fio, nas quais se verifica a presença de nanocápsulas aderidas à superfície do substrato, provavelmente resultantes das propriedades altamente bioadesivas do polímero PCL.^{39,40} Este resultado é positivo, pois as nanocápsulas aderidas podem servir de reservatórios para a difusão de fármacos encapsulados, que devido a um gradiente de concentração assim estabelecido, poderão permear eles próprios através da queratina.^{2, 82}

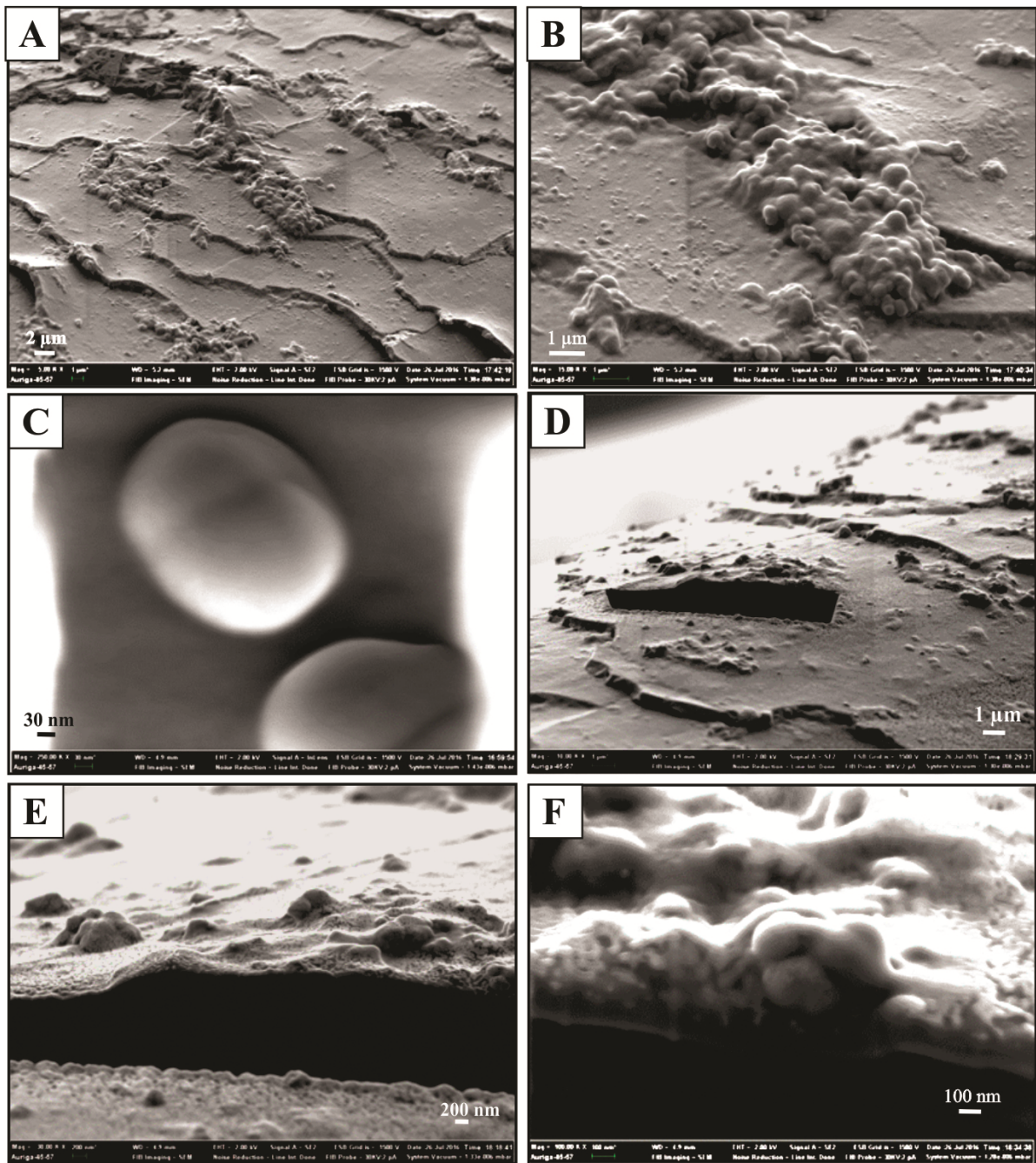


Figura 21: Fio de cabelo humano tratado com suspensão de nanocápsulas de PCL A: superfície do fio de cabelo humano; B: detalhes nas escamas capilares; C: nanoestrutura; D-F: corte na estrutura.

4.8.3 Fio de cabelo tratado com adição de suspensão de nanocápsulas de Eudragit® S 100

A Figura 22 apresenta imagens de fio de cabelo humano tratado com suspensão de nanocápsulas de Eudragit® S 100. A Figura 22-A traz visão geral da estrutura capilar; as

Figuras 22-B, C e D apresentam nanoestruturas sobre a superfície das escamas capilares. As Figuras 22-E, F e G apresentam detalhes nas escamas capilares.

Conforme se pode observar na Figura 22, as nanocápsulas de EUD se mantêm distribuídas ao longo da estrutura capilar e menos aglomeradas nos contornos das escamas queratinosas, ao contrário do que foi evidenciado na Figura 21. Nas Figuras 22-E e F é possível observar a aderência nas nanocápsulas nos contornos das escamas. Essas nanoestruturas apresentam morfologia esférica e diâmetros de cerca de 125nm. As nanocápsulas estão bem distribuídas pelos fios, cobrindo grande parte da área de superfície do cabelo.

Na amostra tratada com suspensão de nanocápsulas de PCL (Figura 21), também se evidenciou a presença de nanocápsulas em sua superfície. Elas se mantiveram mais aglomeradas e menos dispersas ao longo da superfície capilar, em comparação aos capilares com suspensões de EUD. Semelhante ao observado na amostra com suspensão de nanocápsulas de PCL, as tratadas com suspensão de nanocápsulas de EUD também não penetraram nas escamas queratinosas, tratando-se de um resultado positivo na medida em que as nanocápsulas aderidas podem facilitar a difusão de fármacos encapsulados, conforme já explicado no item 4.8.2 deste trabalho.

Além disso, a utilização de micro- e nanopartículas como cosméticos de aplicação na pele ou cabelo, permite o transporte e a liberação dos ativos para uma camada específica do substrato, protegem o material envolvido e mantêm suas propriedades intactas, diminuindo, assim, os riscos de degradação e perda de eficiência causados pela exposição ao sol e ao calor,⁸³ sendo, portanto, interessantes para formulações de proteção capilar, como filtro solares ou produtos de melhoramento estético para os fios de cabelo.

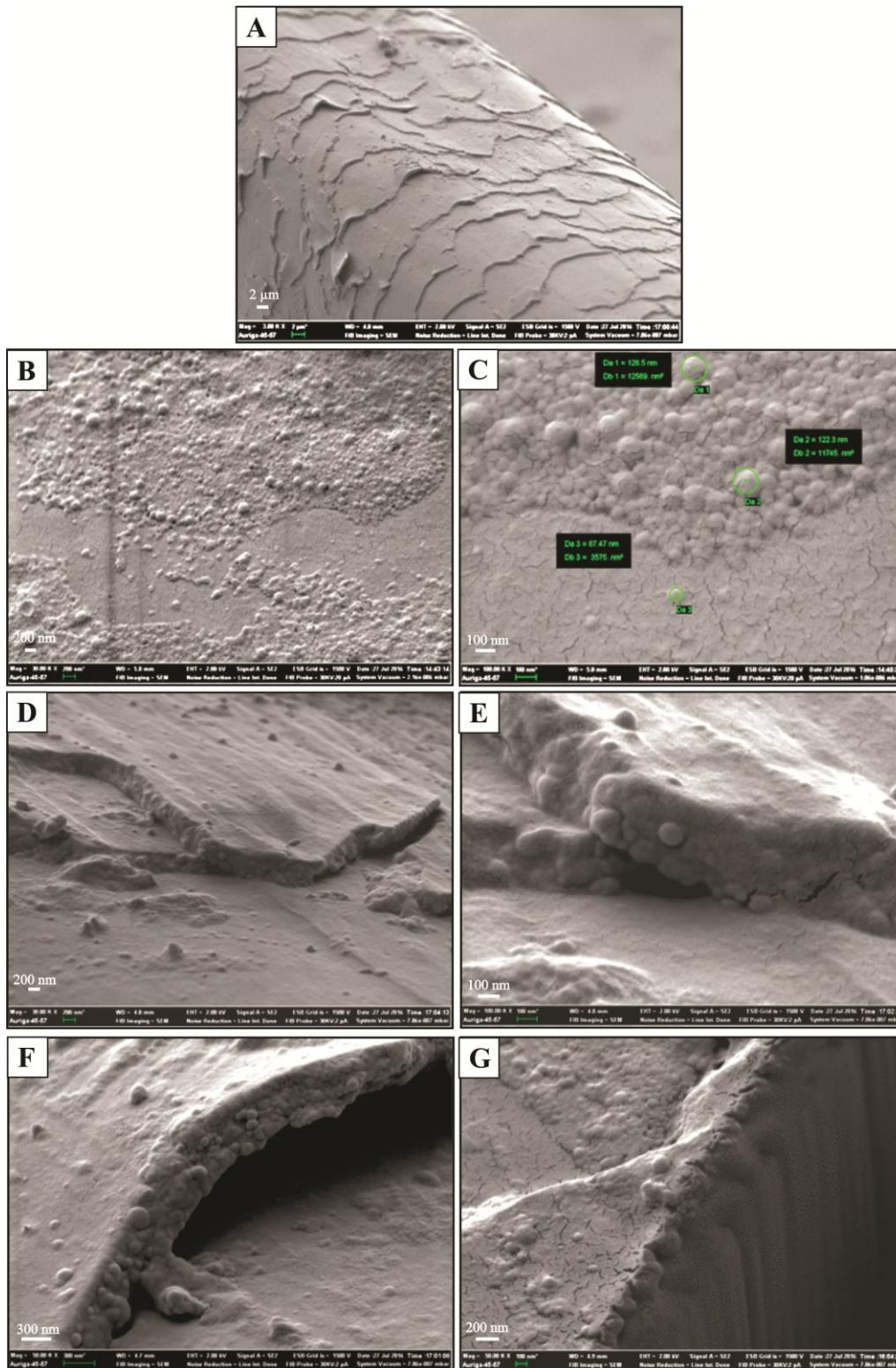


Figura 22: Fio de cabelo humano tratado com suspensão de nanocápsulas de Eudragit® S 100. A-D: superfície do fio de cabelo humano; E-G: detalhes nas escamas capilares.

4.8.4 Unha: amostra controle

A Figura 23 apresenta imagens da amostra controle de unha humana. A Figura 23-A apresenta visão geral das lâminas de queratina. A Figura 23-B apresenta tomografia realizada na superfície da unha e as Figuras C e D apresentam a região interna dos cortes realizados.

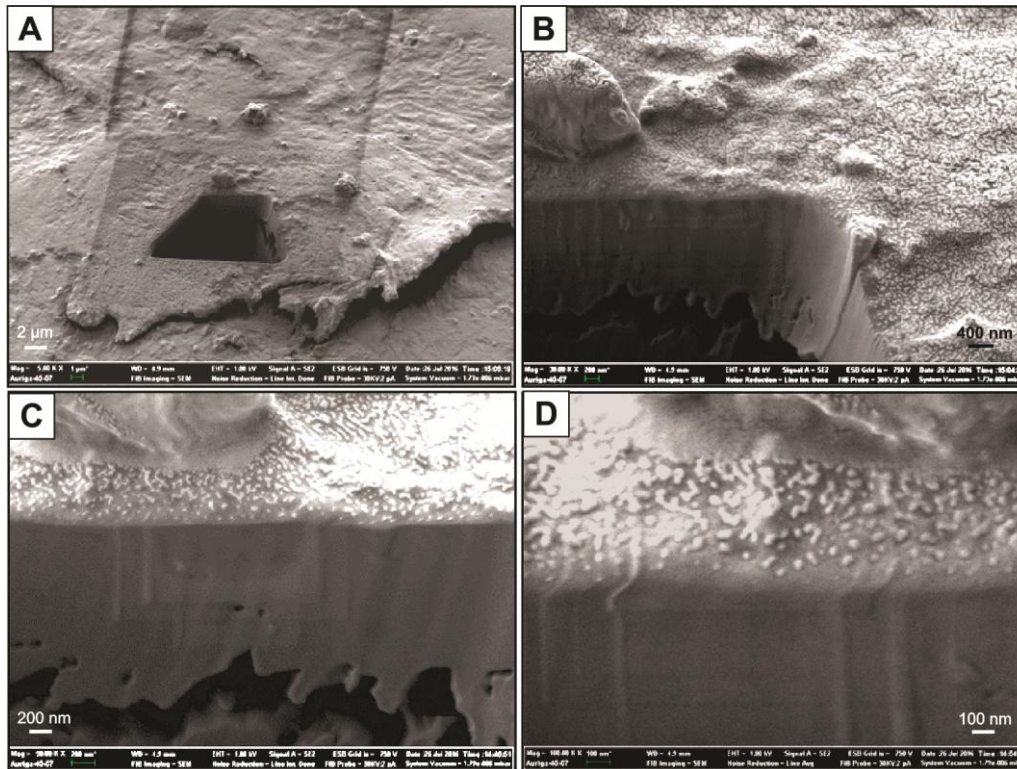


Figura 23: Amostra controle de unha humana: superfície das placas queratinosas com corte (A,B) e detalhes dentro do corte (C,D).

O controle apresentou-se como esperado, onde é possível verificar as características da lâmina ungueal: estrutura queratinizada retangular e plana, levemente convexa.⁸⁴ O recobrimento com ouro (processo de metalização) resultou no aspecto de uma superfície “craquelada” bem evidente nas Figuras 23-C e 23-D.

Na unha está presente α -queratina, um grupo de proteínas que contém α -polipeptídeo helicoidal organizado em filamentos. A unha humana é formada por queratina forte, diferentemente da queratina encontrada na pele, pois a queratina mais dura é formada por uma alta concentração de cistina. As mudanças mecânicas e físicas das propriedades das unhas podem refletir mudanças na estrutura molecular e nas proteínas das unhas.⁸⁴

4.8.5 Unha tratada com suspensão de nanocápsulas de PCL

A Figura 24 apresenta imagens de unha humana tratadas com suspensão de nanocápsulas de PCL. A Figura 24-A apresenta visão geral do substrato e 24-B mostra em maior detalhe a superfície da unha. A Figura 24-C traz em detalhe uma nanoestrutura isolada. As imagens 24-D, E e F apresentam tomografia realizada na superfície da amostra.

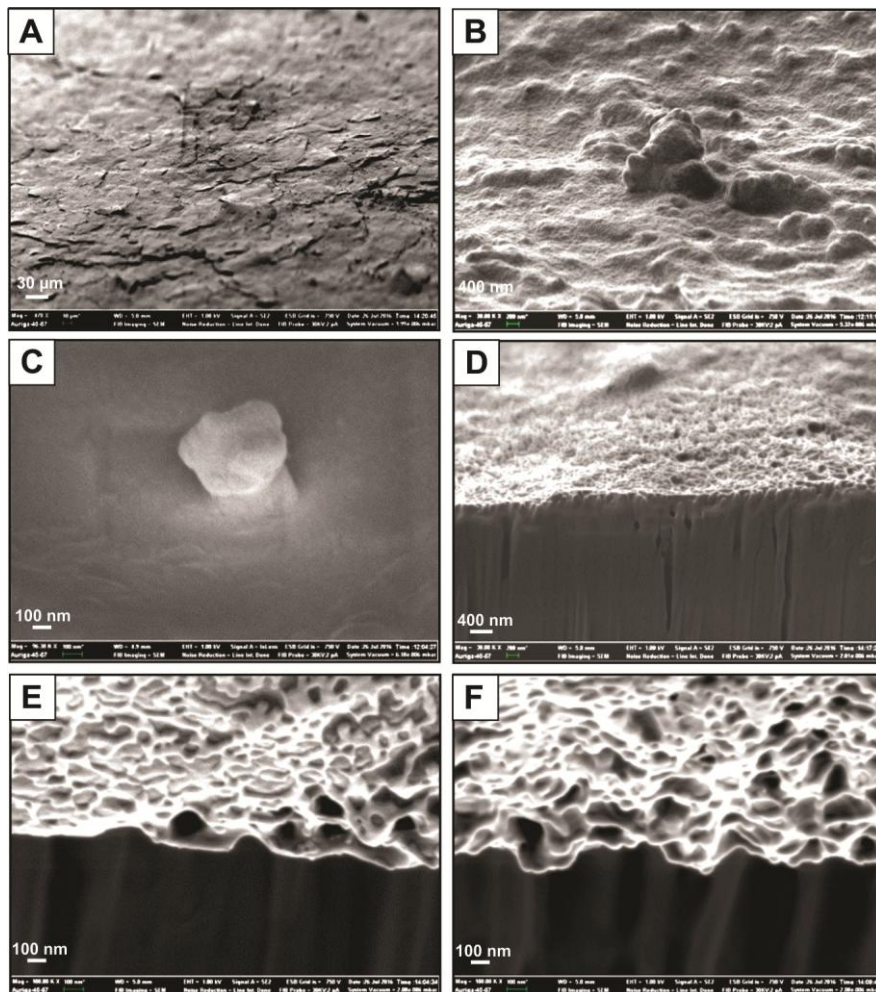


Figura 24: Amostra de unha humana tratada com suspensão de nanocápsulas de PCL: A,B: superfície das placas queratinosas; C: nanoestrutura na superfície da placa; D-F: detalhes dentro do corte.

Na Figura 24, evidenciou-se grande distribuição de nanocápsulas de PCL ao longo do substrato, com tamanho em torno de 300nm, como se pode observar na Figura 24-B, além de baixa aglomeração e alta aderência das nanocápsulas ao substrato. Na Figura 24-C é possível

visualizar um nanoparticulado isolado, em torno de 600nm, que poderia se tratar de um aglomerado de nanocápsulas.

Devido ao tamanho em escala nanométrica, as nanocápsulas podem ficar depositadas em maior número na superfície da unha, expondo, assim, uma maior quantidade de substância ativa, no caso da impregnação de um fármaco no nanosistema. O polímero das nanocápsulas tende a adsorver na interface, devido a mecanismos estéricos e eletrostáticos, bem como por suas propriedades hidrofóbicas superficiais, ocasionando um aumento na eficácia farmacológica, como apresentado em estudos anteriores.⁷⁸ Autores explicam que esta adsorção direciona o fármaco para a estrutura de microorganismos específicos, por exemplo, no caso de tratamentos antifúngicos de onicomicoses.^{79, 85} Outros estudos mostram aumento da eficácia de fármacos de ação antimicrobiana quando estão associados a sistemas nanoestruturados. Além disso, esses sistemas são capazes de melhorar a biodisponibilidade e reduzir a frequência de administrações de fármacos.^{79, 86}

4.8.6 Unha tratada com suspensão de nanocápsulas de Eudragit® S 100

A Figura 25 apresenta imagens de unha humana tratada com suspensão de nanocápsulas de Eudragit® S 100. As Figuras 25-A e B apresentam a superfície do substrato e interior de tomografia realizada, respectivamente. A Figura 25-C mostra o interior de outra região da tomografia e a Figura 25-D apresenta uma microestrutura isolada e sua respectiva medida.

As nanocápsulas de EUD encontraram-se pouco distribuídas ao longo da superfície do substrato com alguns poucos locais com concentração de nanopartículas esféricas. Observa-se a presença de nanopartículas em torno de 150nm (como observado na Figura 25-A e C) e algumas partículas em torno de 10µm (como observado na Figura 25-D), que poderiam ser uma aglomeração de nanocápsulas. No entanto, é interessante a observação realizada na imagem 25-C em que as nanocápsulas de EUD aparecem penetrando as lâminas queratinosas da estrutura ungueal.

De acordo com a literatura, em terapias tópicas se relata a dificuldade de obtenção de penetração na placa ungueal, onde o fármaco não atinge o espaço entre as escamas das unhas, local de desenvolvimento de fungos, por exemplo. As placas das unhas são compostas principalmente de queratina e têm diferentes espessuras conforme o local no corpo humano. Assim, o tamanho reduzido é um parâmetro importante das nanocápsulas, porque influencia o

transporte de fármacos dentro e através das lâminas das unhas.^{78, 87, 88} Outros estudos mostraram que a hidratação das unhas melhora a permeação de fármacos solúveis em água. Assim, a utilização de uma formulação em solução aquosa proporciona hidratação para a queratina, causando expansão e formação de poros maiores, facilitando a permeação de substâncias.^{78, 89} Dessa forma, infere-se que as suspensões de nanocápsulas de EUD apresentam grande potencialidade para tratamentos tópicos em unhas humanas.

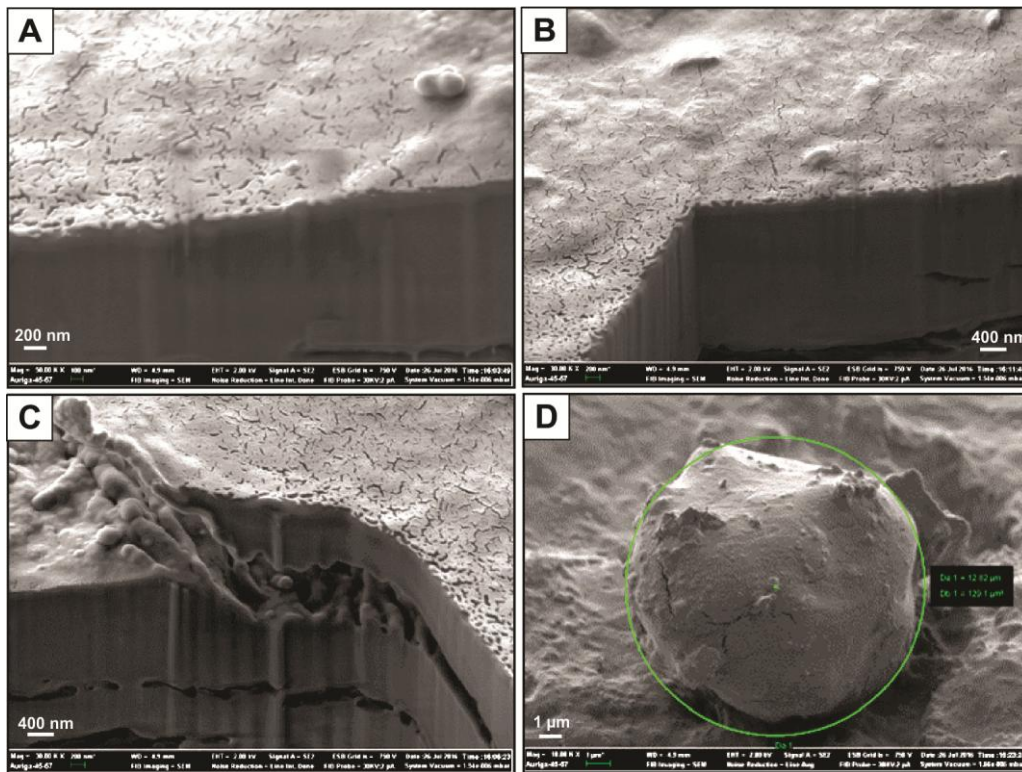


Figura 25: Substrato de unha humana tratada com suspensão de nanocápsulas de Eudragit® S 100. A,B: superfície das placas queratinosas com corte; C: detalhe dentro do corte; D: microestrutura e respectiva medida (12.82µm de diâmetro e 129.1 µm² de área).

4.9 SUBSTRATO TEGUMENTAR: EPIDERME

4.9.1 Pele: amostra controle

A Figura 26 apresenta as análises realizadas em pele de orelha suína. A Figura 26-A mostra uma visão geral da pele, com a inserção de um pelo. A Figura 26-B ilustra algumas

pregas cutâneas e as Figuras 26-C-F trazem imagens da superfície da epiderme em diferentes magnificações.

A pele é composta pela epiderme, a derme e a hipoderme sendo uma complexa barreira em consequência de sua organização anatômica e composição química. Na epiderme, o estrato córneo consiste de 10 a 15 camadas de corneócitos com uma espessura de 10 a 20 μm .⁸² A epiderme apresenta-se como uma via de administração de fármacos bastante atrativa e acessível, porém, essa via é altamente seletiva em relação aos ativos que conseguem difundir passivamente através da camada mais externa da pele, o estrato córneo (camada de queratina).^{82, 90}

Muitos fatores são capazes de governar a liberação de fármaco após a administração de formulações tópicas, tais como o peso molecular e a lipofilicidade da substância, tipo de formulação, presença de intensificadores de penetração química e estado físico do estrato córneo. Além disso, o grau de hidratação do estrato córneo é importante para determinar a taxa de absorção percutânea de fármaco. Assim, um aumento na permeabilidade da água da pele corresponde a um aumento na permeabilidade a compostos tópicos aplicados.⁸²

Existem duas vias disponíveis para a penetração de substâncias na pele, que são a via por anexos cutâneos e a via transepidérmica. Os anexos cutâneos representam uma pequena fração da superfície cutânea (cerca de 0,1% da área total da pele) não se configurando como uma via significativa de penetração para a maior parte das substâncias permeantes. Porém, estudos posteriores indicam que os folículos podem apresentar maior importância na absorção cutânea, já que essa via pode ser interessante para grandes moléculas polares que permeiam através do estrato córneo. Já a penetração via transepidérmica ocorre via intracelular, que é composta pelas rotas que passam através dos corneócitos, envelope de lipídios e apêndices cutâneos; e via intercelular, que é a ocorrida entre os corneócitos.⁹¹

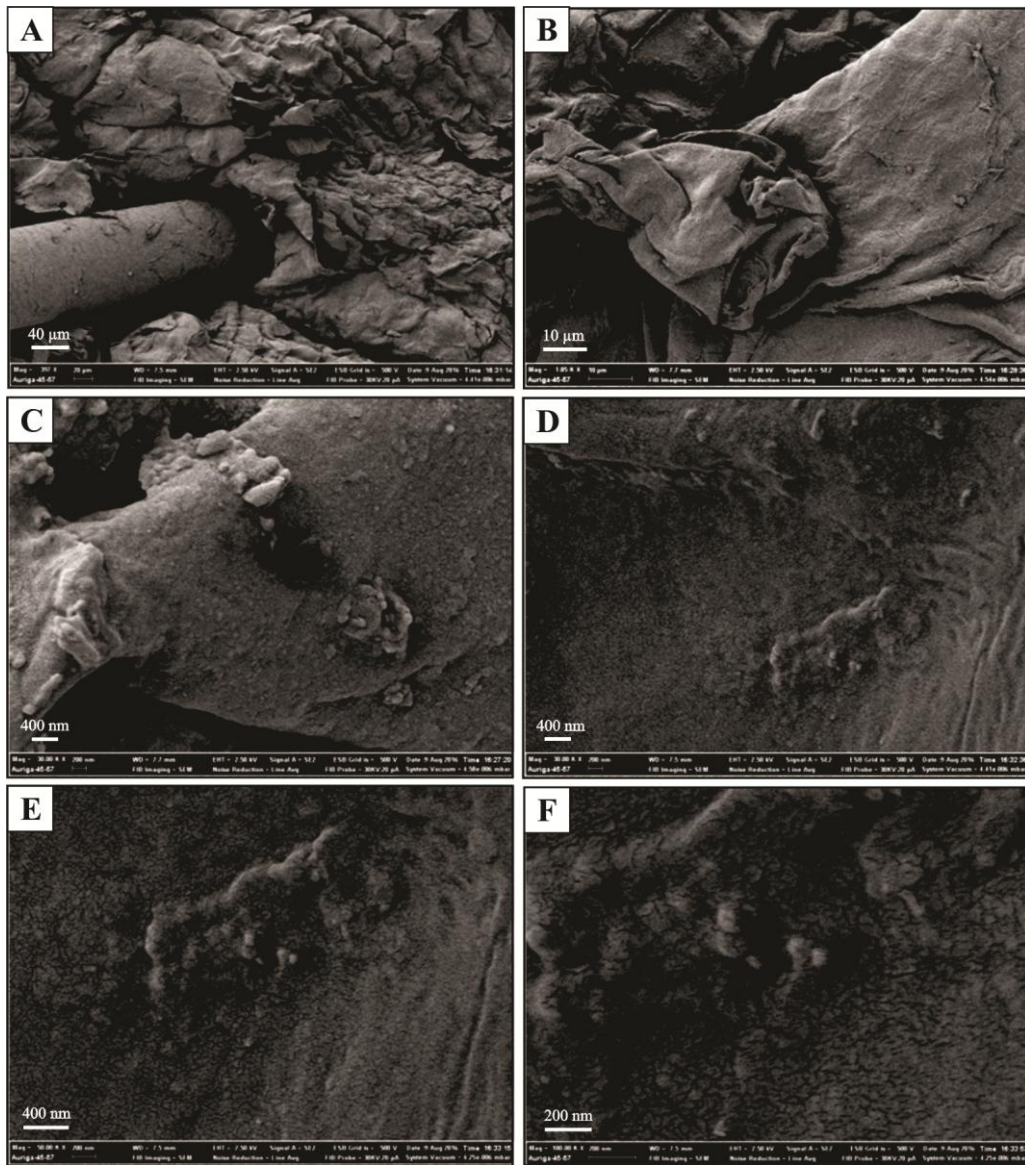


Figura 26: Amostra controle de substrato biológico de pele (de orelha) suína. A: aspecto geral; B: detalhe de pregas cutâneas; C-F: diferentes magnificações da superfície do substrato.

4.9.2 Pele tratada com suspensão de nanocápsulas de PCL

A Figura 27 exhibe as análises realizadas em pele suína tratadas com suspensão de nanocápsulas de PCL. As Figuras 27-A e B apresentam visão geral das amostras; A Figura 27- C apresenta detalhe nas pregas epidérmicas próximas ao pelo. As Figuras D-H apresentam regiões da pele em diferentes magnificações e a Figura-I apresenta em maior aumento a presença de nanoestruturas.

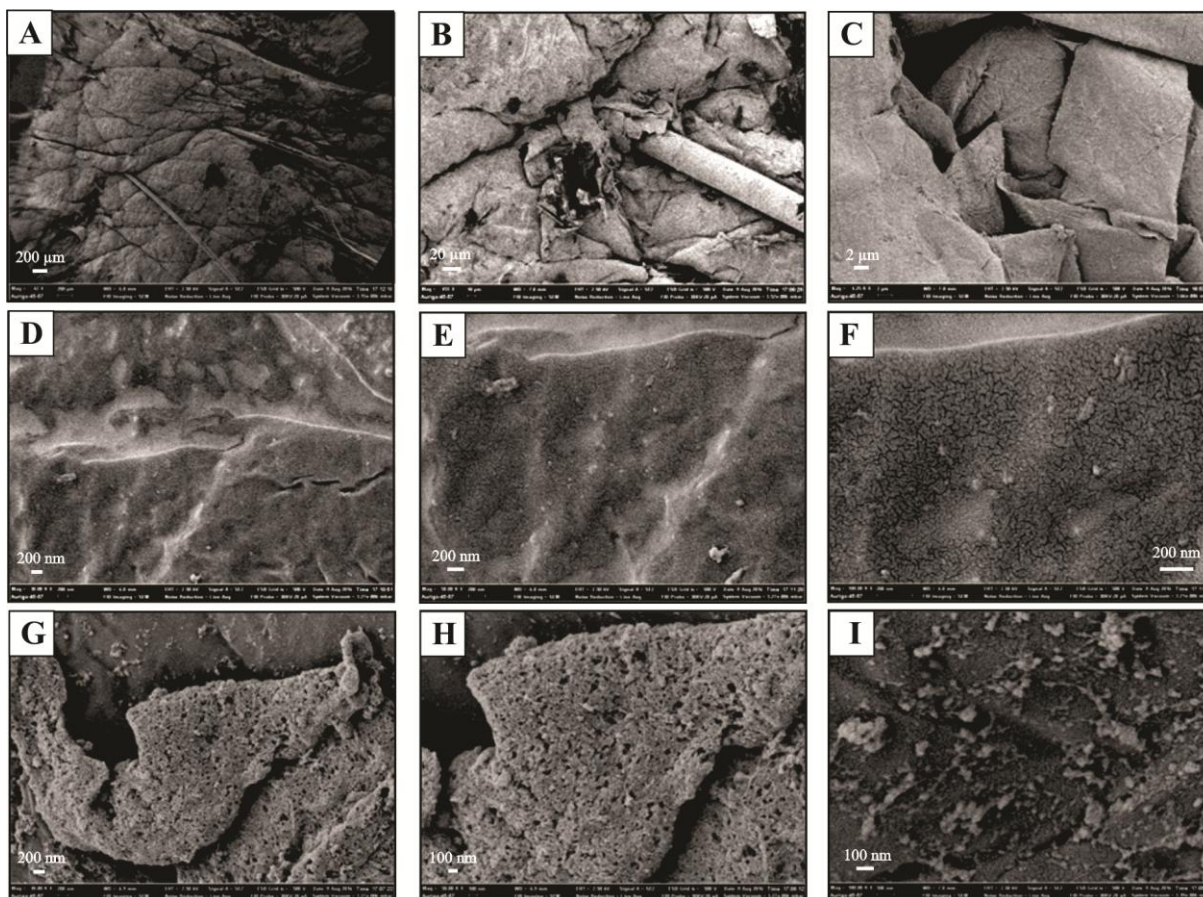


Figura 27: Substrato biológico de pele suína tratada com suspensão de nanocápsulas de PCL. A e B - visão geral das amostras; C: detalhe nas pregas epidérmicas próximas ao pelo; D-H: superfície do substrato em diferentes magnificações; I: presença de nanoestruturas.

Observando-se a Figura 27, é possível evidenciar nanocápsulas dispersas sobre a pele e bastante disformes, com cerca de 100nm de diâmetro (Figura 27-I).

A poli (ϵ -caprolactona) é o polímero mais empregado em sistemas carreadores de fármacos em aplicações cutâneas, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas. Por apresentar característica estrutural semicristalina, esse polímero apresenta degradação mais vagarosa em comparação com poliésteres amorfos. Em relação ao tamanho, na literatura encontra-se descrição de nanopartículas com diâmetros variando entre 100 e 615 nm,⁸² que confere com o que foi observado nesta pesquisa.

Há diversas condições que influenciam as características da pele e suas propriedades biomecânicas, tais como sexo, idade, área corporal, características genéticas e patologias. A epiderme possui um importante papel na resistência da pele a agressões mecânicas, e esta

resistência é dependente de suas propriedades hidrofílicas e lipofílicas, por isso um aumento na hidratação e nutrição melhora a resistência contra deformações.⁹²

Em relação ao uso cutâneo, estudos mostram que nanocápsulas podem atuar como reservatório de fármacos lipofílicos, modulando sua permeação através da pele, controlando o contato das substâncias com o estrato córneo, além disso, tratamentos clínicos através de nanocápsulas tem se apresentado como uma estratégia para diminuir a irritação e complicações alérgicas das substâncias ativas após aplicação na pele, controlando a taxa de libertação da substância de efeito irritante e evitando o contacto direto entre a substância e a pele.⁷⁰ Por exemplo, estudos avaliaram nanocápsulas de PCL contendo clorexidina contra *Staphylococcus epidermidis* e observou-se que essas nanoestruturas aumentaram o tempo de contato da clorexidina com a pele, além de proporcionar uma liberação gradual e contínua da substância por pelo menos oito horas e a concentração residual de clorexidina no estrato córneo foi três vezes maior utilizando a suspensão de nanocápsulas em hidrogel em relação à formulação contendo a substância ativa não-encapsulada, proporcionando uma atividade antimicrobiana tópica prolongada contra as bactérias do estudo.^{92, 93}

4.9.3 Pele tratada com nanocápsulas secas de PCL e adjuvante sílica

A Figura 28 apresenta imagens das amostras de pele de orelha suína tratadas com nanocápsulas secas de PCL e adjuvante sílica. A imagem 28-A mostra aspecto geral da pele com presença de pelo. As imagens 28-B e C apresentam a pele ao redor do pelo, onde em 28-C há presença de nanoestruturas. As imagens 28-D a 28-I apresentam com maiores detalhes as nanoestruturas exibidas na imagem 28-C e a pele no entorno. As imagens 28-J e K mostram uma visão geral da superfície do pelo da imagem 28-A. A Figura 28-L exibe em maior detalhe uma nanoestrutura localizada sobre o pelo.

A absorção de componentes ativos topicamente administrados em pele acontece por difusão, pela epiderme ou pelos apêndices cutâneos, sendo menos frequente nesse último por estarem em menor porcentagem na superfície. Quando a difusão ocorre pela epiderme, pode ser entre ou através dos queratinócitos, respectivamente, pelo meio intercelular ou transcelular. Assim existem três vias de penetração, a intercelular, a transcelular e pelos apêndices. Este processo pode ser facilitado pelo uso de promotores de penetração, como os tensoativos, que são substâncias anfifílicas, que, permitem a formação dos sistemas de liberação de ativos, e resultam na entrega da substância no local desejado por um período

prolongado⁹⁴ e que foram inseridos na formulação das nanocápsulas nas duas fases da preparação das suspensões do presente estudo, tanto na fase orgânica/lipofílica (em que foi utilizado um tensoativo de baixo equilíbrio hidrófilo- lipófilo), quanto na fase aquosa (em que foi utilizado um tensoativo de elevado equilíbrio hidrófilo-lipófilo).

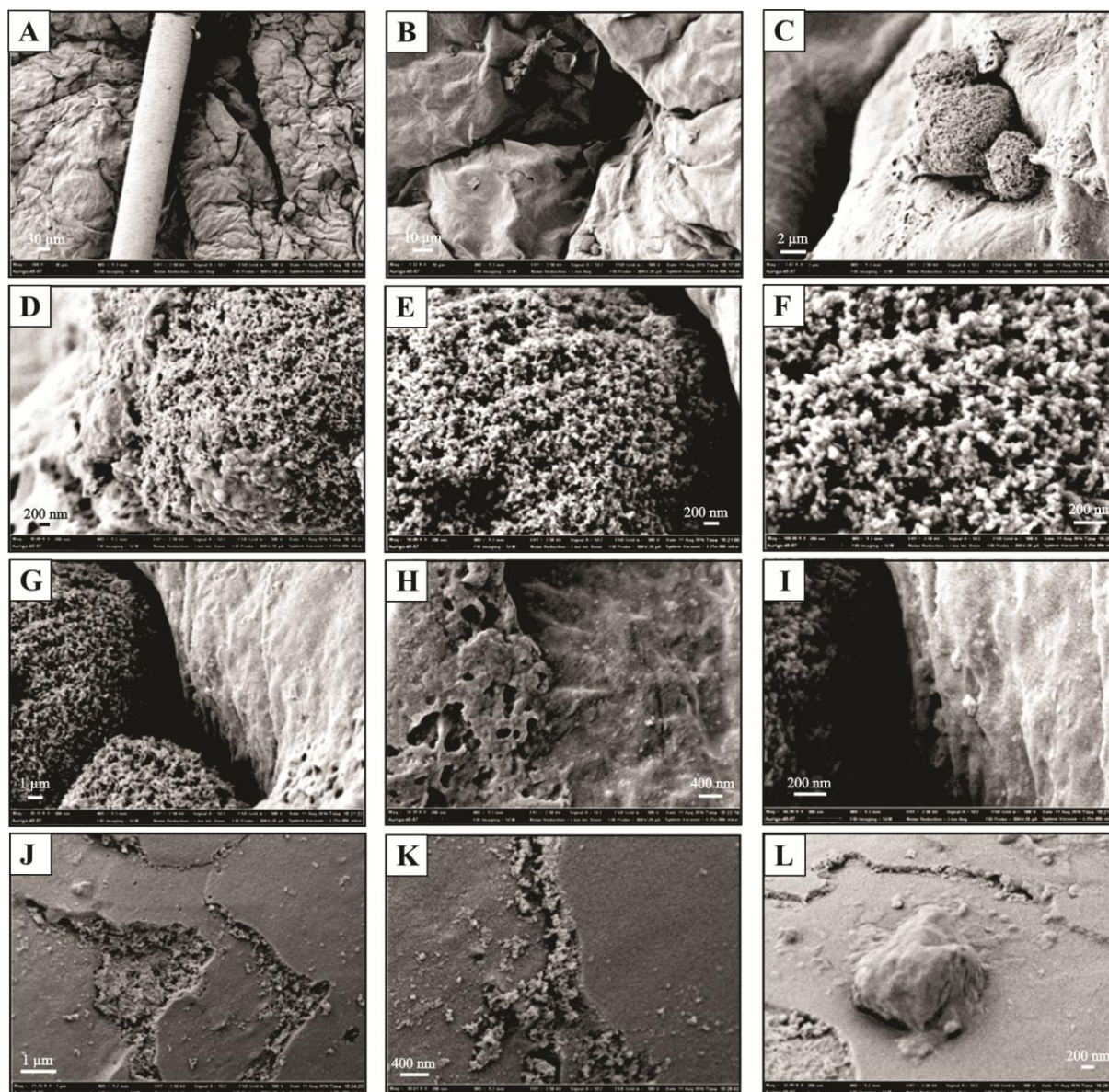


Figura 28: Substrato biológico de pele de orelha suína tratada com nanocápsulas secas de PCL e adjuvante sílica. A: aspecto geral da pele com presença de pelo; B: pele ao redor do pelo; C: presença de nanoestruturas na superfície epidérmica; D-I: nanoestruturas exibidas na imagem 28-C e a pele no entorno; J e K: visão geral da superfície do pelo da imagem 28-A; L: nanoestrutura localizada sobre o pelo em maior detalhe.

De acordo com o observado na Figura 28, analisou-se que as nanocápsulas estavam presentes principalmente em regiões cutâneas próximas aos pelos, locais promotores de penetração cutânea, e, apesar de serem os menos frequentes, foram as regiões com maior acúmulo de nanocápsulas, o que pode ser explicado pela afirmação do autor Souza⁹⁵ ao explicar que o local de aplicação, a existência de folículos pilosos, a concentração do estrato córneo e o grau de hidratação da pele influenciam diretamente na penetração cutânea⁹⁴ já que a pele da orelha suína possui grande quantidade de pelos em sua região.

Conforme a Figura 28-C, os microaglomerados de PCL com adjuvante sílica encontrados apresentam diâmetro em torno de 4 μ m e as nanocápsulas, conforme a imagem 28-F, apresentam em torno de 40nm. A forma esférica e tamanho dos microaglomerados assemelha-se com os pós secos de PCL com adjuvante sílica analisados e exibidos na Figura 12 desta pesquisa. A microestrutura encontrada sobre o pelo, Figura 28-L, apresenta em torno de 2 μ m, o que provavelmente seja um microaglomerado de nanocápsulas desse grupo amostral. Além disso, observando-se as Figuras 28-J e K, é perceptível a semelhança de distribuição das nanocápsulas nos contornos das escamas dos pelos, assim como se evidenciou nas escamas capilares exibidas na Figura 21. A Figura 29 traz a comparação entre o que foi observado na pele tratada com nanocápsulas de PCL com adjuvante sílica e o que já foi apresentado neste trabalho quanto às análises dos pós secos de PCL com adjuvante sílica ou suspensão de nanocápsulas de PCL.

4.9.4 Pele tratada com nanocápsulas secas de PCL e adjuvante lactose

A Figura 30 mostra imagens das amostras de pele de orelha suína tratadas com nanocápsulas secas de PCL e adjuvante lactose em que a imagem 30-A apresenta aspecto geral da pele com presença de pelos e as imagens 30-B e C detalham as placas de queratina da pele. A imagem 30-D apresenta aspecto geral de um pelo coberto por nanoestruturas. A imagem 30-E traz um pelo encontrado ao acaso e que sofreu algum tipo de corrosão em sua superfície e na imagem 30-F apresenta-se uma escama desse pelo com a parte interna exposta.

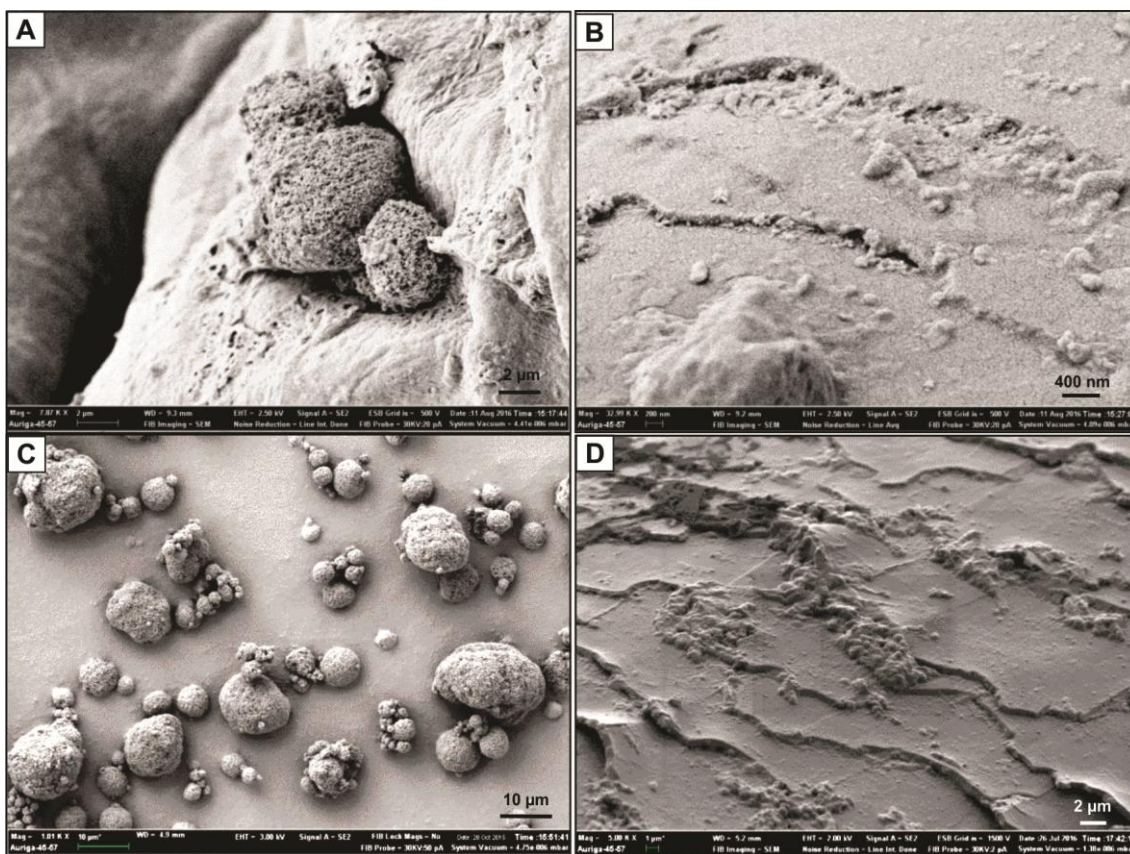


Figura 29: Comparação entre microaglomerados de nanocápsulas de PCL com adjuvante sílica no tratamento de pele suína (A), nanocápsulas de PCL com adjuvante sílica sobre pelo no tratamento de pele suína (B), pós secos de microaglomerados de nanocápsulas de PCL com adjuvante sílica (C), superfície de cabelo humano tratado com suspensão de nanocápsulas de PCL (D).

Nas Figuras 30-B e C é possível verificar a presença de microaglomerados de nanocápsulas com mesma morfologia disforme observados nos pós secos de PCL com adjuvante lactose. É interessante observar que esses microaglomerados apresentam em torno de $3\mu\text{m}$, valor muito inferior aos $35\mu\text{m}$ de diâmetro encontrados nos microaglomerados dos pós secos do mesmo grupo amostral. Isso também se evidenciou na pele tratada com nanocápsulas de PCL e adjuvante sílica, onde o tamanho médio dos microaglomerados foi em torno de $4\mu\text{m}$, enquanto nos pós secos do mesmo grupo amostral foi em torno de $14\mu\text{m}$. Essas evidências podem ser explicadas pelas características físico-químicas do polímero PCL, devido a sua alta biodegradabilidade e biocompatibilidade.³⁸ Na imagem 30-C é possível analisar nanocápsulas isoladas de tamanho de diâmetro em torno de 120nm .

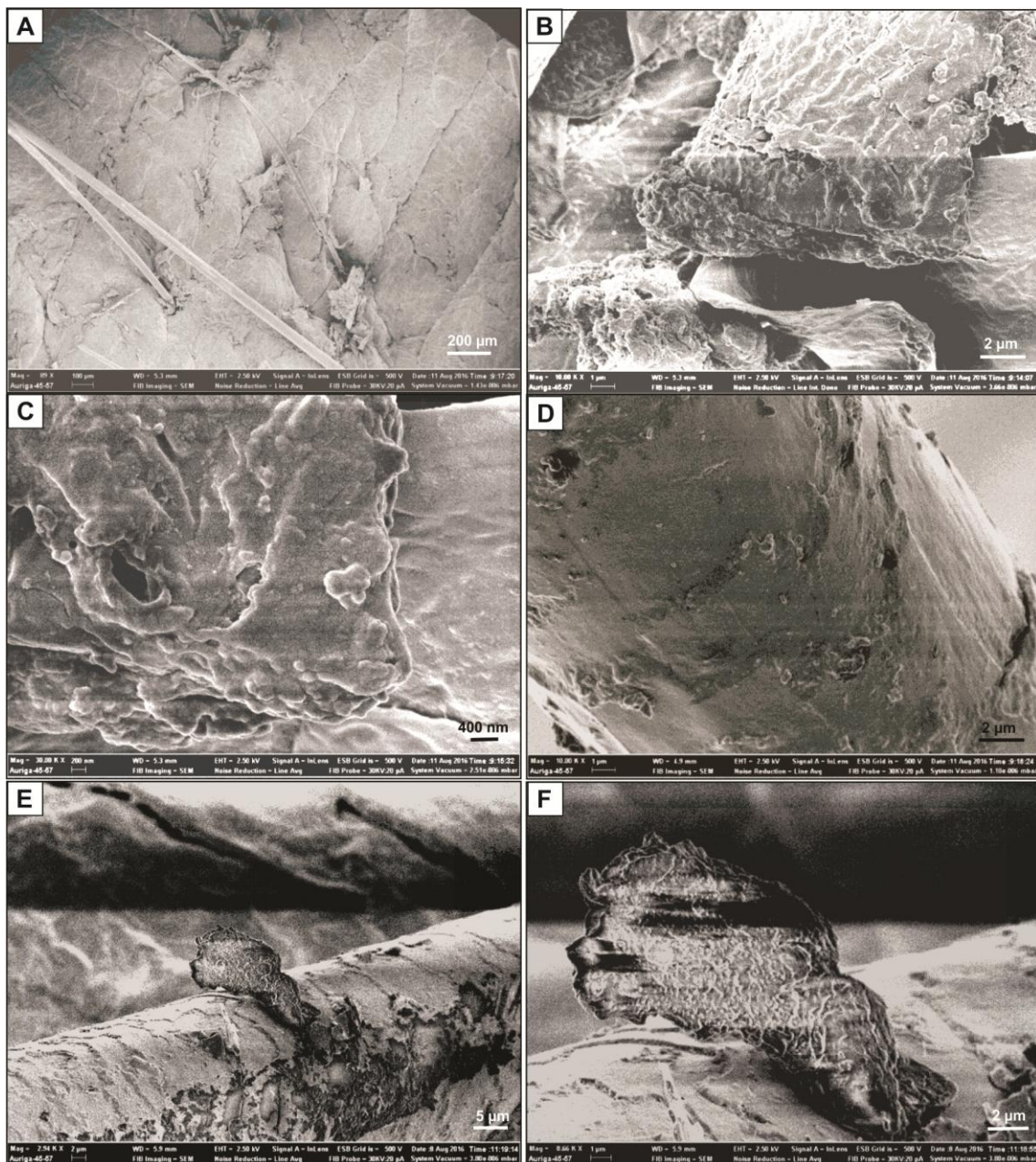


Figura 30: Substrato de pele suína tratada com nanocápsulas de PCL e adjuvante lactose A: aspecto geral; B e C: detalhes na superfície da pele em diferentes magnificações; D: visão geral de pelo presente no substrato; E: pelo encontrado ao acaso com corrosões na superfície; F: detalhe de escama do pelo exibido em E.

Com relação aos microaglomerados encontrados sobre os pelos, também se observou um acúmulo maior na região dos contornos das escamas queratinosas (conforme exposto na Figura 30-D), igualmente como na amostra de pele tratada com nanocápsulas de PCL com adjuvante sílica. Na imagem 30-F, é interessante analisar a grande quantidade de nanocápsulas na parte interna das escamas do pelo. Esse dado representa a grande permeação

desse grupo amostral na pele suína, em que provavelmente, pela biocompatibilidade do polímero PCL³⁸ e pelo tamanho dessas nanoestruturas, a permeabilidade seja favorecida em pele.

4.9.5 Pele tratada com suspensão de nanocápsulas de Eudragit® S 100

A Figura 31 apresenta as amostras de pele de orelha suína tratadas com suspensão de nanocápsulas de Eudragit® S 100. A imagem 31-A apresenta a região ao redor de um folículo piloso (que perdeu o pelo) com várias nanoestruturas. As imagens 31-B e C destacam essas nanoestruturas analisadas na imagem 31-A. As imagens 31-D, E e F apresentam a superfície de um pelo anexo ao substrato. A Figura 31-G apresenta uma nanoestrutura isolada sobre a superfície da pele. As Figuras 31-H, I e J mostram em ampliações maiores a nanoestrutura da imagem 31-G. As Figuras 31-K a O apresentam vários microaglomerados encontrados sobre a superfície cutânea.

Observando-se a Figura 31, é verificada a presença de nanocápsulas de Eudragit® S 100 próximas a pelos e também dispersas sobre toda a superfície da pele (Figuras A, B e C), bem como sobre toda a superfície dos pelos de forma homogênea (Figura 31-D, E, F). Assim como no que foi observado no tratamento de fios de cabelo com suspensão de nanocápsulas de EUD, no tratamento de pele suína com o mesmo grupo amostral também apresentou as nanocápsulas bastante dispersas. No entanto, enquanto em fios de cabelo as nanocápsulas apresentaram formato esférico (Figura 22), em pele apresentaram morfologia prismática.

Na busca por material científico indexado em bancos de dados, não foram encontrados trabalhos direcionados especificamente às suspensões de nanocápsulas de Eudragit® S 100 em aplicações cutâneas. A busca pelos artigos científicos foi realizada, através do acesso a bancos de dados (ISI Web of Science, Pub Med e Periódicos Capes).

Em estudos anteriores, suspensões de nanopartículas de polímero da linha Eudragit® foram relatadas como um sistema de suporte válido para a liberação oftálmica de anti-inflamatórios não-esteróides, tais como ibuprofeno e flurbiprofeno, demonstrando que as suspensões de nanopartículas Eudragit® RS 100 (polímero que difere do Eudragit® S 100 por possuir grupo catiônico⁹⁶) carregados com ibuprofeno ou com flurbiprofeno foram capazes de inibir significativamente a resposta miótica induzida por um trauma cirúrgico no olho de coelho. Outros estudos sugerem que a dispersão do fármaco dentro das nanopartículas de polímero Eudragit® RS 100 aumenta a sua biodisponibilidade e atividade anti-inflamatória. Os autores concluíram que a aplicação de formulações em suspensão de

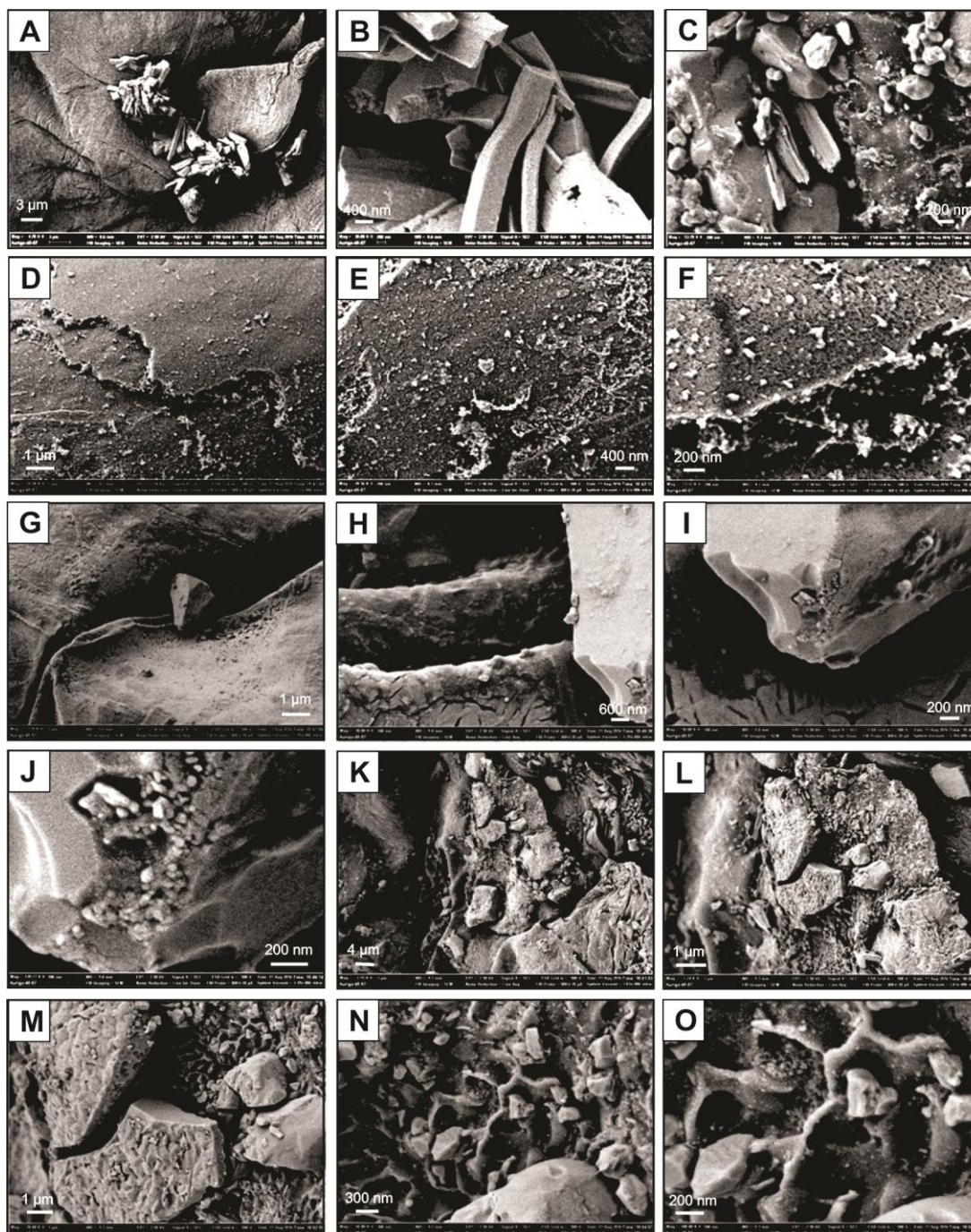


Figura 31: Substrato de pele suína tratada com suspensão de nanocápsulas de Eudragit® S 100. A-C: substrato de pele próximo a folículos pilosos; D-F: superfície de fio de pelo do substrato cutâneo; G-O: superfície da pele suína com as nanoestruturas do tratamento em diferentes magnificações.

nanocápsulas de Eudragit® RS 100 pode aumentar o tempo de residência das nanopartículas na superfície da córnea, mesmo sendo esse polímero conhecido por não possuir características muco-adesivas relevantes, resultando em uma liberação lenta e prolongada de fármaco.⁹⁷

Sendo assim, podemos inferir que a presença de suspensões de nanocápsulas dispersas homogeneamente pela superfície da pele pode indicar um fator positivo por manter por tempo prolongado as nanoestruturas e os fármacos empregados na formulação, havendo uma liberação lenta dos compostos ativos. Assim, podemos sugerir que o Eudragit® S 100 também apresenta características muco-adesivas relevantes, já que se evidenciou grande número de nanocápsulas dispersas na superfície cutânea e pilosa.

4.9.6 Pele tratada com nanocápsulas secas de Eudragit® S 100 e adjuvante sílica

A Figura 32 apresenta imagens de pele suína tratada com pós de nanocápsulas de Eudragit® S 100 e adjuvante sílica. A Figura 32-A e B apresentam aspecto geral da superfície da pele com presença de pelos. As Figuras 32-C a L apresentam vários microaglomerados de nanocápsulas próximos aos folículos pilosos. As imagens 32-M, N e O apresentam esses microaglomerados em detalhes.

De acordo com a Figura 32, fica evidente a semelhança dos microaglomerados de nanocápsulas de EUD secos por sílica sobre o substrato cutâneo e os pós secos do mesmo grupo amostral desse tratamento, exposto na Figura 15. Esses microaglomerados apresentam diâmetro médio em torno de 5 μ m, de morfologia esférica, com nanocápsulas aderidas à superfície por meio de hastes de fixação (Figura 32-O), assim como identificado nos pós secos desse mesmo grupo amostral. Na Figura 32-O observa-se melhor o tamanho de diâmetro das nanocápsulas sobre o microaglomerado, sendo em torno de 50nm.

Conforme observado nas imagens 32-C, E, F e I, há grande acúmulo de nanocápsulas próximas às regiões de pelos. Estudos anteriores com nanocápsulas poliméricas da linha Eudragit®, mostram que essas aumentam a viscosidade de hidrogéis para fins de aplicação tópica em tratamentos cutâneos, quando comparadas com um gel ausentes dessas nanoestruturas.⁷⁰

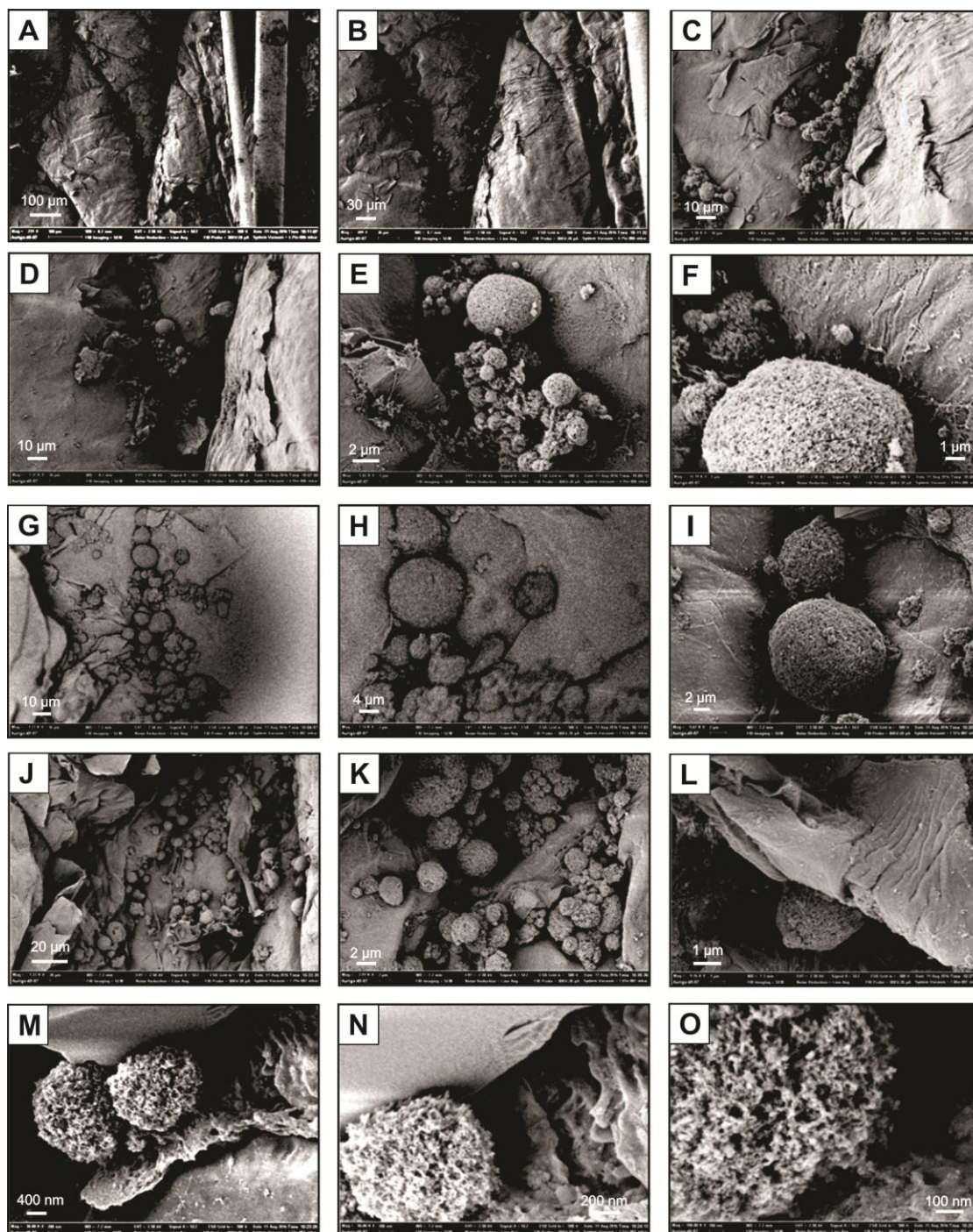


Figura 32: Substrato de pele suína tratada com pós de nanocápsulas de Eudragit® S 100 e adjuvante sílica. A-C: substrato de pele suína próximas a folículos pilosos; D-L: superfície cutânea com presença de microaglomerados de nanocápsulas em diferentes magnificações; M-O: detalhe dos microaglomerados em diferentes magnificações.

4.9.7 Pele tratadas com nanocápsulas secas de Eudragit® S 100 e adjuvante lactose

A Figura 33 apresenta substrato de pele suína tratada com pós de nanocápsulas de Eudragit® S 100 e adjuvante lactose. As Figuras A-C trazem uma visão geral da superfície da pele. As imagens D-F apresentam os microaglomerados de nanocápsulas de Eudragit® S100 e adjuvante lactose e as Figuras G-I apresentam os microaglomerados na superfície do pelo.

Observando-se a Figura 33, foi possível verificar a presença de microaglomerados de nanocápsulas de EUD com adjuvante lactose mais uniformemente espalhados pela superfície da pele suína em comparação ao tratamento com nanocápsulas de EUD com sílica; no entanto, também há aglomerações de nanocápsulas próximas às fixações de pelos. Os microaglomerados apresentam-se disformes, assim como evidenciado nos pós secos de microaglomerados de nanocápsulas de EUD com adjuvante lactose, com tamanho em torno de 10 μ m (Figura 33-D). As nanocápsulas apresentam tamanho de diâmetro em torno de 80nm, conforme melhor observado nas imagens 33-E e F. Os microaglomerados sobre os pelos (Figuras 33-G-I) se apresentam bastante distribuídos ao longo nas escamas capilares, semelhante às suspensões de nanocápsulas de EUD usadas no tratamento de cabelos humanos (Figura 22).

Estudos afirmam que a elevada área de superfície de nanopartículas pode desempenhar um papel importante na penetração cutânea, pois facilita o contato das moléculas do material encapsulado com o estrato córneo.⁸² Dessa forma, podemos sugerir que a morfologia disforme das nanocápsulas de EUD com adjuvante lactose pode ser um ponto positivo em formulações de tratamentos dermatológicos de uso tópico, no momento em que sua área de superfície é maior do que uma nanoestrutura esférica, por exemplo.

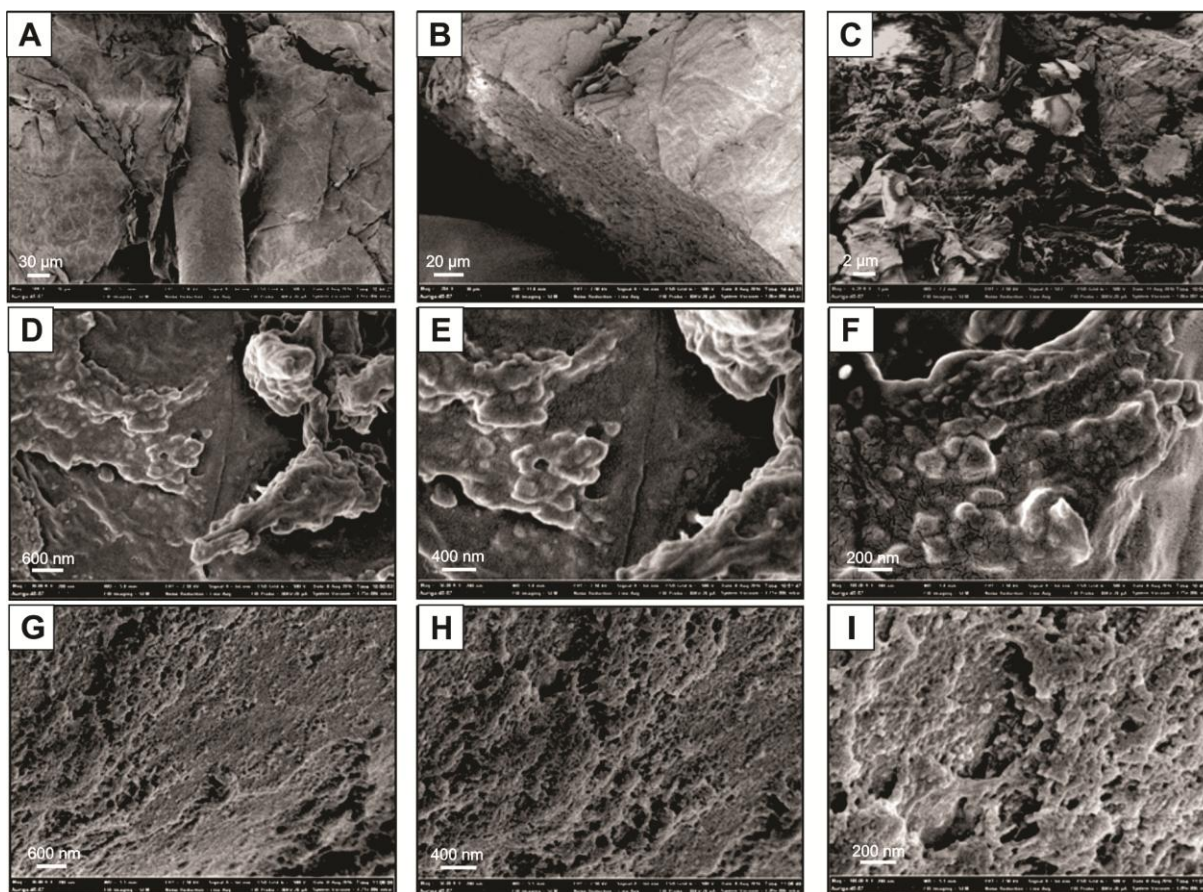


Figura 33: Substrato de pele de orelha suína tratada com pós de nanocápsulas de Eudragit® S 100 e adjuvante lactose. A-C: visão geral do substrato de pele suína próximas a folículos pilosos; D-F: superfície cutânea com presença de microaglomerados de nanocápsulas em diferentes magnificações; M-O: microaglomerados na superfície do pelo anexo à pele.

4.10 SUBSTRATO MUCOSO

4.10.1 Mucosa esofágica: amostra controle

O trato gastrointestinal (TG) consiste em um tubo muscular, com aproximadamente 6m de comprimento e diâmetro variável, estendendo-se da boca até o ânus. É composto de quatro regiões principais, sendo elas o esôfago, intestino delgado, intestino grosso e cólon, em que a superfície do lúmen do TG é bastante rugosa, o que aumenta a superfície de absorção. O TG atua como compartimento que processa mecânico-quimicamente o alimento ingerido, além de seu revestimento atuar como barreira contra patógenos e subprodutos da digestão.⁹⁸ A Figura 34 apresenta imagens da amostra controle da mucosa esofágica suína, substrato do trato

gastrointestinal escolhido por ser a primeira área principal da administração oral de fármacos, apesar de a absorção de fármacos ocorrer principalmente no intestino delgado, em razão de sua maior área de superfície de absorção. Esse substrato é bastante emaranhado e rugoso, característica de um tecido conjuntivo irregular denso.⁹⁸

O transporte de fármacos e nutrientes pelo epitélio ocorre através de duas rotas: a transcelular e paracelular.⁹⁸ Nanocápsulas poliméricas têm sido desenvolvidos visando inúmeras aplicações terapêuticas, sendo planejadas, principalmente, para administração parenteral, oral ou oftálmica, em que as áreas mais promissoras na utilização das nanopartículas são a vetorização de fármacos anticancerígenos e antimicrobianos. Com relação à administração oral de nanopartículas, as pesquisas têm sido direcionadas especialmente à diminuição dos efeitos colaterais de certos fármacos (destacando-se os antiinflamatórios não-esteróides, os quais causam frequentemente irritação à mucosa gastrintestinal) e proteção de fármacos degradáveis no trato gastrointestinal, como peptídeos, proteínas ou hormônios, aumentando a biodisponibilidade dos mesmos.²

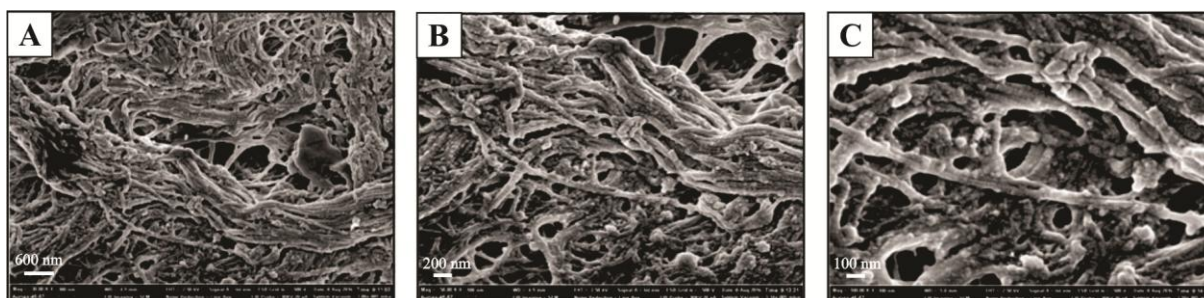


Figura 34: Amostra controle do substrato de mucosa esofágica suína. A-C: superfície do tecido mucoso em diferentes magnificações.

4.10.2 Mucosa esofágica tratada com suspensão de nanocápsulas de PCL

A Figura 35 apresenta imagens de amostras de mucosa esofágica suína tratada com suspensão de nanocápsulas de PCL. A Figura 35-A a J apresentam diferentes imagens da região da mucosa esofágica tratadas com suspensão de nanocápsulas de PCL. As imagens 35K e L apresentam uma microestrutura encontrada na superfície do substrato.

Durante a análise desse substrato amostral, foram observadas diversas áreas da superfície que evidenciam a presença de nanocápsulas. Comparando-se com o controle, o

substrato contém muitas rugosidades, o que poderiam ser facilmente confundidas com a presença de nanocápsulas. Assim, infere-se que por essa superfície ser rugosa e de grande poder de absorção,⁹⁸ e as nanocápsulas em suspensão muito pequenas, a absorção tenha sido intensa a ponto de não serem encontradas na superfície de forma abundante, ou, pela morfologia da superfície da mucosa ser formada por várias rugosidades, essas se confundem com a morfologia das nanocápsulas.

Assim, analisando as imagens selecionadas e exibidas na Figura 35, é possível distinguir aglomerações, melhor visualizadas nas imagens 35-G, H, K e L. As Figuras 35-K e L apresentam uma aglomeração de nanocápsulas de PCL com nanocápsulas menores que 50nm em sua superfície, o qual esses aglomerados poderia ser formados pelo próprio tecido da mucosa ou pelo material da formulação das suspensões de nanocápsulas.

Estudos anteriores,¹⁹ relatam o uso de suspensões de nanocápsulas e nanocápsulas secas de PCL por *spray-dryer* com diclofenaco como modelo de fármaco para avaliação da tolerância gastrointestinal. A pesquisa mostra que tanto as suspensões, quanto as nanocápsulas secas apresentaram baixa lesão na mucosa estomacal, bem como induziram um efeito de proteção no jejuno comparado com os efeitos ulcerativos de soluções de sal de sódio com diclofenaco. Proteção similar à mucosa do trato gastrointestinal foi observada no tratamento com suspensão de nanocápsulas com diclofenaco, onde foi atribuída ao poder de evitar o contato direto entre o diclofenaco e as paredes do intestino.

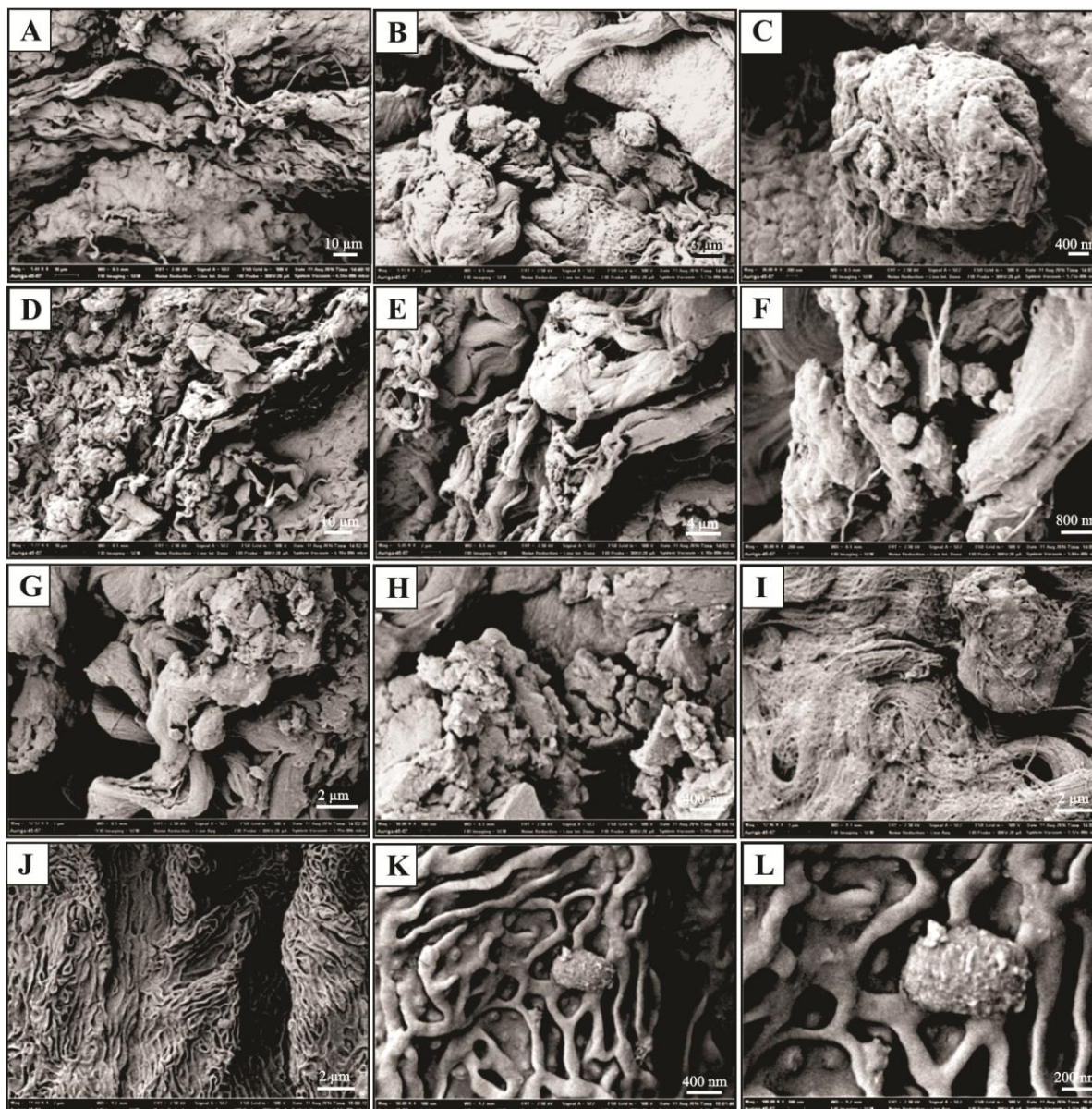


Figura 35: Substrato biológico de mucosa esofágica suína tratada com suspensão de nanocápsulas de PCL A-J: superfície do substrato em diferentes magnificações; K-L detalhe de uma aglomeração de nanocápsulas encontrada sobre a superfície.

4.10.3. Mucosa esofágica tratada com nanocápsulas secas de PCL e adjuvante sílica

A Figura 36 apresenta substrato mucoso esofágico suíno tratado com nanocápsulas secas de PCL e adjuvante sílica. As Figuras 36-A a C mostram visão geral da superfície da mucosa; as Figuras 36-D a F apresentam uma prega na estrutura da superfície do substrato. As Figuras 36-G a L mostram em melhores detalhes a superfície da amostra.

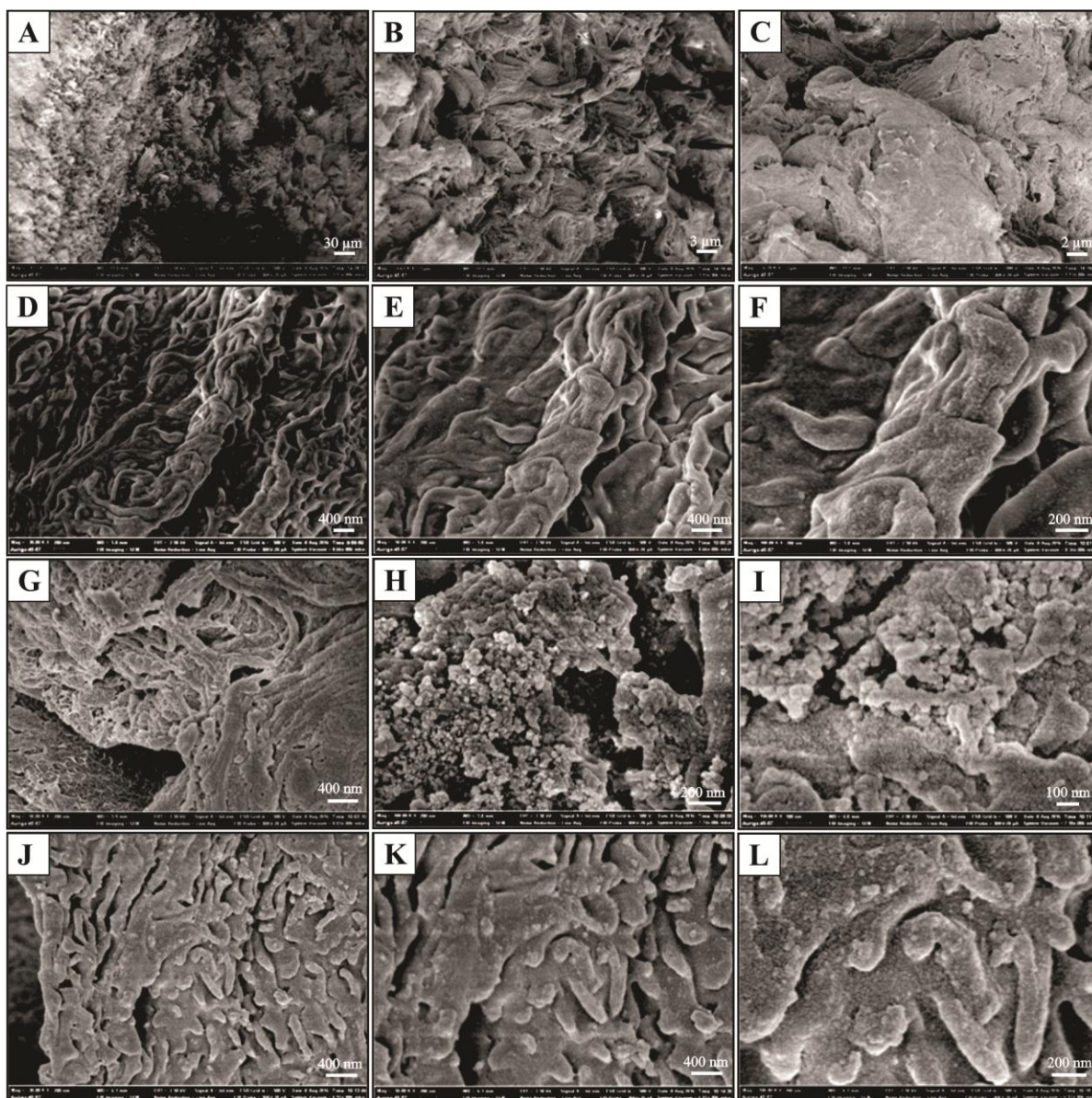


Figura 36: Substrato de mucosa esofágica suína tratada com nanocápsulas de PCL com adjuvante sílica. A-C: visão geral da superfície do tecido mucoso, D-F: pregas na superfície da mucosa; G-L detalhes da superfície do substrato com presença de nanocápsulas.

Conforme se observa a Figura 36, as nanocápsulas de PCL e adjuvante sílica se mantiveram distribuídas ao longo da superfície da amostra de forma homogênea, podendo ser mais bem observadas na Figura 36-H e I, apresentando tamanho médio de 100nm. O material difere morfológicamente dos microaglomerados de pós de nanocápsulas de PCL com adjuvante sílica analisados, pois o material não se apresenta com morfologia esférica homogênea e microaglomerados bem definidos. Pode-se atribuir esse dado à maior interação da sílica com o substrato, já que ela tem propriedades de alta higroscopicidade.²⁶

Trabalhos anteriores^{19,23} relataram o uso de nanocápsulas de PCL com adjuvante sílica secas pela técnica de *spray-dryer* carregadas com diclofenaco para tratamentos clínicos por administração oral. Relataram, através de análise por microscopia eletrônica de varredura, a formação de micropartículas esféricas com nanopartículas adsorvidas em sua superfície com tamanho próximo a 200nm.²³ Após administração oral em ratos das nanocápsulas carregadas com diclofenaco, relataram grande redução do efeito irritante da droga no trato gastrointestinal. Relataram também a característica específica do adjuvante de secagem sílica na proteção da mucosa intestinal. Paralelamente, foi realizado um estudo farmacocinético em ratos, no qual observaram absorção oral completa do diclofenaco a partir de pós pulverizados dispersos em água.¹⁹ Quanto à natureza química de alguns fármacos anti-inflamatórios não esteróides (indometacina, diclofenaco, ibuprofeno e outros) e dióxido de silício, os fármacos na sua forma hidrofóbica apresentam uma porção de ácido carboxílico que podem interagir com grupos hidroxílicos na superfície do dióxido de silício por ligações de hidrogênio e as correspondentes formas hidrofílicas presentes.⁹⁹ As análises por MEV em estudos anteriores¹⁹ mostraram nanocápsulas de PCL (e adjuvante sílica) intactas (por volta de 200nm) na superfície do dióxido de silício e a essas nanocápsulas foram atribuídas o efeito de proteção da mucosa gastrointestinal.

4.10.4 Mucosa esofágica tratada com nanocápsulas secas de PCL e adjuvante lactose

A Figura 37 apresenta imagens do substrato mucoso esofágico suíno tratado com nanocápsulas de PCL e adjuvante lactose. As imagens 37-A a E exibem uma visão geral da superfície do substrato. As imagens 37-F a I mostram em maior detalhe as nanoestruturas localizadas sobre a superfície da amostra.

De acordo com a Figura 37, é possível perceber a presença de nanocápsulas de PCL com lactose ao longo do substrato, em torno de 200nm de diâmetro, sendo possível a visualização principalmente nas Figuras 37-F, H e I. Os dados distinguem-se dos encontrados na análise dos pós secos dos microaglomerados de nanocápsulas de PCL com lactose, pois na aplicação em mucosa, as nanocápsulas não formaram microaglomerados (apesar de se manterem aglomeradas em muitas regiões da superfície da mucosa) e, portanto, não apresentam o envoltório de lactose como evidenciado nos pós secos do mesmo grupo amostral, conforme visualizado na Figura 14. Na literatura científica, não foram encontrados trabalhos que

relatam exatamente esse tipo amostral de nanocápsulas tratadas na mucosa esofágica. A busca pelos artigos científicos foi realizada através do acesso a bancos de dados (ISI Web of Science, Pub Med e Periódicos Capes).

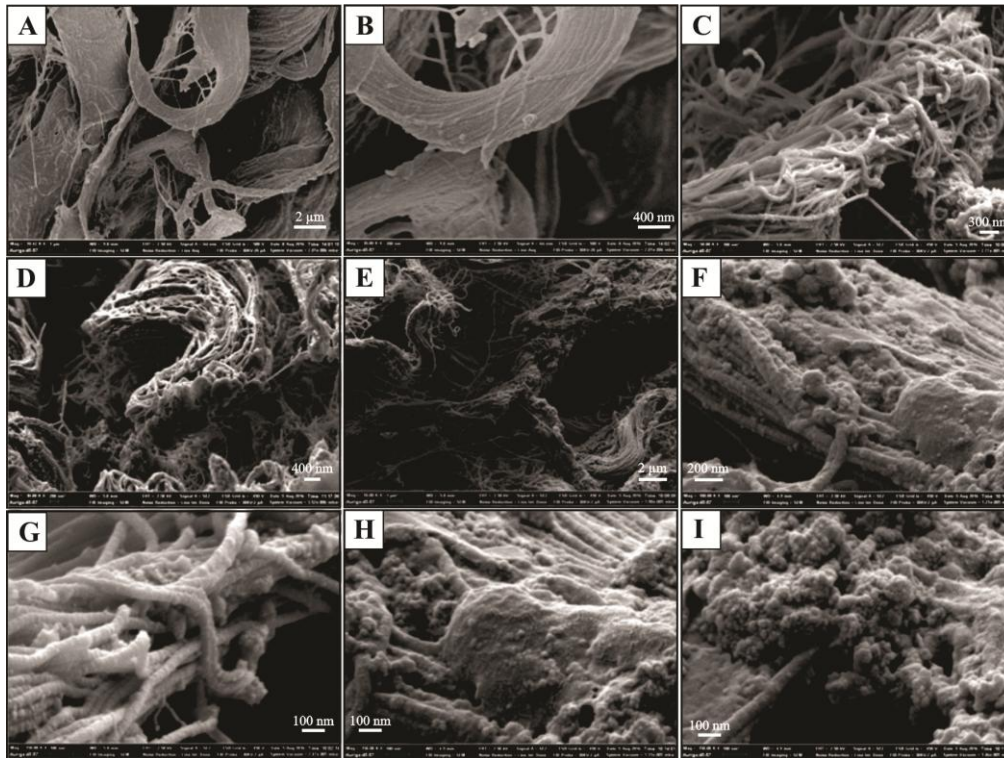


Figura 37: Amostra de substrato de mucosa esofágica tratada com pós de nanocápsulas de PCL com adjuvante lactose. A-E: visão geral da superfície do tecido mucoso; F-I: detalhes da superfície do substrato.

4.10.5 Mucosa esofágica tratada com suspensão de nanocápsulas de Eudragit® S 100

A Figura 38 apresenta imagens de mucosa esofágica suína tratada com suspensão de nanocápsulas de Eudragit® S 100. As Figuras 38- A, B e C apresentam visão geral do substrato da mucosa. As imagens 38-D a F e J a L apresentam nanocápsulas isoladas e as imagens 38-G a I apresentam aglomerações de nanocápsulas de Eudragit® S 100.

Na superfície do substrato (Figura 38), é possível observar nanocápsulas de EUD em aglomerações, como melhor visualizado nas Figuras 38 B, G-I; e isoladas, como se pode

analisar melhor nas Figuras 38-D, E, F e K. As nanocápsulas isoladas apresentam cerca de 120nm de diâmetro.

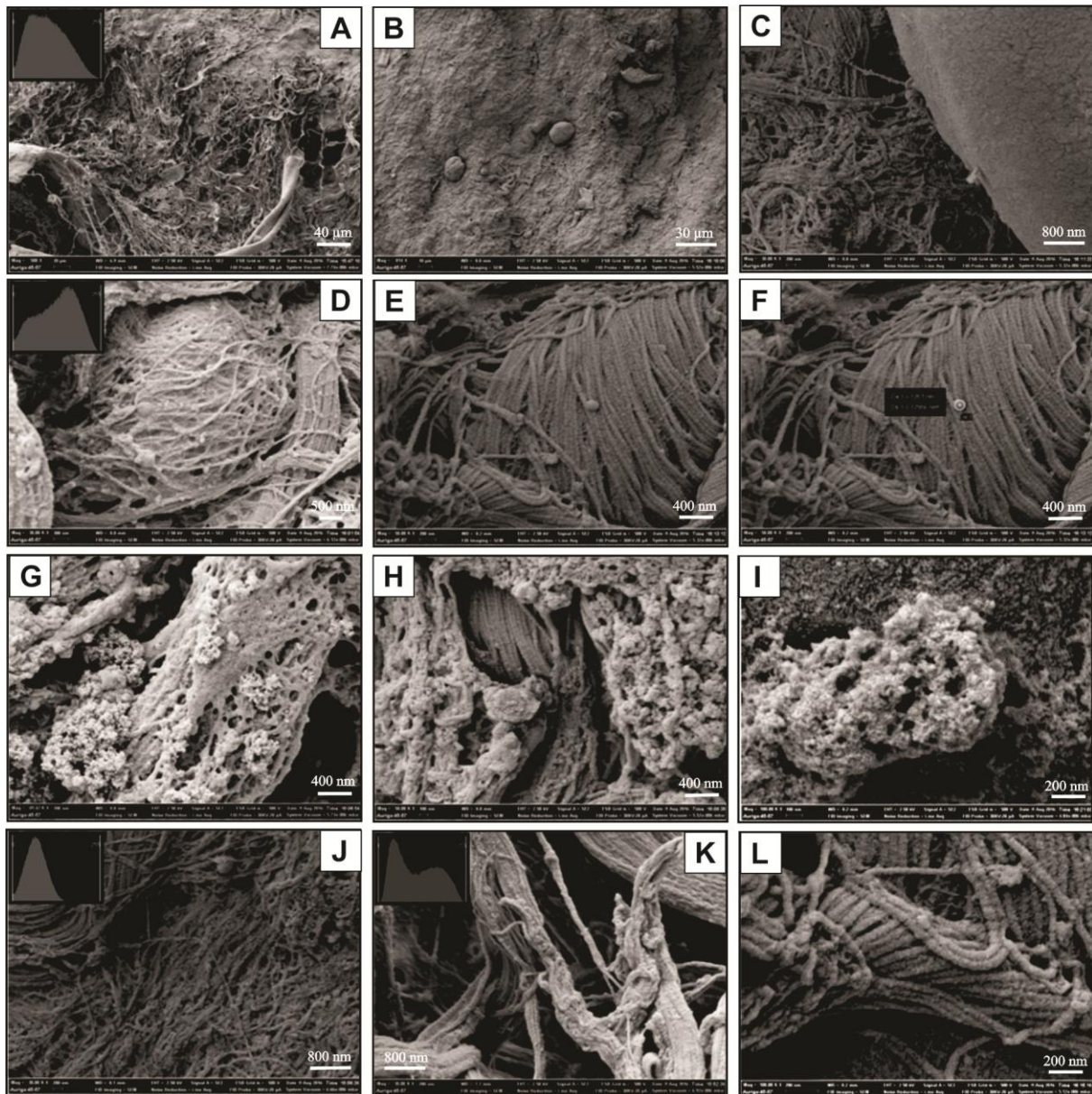


Figura 38: Substrato mucoso esofágico suíno tratado com suspensão de nanocápsulas de Eudragit® S 100. A-C: visão geral do substrato; D - F e J-L: presença de nanocápsulas isoladas em diferentes regiões do tecido mucoso. Em F, a medida de diâmetro da nanocápsula é 126,5 nm e área de 12569 nm². G-I: presença de aglomerações de nanocápsulas de EUD.

De acordo com a literatura, polimetacrilatos como o Eudragit® S 100 tem excelentes características formadoras de filmes e são muito utilizados para a fabricação de variadas formulações para administração oral de fármacos, inclusive, através de nanocápsulas. Resinas

acrílicas são farmacologicamente inativas e apresentam compatibilidade positiva com membranas da pele e mucosas. Polímeros metacrilatos de tipo entéricos, como o Eudragit® S 100, apresentam uma melhor barreira contra entrega de fármacos no estômago e capazes de controlar a entrega no intestino.¹⁰⁰

4.10.6 Mucosa esofágica tratada com nanocápsulas secas de Eudragit® S 100 e adjuvante sílica

A Figura 39 apresenta mucosa esofágica suína tratada com nanocápsulas secas de Eudragit® S 100 e adjuvante sílica, sendo as imagens 39-A e B representando uma visão geral do substrato. As Figuras 39-C, F-L revelam a presença de nanocápsulas. As Figuras D, E, M-R apresentam a presença de microaglomerados de nanocápsulas de Eudragit® S 100 e adjuvante sílica.

Na superfície da mucosa das diversas áreas registradas (Figura 39), facilmente se reconhece microaglomerados de nanocápsulas de EUD secas com sílica, assim como a morfologia analisada nos pós isolados. Nas Figuras 39-K e L, ficam bastante evidentes as nanocápsulas circulares em torno de 150nm, que ficaram retidas na estrutura abaulada da região da submucosa. Elas se encontram aderidas ao substrato, tanto em grupos, como isoladas. Os microaglomerados, melhor evidenciados nas imagens 39-M a O apresentam tamanho médio de 3 μ m.

Estudos anteriores,^{25, 33} relataram o uso de nanocápsulas de Eudragit® S 100 e adjuvante sílica com diclofenaco como modelo de fármaco para fins de administração oral. Afirmam que a escolha do polímero nas formulações das nanocápsulas foi devido à característica de resistência gástrica desse polímero, o que permite que esse seja empregado quando há uma necessidade de proteção gástrica dos componentes ativos da formulação. Relatam também a morfologia esférica das micropartículas dos pós secos de nanocápsulas, com nanoestruturas em torno de 170-200nm,²⁵ o que é semelhante com os dados de diâmetro encontrados nesse trabalho (em torno de 150nm).

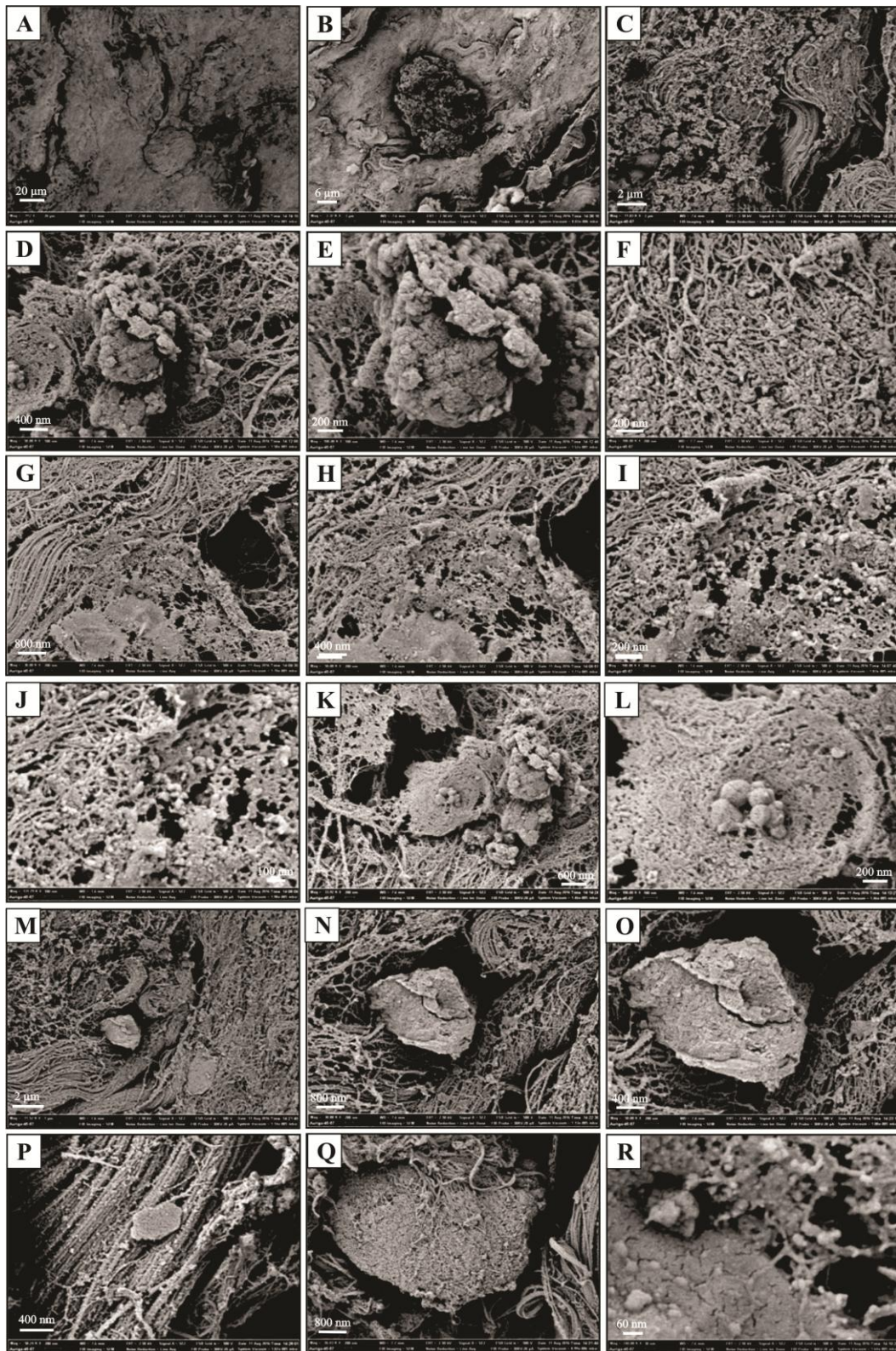


Figura 39: Substrato da mucosa esofágica suína tratada com nanocápsulas secas de Eudragit® S 100 e adjuvante sílica. A e B:visão geral do substrato; 39-C e F-L: revelam a presença de nanocápsulas; D, E, M-R: microaglomerados de nanocápsulas.

4.10.7 Mucosa esofágica tratada com nanocápsulas secas de Eudragit® S 100 e adjuvante lactose

A Figura 40 apresenta mucosa esofágica tratada com nanocápsulas secas de EUD e adjuvante lactose. As Figuras de A-L apresentam diferentes regiões do substrato com ampla distribuição de nanocápsulas em todas as áreas analisadas do substrato.

De acordo com a Figura 40, observa-se o substrato coberto por nanocápsulas bastante dispersas por todas as regiões. Em quaisquer das imagens dessa figura é possível identificar nanocápsulas isoladas de tamanho entre 50-100nm. Porém, não foi evidenciada a presença de microparticulados dessas nanocápsulas. Conforme o que foi analisado nos pós secos desse mesmo grupo amostral de nanocápsulas, o material apresentava microaglomerados, nos quais a lactose formava um envoltório para o agrupamento de nanocápsulas, tanto nas formadas pelo polímero PCL, quanto na lactose. Porém, especula-se que quando ambos os pós (de PCL ou EUD com adjuvante lactose) foram aplicados nas mucosas, ocorreu a desestruturação dos microaglomerados pela perda do envoltório formado por lactose. Esses dados podem ser explicados pela estrutura físico-química da lactose que, por se tratar de um carboidrato primário e hidrossolúvel,³² interage de forma muito ativa com a mucosa do trato gastrointestinal.

Na literatura científica, não foram encontrados trabalhos que relatam exatamente esse tipo amostral de nanocápsulas tratadas na mucosa esofágica. A busca pelos artigos científicos foi realizada, através do acesso a bancos de dados (ISI Web of Science, Pub Med e Periódicos Capes).

Estudos anteriores³² avaliaram a secagem de nanocápsulas sem fármaco com diferentes adjuvantes de secagem hidrossolúveis, como lactose, maltose, maltodextrina, entre outros, e concluíram que as nanocápsulas secas por *spray-drying* utilizando a lactose foram as que apresentaram melhores resultados, considerando a morfologia das partículas obtidas e a favorável reconstituição em água. Afirmam também que a lactose, além de permitir a secagem eficiente das nanocápsulas, também possibilita a fácil redispersão dos pós, mediante a sua solubilização, com retomada das nanocápsulas em suspensão.³² Provavelmente por esse motivo de fácil redispersão que a lactose apresenta, quando em contato com um substrato bastante úmido como a mucosa esofágica, há a solubilização do adjuvante e a conseguinte perda do envoltório dos microaglomerados.

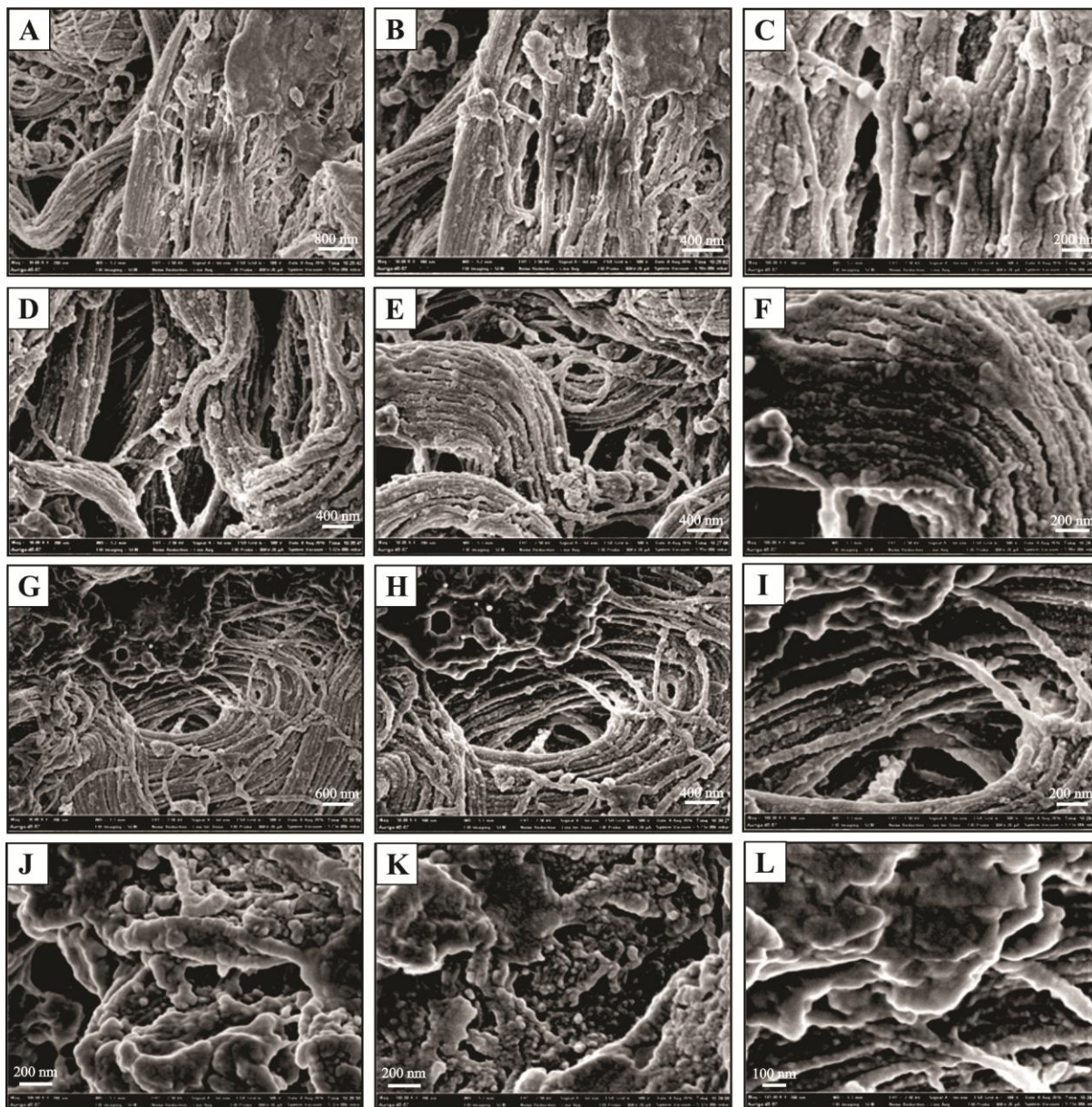


Figura 40: Substrato de mucosa esofágica suína tratada com nanocápsulas secas de Eudragit[®] S 100 e adjuvante lactose. A-L apresentam diferentes regiões do substrato com ampla distribuição de nanocápsulas em todas as áreas analisadas.

4.11 COMPARAÇÕES

4.11.1 Substrato: cabelo

A Figura 41 traz uma comparação entre as amostras com fios de cabelo e os diferentes tratamentos aplicados: grupo controle (23-A), fio de cabelo humano tratado com suspensão de nanocápsulas de PCL (23-B) e fio de cabelo humano tratado com suspensão de nanocápsulas de EUD (23-C).

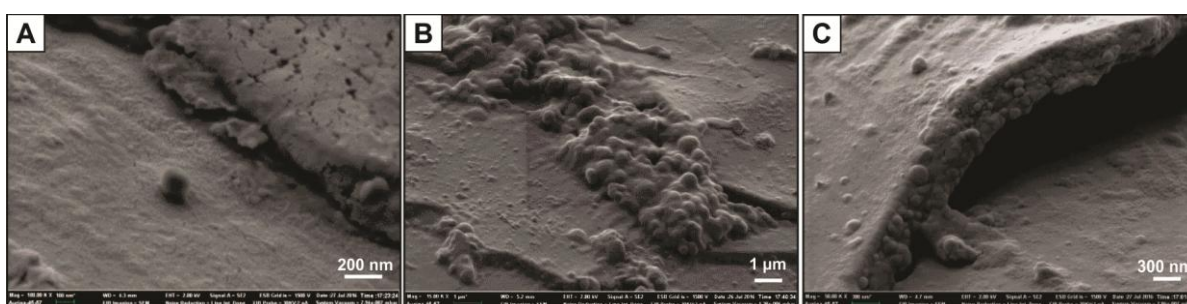


Figura 41: Comparação dos substratos de fio de cabelo humano: A-controle; B- fio de cabelo humano tratado com suspensão de nanocápsulas de PCL e C- fio de cabelo humano tratado com suspensão de nanocápsulas de EUD.

Observando a Figura 41, se constata grande diferença entre o grupo controle e os grupos amostrais que receberam tratamentos, sendo nas imagens 23-B e C possível reconhecer a presença de nanocápsulas poliméricas. Comparando os tratamentos, as suspensões de nanocápsulas de EUD apresentaram-se mais bem distribuídas ao longo da superfície do substrato, estando preferencialmente aderidas aos contornos das escamas. Já no tratamento com suspensão de nanocápsulas de PCL, as nanocápsulas se mantiveram mais aglomeradas nas regiões de limite das escamas capilares. As nanocápsulas de EUD apresentaram tamanho em torno de 125nm, enquanto às de PCL mediram 300nm. Assim, infere-se que o tamanho seja uma possível causa^{73,74} para as nanocápsulas de PCL aglomerarem-se nos extremos das placas queratinosas capilares, sendo que as nanocápsulas de EUD alcançaram regiões mais internas das escamas em relação às de PCL, provavelmente por serem de menor tamanho.

4.11.2 Substrato: unha

A Figura 42 apresenta a comparação entre o substrato de unha tratado com suspensão de nanocápsulas de PCL (42-B), suspensão de EUD (42-C) e grupo controle (43-A).

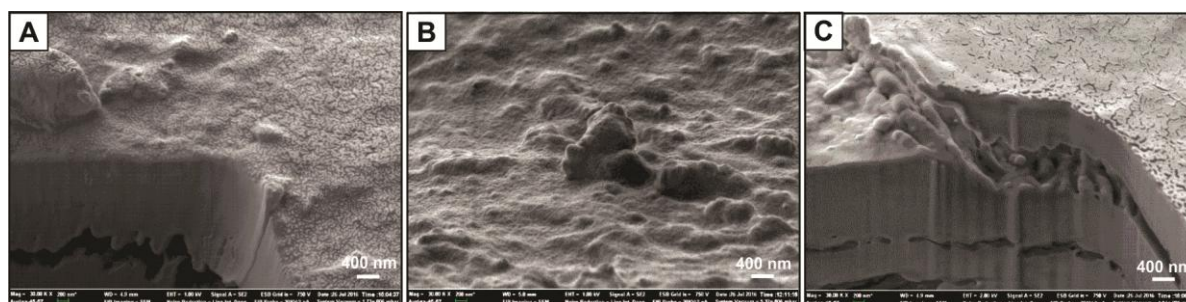


Figura 42: Comparação dos substratos de unhas humanas: A-controle; B- unha tratada com suspensão de nanocápsulas de PCL e C- unha tratada com suspensão de nanocápsulas de EUD.

De acordo com o resultado das análises demonstradas na Figura 42 (no substrato unha), verificou-se a presença de nanocápsulas dispersas ao longo do substrato, estando mais homogeneamente distribuídas ao longo das lâminas nos tratamentos com suspensão de nanocápsulas de PCL e estando presentes na forma de aglomerações no espaço entre placas de queratina no tratamento com suspensão de nanocápsulas de EUD, assim como evidenciado no substrato de fios de cabelo. As nanocápsulas de PCL apresentaram-se um pouco mais aderidas ao substrato em relação às de EUD. As nanocápsulas de PCL apresentaram tamanho maior em relação às de EUD, exibindo diâmetros em torno de 400nm e 150nm, respectivamente. As nanocápsulas de EUD se apresentaram alcançando as regiões internas das placas de queratina das unhas (Figura 42-C).

4.11.3 Substrato: pele

A Figura 43 apresenta a comparação entre as imagens de substrato de pele de orelha suína e os diferentes tratamentos aplicados nessa pesquisa. A Figura 43-A apresenta a amostra controle de pele de orelha suína; 43-B mostra o substrato com suspensão de nanocápsulas de PCL, 43-C exibe as imagens do substrato com nanocápsulas de PCL com

adjuvante sílica e 43-D apresenta o substrato com nanocápsulas de PCL com lactose. As imagens 43-E, F e G apresentam os tratamentos de pele de orelha suína com nanocápsulas de EUD, respectivamente, em suspensão, com sílica e com lactose.

Diferentemente do que foi analisado em mucosa, em pele é facilmente distinguível as nanocápsulas e microaglomerados ao longo da superfície do substrato, como pode-se observar na Figura 43. As morfologias das mesmas mantiveram-se equiparadas ao que foi analisado nas suas respectivas formulações em pó. A facilidade dessa visualização pode ser explicada pela impermeabilidade característica da epiderme,⁸² o que favoreceu para as nanoestruturas permanecerem nas superfícies e assim, serem identificadas.

Ambas as formulações de suspensões de nanocápsulas nesse tratamento apresentaram-se bastante distribuídas no substrato, sendo as suspensões de nanocápsulas de PCL de morfologia mais disformes e as de EUD, de morfologia prismática. Os pós secos de nanocápsulas de PCL ou EUD com adjuvante sílica nesse tratamento apresentaram morfologia esférica dos microaglomerados e tamanhos de diâmetro em média de 4 e 5 μm , respectivamente, sendo interessante a semelhança exposta nas imagens 43-C e F. Já os pós secos formados de nanocápsulas de PCL ou EUD com lactose apresentaram morfologia disforme e tamanhos de diâmetro em torno de 3 e 10 μm , respectivamente. Assim como evidenciado em substrato de mucosa, pressupõe-se que os microaglomerados que contém lactose em sua composição perdem o envoltório de lactose quando interagem com o substrato biológico. O menor tamanho de nanocápsulas evidenciado nesse substrato foi de 40nm nos tratamentos com pós secos de nanocápsulas de PCL e adjuvante sílica e o maior foi de 400nm nas tratamentos com suspensões de nanocápsulas de EUD.

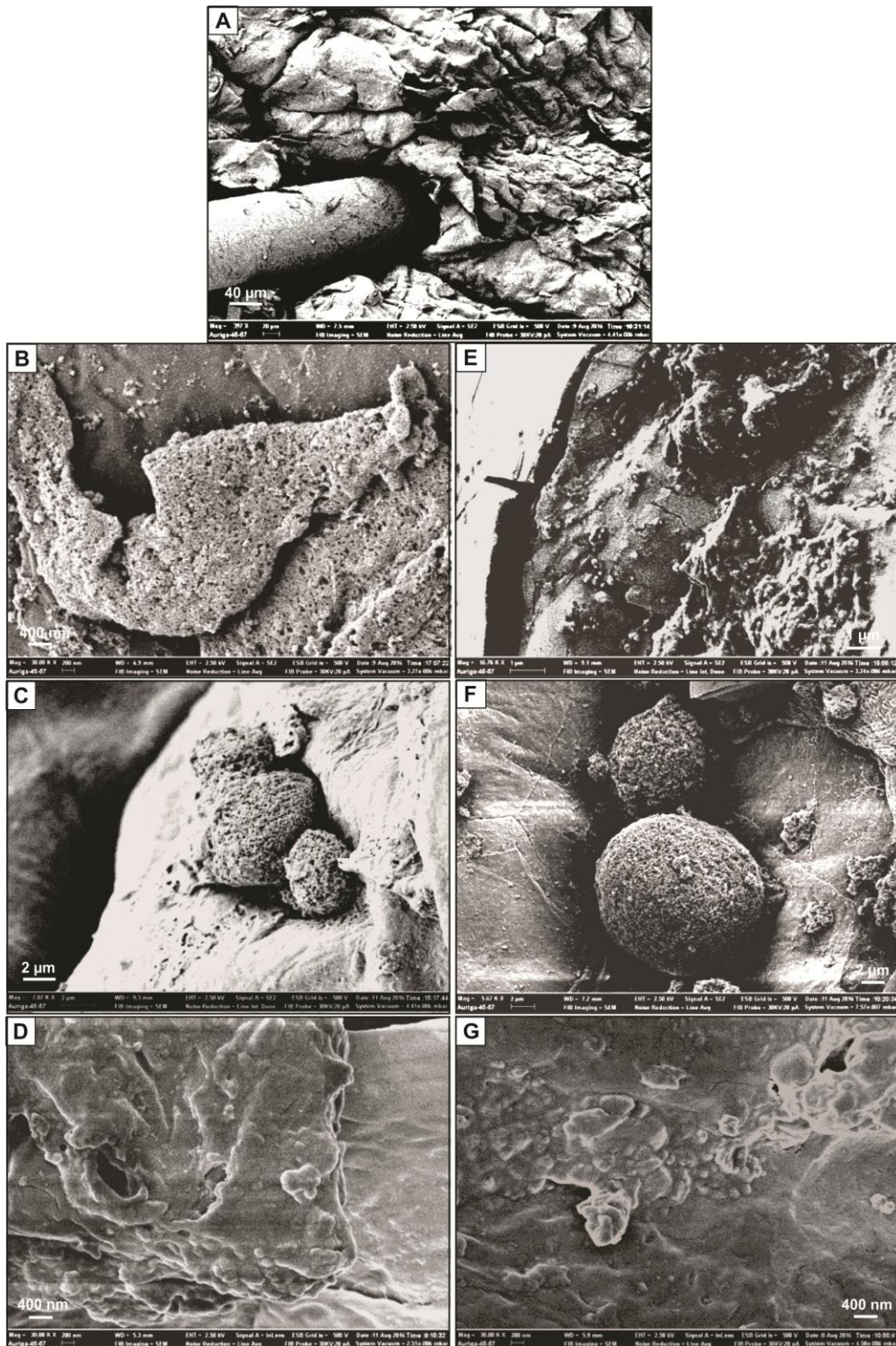


Figura 43: Comparação entre as imagens de substrato de pele de orelha suína dos diferentes tratamentos aplicados nessa pesquisa. A- amostra controle de pele; B- substrato com suspensão de PCL; C- substrato com nanocápsulas de PCL com sílica; D- substrato com nanocápsulas de PCL com lactose; E- substrato com suspensão de EUD; F - substrato com nanocápsulas de EUD com sílica; G- substrato com nanocápsulas de EUD com lactose.

4.11.4 Substrato: mucosa esofágica

A Figura 44 apresenta a comparação entre as imagens de substrato de mucosa esofágica e os diferentes tratamentos aplicados nessa pesquisa. A imagem 44-A apresenta a amostra controle de mucosa esofágica; 44-B mostra o substrato com suspensão de nanocápsulas de PCL, 44-C exibe as imagens do substrato com nanocápsulas de PCL com adjuvante sílica e 44-D apresenta o substrato com nanocápsulas de PCL com lactose. As imagens 44-E, F e G apresentam os tratamentos de mucosa esofágica com nanocápsulas de EUD, respectivamente, em suspensão, com sílica e com lactose.

Observando-se a Figura 44, todas as nanocápsulas aderidas à mucosa com esses tratamentos citados apresentam entre 50 e 200nm, sendo os microaglomerados entre 1 e 3 μ m, porém, nem todos os tratamentos com pós de nanocápsulas evidenciaram formação de microaglomerados. Os microaglomerados de nanocápsulas de PCL com adjuvante sílica não apresentaram limites definidos e os microaglomerados de nanocápsulas EUD com sílica foram os que apresentaram nanocápsulas com morfologia mais definida (esférica) e foram os de maior tamanho analisado (3 μ m). Tanto os microaglomerados de nanocápsulas de PCL com lactose, quanto de EUD com lactose, não exibiram formação de microaglomerados, o que se estima que haja um envoltório de lactose que protege as nanocápsulas e esses sejam perdidos na interação com o substrato mucoso.

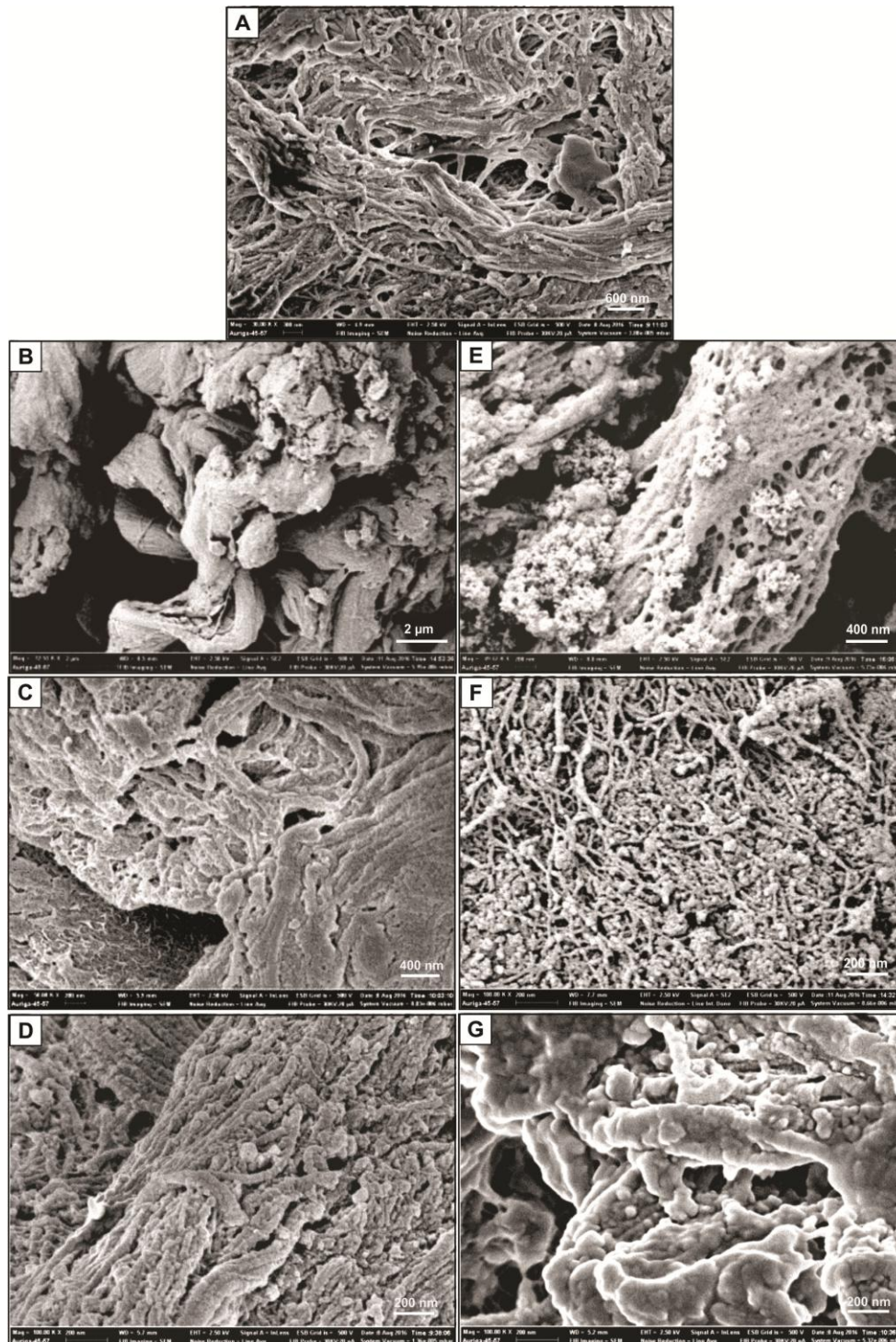


Figura 44: Comparação entre imagens de substrato de mucosa esofágica dos diferentes tratamentos aplicados nessa pesquisa. A- amostra controle de mucosa esofágica; B- substrato com suspensão de nanocápsulas de PCL; C- substrato com nanocápsulas de PCL com adjuvante sílica; D- substrato com nanocápsulas de PCL com lactose; E- substrato com suspensão de nanocápsulas de EUD; F- substrato com nanocápsulas de EUD com sílica; G- substrato com nanocápsulas de EUD com lactose.

Müller R., Thaniele

5 CONCLUSÕES

Caracterização estrutural de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) e de Eudragit® S 100 através de microscopia eletrônica de varredura por feixe de emissão de campo (FEG) e por feixe de íons focalizados (FIB)

A principal contribuição do presente trabalho reside no conjunto das caracterizações morfológicas em resolução melhorada através das técnicas de análise por microscopia eletrônica de varredura por FEG-MEV e FIB-MEV das nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) e Eudragit® S 100 secas na presença de adjuvantes sílica ou lactose. De uma forma global, os resultados alcançados assemelharam-se aos de estudos anteriores, no entanto, trazem alguns novos dados, como por exemplo, ter evidenciado a grande diferença morfológica entre microaglomerados de nanocápsulas de PCL em comparação às de EUD.

Adicionalmente, as tomografias nas nanocápsulas também permitiram uma maior avaliação das estruturas, trazendo alguns novos esclarecimentos e questionamentos sobre as mesmas. A avaliação em substratos biológicos permitiu compreender melhor a interação das nanoestruturas e traçar suposições de alguns dados, como a desagregação dos microaglomerados em contato com o substrato.

Os microaglomerados de sílica pura apresentaram morfologia tipicamente arredondada, onde na superfície foi possível observar que a formação ocorre por deposição e justaposição de nanoestruturas circulares de sílica, resultando em uma massa de material homogêneo. Os microaglomerados apresentam em torno de 7 μ m.

Por sua vez, os microaglomerados de lactose apresentam medidas em torno de 200 μ m de diâmetro, sendo que a sua estruturação se dá pela junção de micropartículas de morfologia piramidal/cristalina.

Os microaglomerados de nanocápsulas de PCL com sílica apresentaram formato esférico, de diâmetro em torno de 15 μ m, pela justaposição de nanocápsulas, também esféricas, de diâmetro em torno de 1 μ m. Os microaglomerados de PCL desidratadas na presença do adjuvante lactose apresentaram-se disformes, com diâmetro em torno de 35 μ m, com formato próximo ao semicircular, formados pelo contato de nanocápsulas unidas entre si pelo material da superfície. As nanocápsulas apresentam em torno de 1 μ m. Concluiu-se que, enquanto os microaglomerados de nanocápsulas de PCL com adjuvante sílica apresentam um núcleo composto pelo adjuvante, com nanocápsulas de PCL aderidas à superfície, os microaglomerados de nanocápsulas de PCL com lactose apresentam o interior composto pelo aglomerado das nanocápsulas de PCL com um envoltório formado por adjuvante que recobre o aglomerado das nanoestruturas.

Os microaglomerados de nanocápsulas de EUD secas na presença do adjuvante sílica apresentam média de diâmetro de 22 μ m, verificando-se que a superfície e o interior dos microaglomerados apresentam as mesmas características, tornando-o homogêneo tanto no interior, quanto exterior. É visto que o microaglomerado é formado por uma matriz de sílica

muito porosa, onde no interior desses poros e na superfície ficam aderidas as nanocápsulas, em torno de 49nm de diâmetro. Os microaglomerados de nanocápsulas de EUD secas com adjuvante lactose exibem características morfológicas bastante disformes e diâmetro de cerca de 20 μ m. É possível analisar que, assim como os microaglomerados de nanocápsulas de PCL com lactose, os microaglomerados de EUD com adjuvante lactose formam uma aglomeração de nanocápsulas de EUD envoltas por uma matriz de lactose. As nanocápsulas apresentam cerca de 1 μ m. Das formulações de pós secos, a que apresentou morfologia mais constante foi a de nanocápsulas de PCL com adjuvante sílica.

A análise da aplicação das nanocápsulas em tratamentos em substratos unha, cabelo, pele e mucosa foi muito válida para ilustrar os processos de interação das nanoestruturas e substratos biológicos.

Em unhas, observou-se que as suspensões de nanocápsulas de EUD alcançaram camadas de queratina de regiões mais internas quando comparadas às suspensões de nanocápsulas de PCL. Isso pode ser explicado pelo tamanho menor das nanocápsulas de EUD (± 150 nm) em suspensão.

Comparando os tratamentos em cabelo, observou-se que as suspensões de nanocápsulas de EUD apresentaram-se mais bem distribuídas ao longo da superfície do substrato, estando preferencialmente aderidas aos contornos das escamas. Já no tratamento com suspensão de nanocápsulas de PCL, as nanocápsulas se mantiveram mais aglomeradas nas regiões de limite das escamas capilares.

Nos tratamentos em pele, observou-se a presença de nanocápsulas dispersas ao longo do substrato, estando mais homoganeamente distribuídas ao longo das lâminas nos tratamentos com suspensão de nanocápsulas de PCL e estando presentes na forma de aglomerações no espaço entre placas de queratina no tratamento com suspensão de nanocápsulas de EUD, assim como evidenciado no substrato de fios de cabelo. As nanocápsulas de PCL apresentaram-se um pouco mais aderidas ao substrato em relação às de EUD. Foram encontradas muitas nanocápsulas, de diferentes tratamentos, próximas a inserção de pelos, sugerindo que essa seja uma importante porta de penetração cutânea para as nanocápsulas.

Observando-se os tratamentos em mucosas, foi muito mais difícil identificar a presença das nanocápsulas, devido à natureza bastante rugosa e emaranhada do substrato. Alguns tratamentos evidenciaram microaglomerações no tecido e outros tratamentos apresentaram apenas nanocápsulas distribuídas na superfície. Os microaglomerados de nanocápsulas de PCL com adjuvante sílica não apresentaram limites definidos e os

microaglomerados de nanocápsulas EUD com sílica foram os que apresentaram nanocápsulas com morfologia mais definida (esférica). Tanto os microaglomerados de nanocápsulas de PCL com lactose, quanto de EUD com lactose, não exibiram formação de microaglomerados, o que se estima que haja um envoltório de lactose que protege as nanocápsulas e esses sejam perdidos na interação com o substrato mucoso.

As perspectivas futuras são de caracterizar outras formulações de nanocápsulas de frequente uso pelo nosso grupo de pesquisa utilizando as técnicas de microscopia eletrônica de varredura por FEG-MEV e FIB-MEV, como realizado neste trabalho, além de aprimorar a obtenção de resultados na análise entre substrato e o tratamento farmacológico aplicado.

Müller R., Thaniele

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Caracterização estrutural de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) e de Eudragit® S 100 através de microscopia eletrônica de varredura por feixe de emissão de campo (FEG) e por feixe de íons focalizados (FIB)



1 Mora-Huertas, C.E H.; Fessi, H., Elaissari, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. **2009**, 385 (2010), 113.

2 Schaffazick, S.R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova*. **2003**, 26(5), 726.

3 Borges, J.R. Avaliação da atividade de nanocápsulas com diferentes características superficiais sobre a resposta imune de células J774.A1 e sobre a infecção por *Leishmania infantum*. **2012**. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2012.

4 Singh, R.; Lillard Jr., J.W. Nanoparticle-based targeted drug delivery (Review) *Experimental and Molecular Pathology*. **2009**, 86 (3), 215.

5 Raffin, R.P. et al. Nanocápsulas Poliméricas Secas Contendo Indometacina: Estudo de Formulação e de Tolerância Gastrointestinal em Ratos. *Acta Farm. Bonaerense*. **2003**, 22(2), 163.

6 Pohlmann, A. R. et al. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002, 16(4-5), 305.

7 Pohlmann A.R. et al. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. **2013**,10(5), 623.

8 Yegin, B. A., & Lamprecht, A. Lipid nanocapsule size analysis by hydrodynamic chromatography and photon correlation spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics*. **2006**, 320(1), 165.

9 Villanova, J.C.O.; Oréfice, R.; Cunha, A.S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. **2010**, 20(1), 51.

- 10** Beck, R.C.R. et al. Surface morphology of spray-dried nanoparticle-coated microparticles designed as an oral drug delivery system. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. **2008**, 25(2), 389.
- 11** Jäger, E. Controle da liberação do Ester etílico de indometacina a partir de nanocápsulas poliméricas através da variação da concentração do monoestearato de sorbitano. **2008**, 133f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2008.
- 12** Souto, E.B.; Severino, P.; Santana, M.H.A Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de Polímeros Pré-formados – Parte II. *Polímeros*. **2012**. 22 (1), 101.
- 13** Cruz, L. et al. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*. **2006**, 313(1), 198.
- 14** Jäger, E. et al. Sustained release from lipid-core nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. *J Biomed Nanotechnol*. **2009**, 5(1), 130.
- 15** Venturini, C.G. et al. Formulation of lipid core nanocapsules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **2011**, 375, (1–3), 200.
- 16** Beck, R.C.R.. et al. Spray-dries polymeric nanoparticles for pharmaceuticals: a review of patents. *Precent patents on drug delivey e formulation*. **2012**, 6(3), 195.
- 17** Mohanraj VJ, ChenY. Nanoparticles-A review. *Trop. J. Pharm. Res*. **2006**, 5(1), 561.
- 18** Guterres, S.S. et al. Processo de secagem de suspensões coloidais de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas por aspersão. **1999**. BR099060817.
- 19** Guterres, S. S. et al. Gastro-intestinal tolerance following oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. *STP Pharma Sciences* **2001**, 11(3), 229.

- 20** Shen, Z. et al. A process for making particles for delivery of drug nanoparticles. **2010**. WO2010036211.
- 21** Klang, V. et al. Electron microscopy of pharmaceutical systems. *Micron* **2013**, 44, 45.
- 22** Domingues, G. S. e Guterres, S.S. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. *Quim. Nova*. **2008**, 31(8), 1966.
- 23** Müller, C. R. et al. Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2000**, 26(3), 343.
- 24** Guterres, S.S. et al. Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. *Drug Delivery*. **2000**, 7(4)195.
- 25** Beck, R.C.R et al. Nanoparticle-coated microparticles: preparation and characterization. *J.Microencapsulation*. **2004**. Vol. 21(5), 499.
- 26** Oliveira, O.W. , Petrovick, P.R. Secagem por aspersão (spray-drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2010**, 20(4), 641.
- 27** Souza, K.C.B. et al. The adjuvants Aerosil 200 and Gelita-Sol-P influence on the technological characteristics of spray-dried powders from passiflora edulis var. flavicarpa. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2000**, 26(3),331.
- 28** Cornec, M. Aérosil: um adjuvant efficace pour lês formes sèches, liquids et pâteuses. *STP Pharma Sci*. **1990**, 6, 110.
- 29** Vasconcelos, E.A.F. et al. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. **2005**, 15(3), 243.

- 30** Carstensen, J.T. *Pharmaceutics of solid and solid dosage forms*. John Wiley: Nova Iorque, 1976.
- 31** Moura, S.P. Bicamadas catiônicas em sílica: adsorção e estabilidade coloidal a baixa força iônica. **2003**. 55f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.
- 32** Hoffmeister, C.R.D. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas contendo melatonina, obtidas através da técnica de secagem por aspersão e com o emprego de adjuvantes hidrossolúveis para aplicação tópica. **2009**. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.
- 33** Kibbe, A. H. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 3 ed. American Pharmaceutical Association: London, **2000**.
- 34** Sebhatu, T.; Ahlneck, C.; Alderborn, G. The effect of moisture content on the compression and bond-formation properties of amorphous lactose particles. *International Journal of Pharmaceutics*. **1996**, 146, 101.
- 35** Toller, A. B. e Schimidt, C. A.. Excipientes à base de celulose e lactose para compressão direta. *Disciplinarum Scientia*. **2005**, 6(1), 61.
- 36** Hoffmeister, C.R.D. et al. Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery. *Nanoscale Research Letters*. **2012**, 251(7).
- 37** Santos, P.P. et al. Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules. *Trends in Food Science & Technology*. **2016**, 53, 23.
- 38** Domingues, G.S. Caracterização físico-química dos perfis de liberação in vitro de micropartículas revestidas com nanocápsulas poliméricas. **2006**. 169 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

39 Brito, G.F., Araújo, E.M., Mélo. T.J.A Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*. **2011**, 6 (2), 127.

40 Ghanbarzadeh, B; Almasi, H. In Biodegradation - Life of Science. Rolando Chamy, Francisca Rosenkranz. (Edt.); *InTech: Croácia*. **2013**, p. 141.

41 Delgado, J.M.F Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa. **2013**. 117f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Biomédica). Escola Superior de Tecnologia e Gestão Instituto Politécnico de Bragança. Bragança, 2013.

42 Evonik Industries. Enteric Formulations. Disponível em http://eudragit.evonik.com/product/eudragit/en/products-services/eudragit_products/enteric-formulations/s-100/Pages/default.aspx (acesso em 12/11/2014).

43 Beck, R.C.R et al. Nanostructure-Coated Diclofenac-Loaded Microparticles: Preparation, Morphological Characterization, In Vitro Release and In Vivo Gastrointestinal Tolerance. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**,16(6A) 1233.

44 Frank, L.A. Avaliação da performance e caracterização in vitro de diferentes hidrogéis de quitosana contendo nanocápsulas poliméricas para aplicação vaginal. **2014**. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2014.

45 Canuto, K.M. et al. Preparação de Nanocápsulas Poliméricas para Visualização em Microscopia Eletrônica de Varredura. Comunicado Técnico 212. Fortaleza, CE. **2015**. ISSN 1679-6535.

46 Geys, J. *Labinfo: Newsletter for the approved food safety laboratories*. Ed 8ª. Brussel: **2012**, p. 4.

47 Dedavid, B.A.; Gomes, C.I; Machado, G. Microscopia eletrônica de varredura : aplicações e preparação de amostras : materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 6 p.

- 48** Maliska, A.M.; Microscopia Eletrônica de Varredura, disponível em www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_Apostila.pdf (acesso em 11/02/2016).
- 49** Australian Microscopy & Microanalysis Research Facility, disponível em <http://www.ammrf.org.au/myscope/sem/practice/principles/gun.php> (acesso em 23/11/2014).
- 50** Neckel, G.L.; Lemos-Senna, E. Preparação e Caracterização de Nanocápsulas Contendo camptotecina a partir do Ácido poli (D,L-lático) e de Copolímeros Diblocos do Ácido Poli (D,L-lático) e Polietilenoglicol. *Acta Farm. Bonaerense* **2005**, 24 (4), 504
- 51** Santos, T. M. M. Preparação e caracterização de partículas de Eudragit® L100 contendo nifedipino e comparação de parâmetros cinéticos com cápsulas comerciais de nifedipino. **2013**. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais). Universidade Federal do Vale do São Francisco. Juazeiro, 2013.
- 52** Diou, O. Synthèse de nanocapsules polymères pour la détection de tumeurs solides par échographie et IRM du Fluor : vers un outil théranostique. **2012**. 188f. Tese (doutorado em Ciências Agrícolas). Université Paris Sud. Paris XI, 2012.
- 53** Mannheimer, W. Microscopia dos Materiais: Uma Introdução. Editora E-papers, Rio de Janeiro, **2002**.
- 54** Da Róz, A.L. Coleção nanociência e nanotecnologia: princípios e aplicações: Técnicas de nanocaracterização. Volume 3. Elsevier Brasil: Rio de Janeiro, **2014**
- 55** Volkert, C.A.; Minor, A.M. Focused ion beam microscopy and micromachining. *Mrs Bulletin*. **2007**, 32 (2), 389.
- 56** Brawana,; Miller, J.L., Cahoon, A.B. 3D plant cell architecture of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) using focused ion beam-scanning electron microscopy. *Applications in plant sciences*, **2014**, 2 (6).

- 57** Sotelo, D.G. Produção de microfios de íons de MEV com o uso de microcapilares de vidro. **2014**. 106f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2014.
- 58** Dudkiewicz, A. et al. Characterization of nanomaterials in food by electron microscopy. *Trends in Analytical Chemistry*. **2011**, 30(1), 28.
- 59** Marusáková, D. et al. Microstructural analysis of 800H steel exposed at test operation in hthl by using FIB-SEM and HRTEM techniques. (Accepted Manuscript). *Applied Surface Science*, **2017**.
- 60** Haas, S. et al. Degradação e estabilização do diclofenaco em nanocápsulas poliméricas. *Química Nova*. **2004**, 27(4), 555.
- 61** Balest, A. P. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). Trabalho de conclusão de Curso (Curso de Farmácia). Faculdade de Ceilândia. Ceilândia, **2013**.
- 62** Malvern Instruments, disponível em <http://www.malvern.com/br/products/technology/dynamic-light-scattering/> (acesso em 08/01/2016)
- 63** Nemen, D. Lemos-Senna, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. *Quim. Nova*. **2011**, 34(3), 408.
- 64** Ovalle, W.K.; Nahirney, P.C. Netter Basic Science Series: Netter's Essential Histology. 2 Ed. Elsevier, Canadá. **2008**.
- 65** Martini, E. et al. Adsorção de oligonucleotídeos em nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea. *Quím.Nova*. **2007**, 30 (4), 930.
- 66** Beck, R.C.R. Desenvolvimento tecnológico de micropartículas nanorrevestidas: caracterização físico-química e biológica. **2005**. 332f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005.

- 67** Costa e Silva, T.A. Caracterização bioquímica e secagem em “spray dryer” de lípases produzidas pelo fungo endofítico *Cercospora kikuchii*. **2010**. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2010.
- 68** Callister Jr, W. D; Rethwisch, D. G. Ciência e Engenharia de Materiais: uma introdução. *Ltc*: Rio de Janeiro, **2013**.
- 69** Freitas Jr., N. F. Estudo das propriedades termomecânicas e morfológicas de blendas biodegradáveis de poli (ϵ -caprolactona) (PCL) com amido de milho natural e modificado. **2004**. 89f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). UNICAMP, Campinas, SP, 2004.
- 70** Contri, R.V et al. The use of nanoencapsulation to decrease human skin irritation caused by capsaicinoids. *International Journal of Nanomedicine*. **2014**, 12(9), 951.
- 71** Siqueira, N.M. et al. Innovative Sunscreen Formulation Based on Benzophenone-3-Loaded Chitosan-Coated Polymeric Nanocapsules. *Skin Pharmacology and Physiology*. **2011**, 24(3),166.
- 72** Yin, W. and Yates, M. Z. Encapsulation and sustained release from biodegradable microcapsules made by emulsification/freeze drying and spray/freeze drying. *J Colloid Interface Sci* **2009**, 336(1),155.
- 73** Pohlmann, A.R et al. Polymeric finasteride nanoparticle, aqueous composition containing same composition dor the treatment od alopecia, method for preparing said composition, and use thereof. **2014**. WO2014032151A1
- 74** Pohlmann, A.R et al. Polymeric finasteride and minoxidil nanoparticles, method for preparing same, aqueous suspension containing same, pharmaceutical composition and use thereof. **2014**. WO2014032152A1
- 75** Harter, A.P.G. et al. Desenvolvimento de um método para a determinação de tioconazol associado a nanocápsulas poliméricas por cromatografia líquida. *Quim. Nova*. **2014**, 37(6), 996.

76 Flores, F. C. et al. Atividade antifúngica de nanocarreadores contendo óleo de melaleuca no crescimento de *C. albicans*: um estudo do perfil de inibição. *Ciência e Natura*. **2015**, 37,1.

77 Flores, F. C. et al. An innovative polysaccharide nanobased nail formulation for improvement of onychomycosis treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2017**, 100, 56.

78 Flores, F. C. et al. Antifungal Activity of Nanocapsule Suspensions Containing Tea Tree Oil on the Growth of *Trichophyton rubrum*. *Mycopathologia*, **2013**, 175,281.

79 De Paula, C.M.S.S. Alterações na ultra-estrutura do cabelo induzidas por cuidados di[arios e seus efeitos nas propriedades de cor. **2001**. 129f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2001.

80 Wagner, R.C.C. A estrutura da medula e sua influência nas propriedades mecânicas e de cor do cabelo. **2006**. 95f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2006.

81 Nogueira, A.C.S. Efeito da radiação ultravioleta na cor, na perda protéica e nas propriedades mecânicas do cabelo. **2003**. 70f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2003.

82 Guterres, S.S.; Alves, M.P.; Pohlmann, A.R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights*. **2007**, 2, 147.

83 Almeida, M. B et al. Aplicabilidade da nanotecnologia em dermocosméticos em farmácia comunitária Belo Horizonte-MG. Revista Eletrônica Parlatorium – ISSN 1983-7437 FAMINAS-BH – Faculdade de Minas. Nº 8 – Julho – Dezembro de **2014**.

84 Sanches, T.P. Estudo sobre determinação de elementos químicos em unhas humanas pelo método de análise por ativação com nêutrons. **2012**. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações). Instituto de pesquisas energéticas e nucleares. Autarquia associada à Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

- 85** Nhung D.T.T. et al. Sustained antibacterial effect of a hand rub gel incorporating chlorhexidine-loaded nanocapsules (Nanochlorex) *Int J Pharm.* **2007**,334(1-2),166.
- 86** Ranjita S., Loaye A.S., Khalil, M. Present status of nanoparticle research for treatment of tuberculosis. *J. Pharm. Pharm.Sci.* **2011**, 14(1),100.
- 87** Yang, D. et al. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an in vitro experimental model of onychomycosis. *Mycopathologia.* **1999**;148(2),79.
- 88** Murdan, S. Drug delivery to the nail following topical application. *Int J Pharm.* **2002**, 236(1-2),1.
- 89** Gunt, H., Kasting, G.B. Effect of hydration on the permeation of ketoconazole through human nail plate in vitro. *Eur J Pharm Sci.* **2007**, 32(4-5),254.
- 90** Marcato, P.D. et al. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Eletrônica de Farmácia.* **2009**, 6(2), 1.
- 91** Angeli, V.W. Desenvolvimento e caracterização de formulações fotoprotetoras contendo nanocápsulas. **2007**. 198f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.
- 92** Schmaltz, C. ; Santos, J.V.; Guterres, S.S. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética:a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. *Infarma*, **2005**. 16(13-14), 80.
- 93** Lboutounne, H. et al. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(ϵ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *J.Control. Rel.* **2002**, 82(2-3), 319.
- 94** Alves,C. Penetração de ativos na pele: revisão bibliográfica. *Revista Amazônia Science & Health.* **2015**, v3,(4),36.

- 95** Souza VM. Ativos dermatológicos. São Paulo: Tecnopress; **2003**. Vol. 1. 214p
- 96** Evonik Industries. Enteric Formulations. Disponível em <http://healthcare.evonik.com/product/health-care/en/products/pharmaceutical-excipients/EUDRAGIT/> (acesso em 06/04/2016)
- 97** Bucolo, C et al. Enhanced Ocular Anti-Inflammatory Activity of Ibuprofen Carried by an Eudragit RS100® Nanoparticle Suspension. *Ophthalmic Res.* **2002**, 34(5),319.
- 98** De Souza, A.M.T. Avaliação de toxicidade da Pseudoboemita para liberação controlada de fármacos. **2013**. 102f. Dissertação (Mestrado profissional). Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2013.
- 99** Watanabe, T. O. et al., Stability of amorphous indomethacin compounded with silica. *International Journal of Pharmaceutics*, **2001**. 226(1-2), 81.
- 100** Tu, J. et al. Polymers in oral modified release systems. (capítulo) In: Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery: Theory to Practice. H. Wen and K. Park (Edt). *John Wiley & Sons*. Hoboken, NJ, USA. **2010**. p 81
- 101** González Larrudé, D.R. Incorporação de fósforo em nanotubos de carbono de paredes múltiplas. **2011**. 111f. Tese (Doutorado em Física). Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2011.
- 102** Pachence, J. M, Bohrer, M. P, & Kohn, J. (2007). In *Principles of Tissue Engineering*. 3 Ed. Lanza, B., Langer, C., and Vacanti, P. (Edt). Burlington, MA: Academic Press, **2007**. p. 328.
- 103** Guterres, S.S; Beck, C.R.; Pohlmann, A.R. In Tópicos em Nanociência e Nanotecnologia: volume II. N.M.B. (Edt). UFRGS: Porto Alegre, **2011**, p. 27
- 104** Barroso, C. Lo que sabemos e ignoramos: del conocimiento cotidiano a la comprension de la tecnociencia. *CTS*. **2012**,20,(7), 163.

- 105** Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E. J. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. control. release.* **2001**, 70 (1), 146.
- 106** Güllich, C., Clozapine linked to nanocapsules minimizes tissue and oxidative damage to biomolecules lipids, proteins and DNA in brain of rats wistar. *Metabolic Brain Disease.* **2015**, 30 (3), 695.
- 107** Jornada, D. S. et al. Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. *Soft Matter.* **2012**, 8(1), 2646.
- 108** Aishwarya, S.; Mahalakshmi, S.; Sehgal, P. K. Collagen-coated poly (ϵ -caprolactone) microparticles as a controlled drug delivery system. *J. Microencapsul.* **2008**, 25 (5), 298.
- 109** Kulkamp, I. C. et al. Stabilization of lipoic acid by encapsulation in polymeric nanocapsules designed for cutaneous administration. *Química Nova.* **2009**, 32 (8), 2078.
- 110** Lima, K.M.; Silva, C.L.; Rodrigues Jr, J. M. Microesferas biodegradáveis. *Biotecnol. Cienc. Desenv.* **2000**, 2(1), 106.
- 111** Mazzarino, L. et al. Development and validation of a fluorimetric method to determine curcumin in lipid and polymeric nanocapsule suspensions. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* **2010**, 46 (2), 219.
- 112** Melo, N. et al. Development and characterization of poli(l-lactide) nanocapsules containing benzocaine. *Química Nova.* **2010**, 33(1), 65.
- 113** Soares, M.L.C. et al. Visualizing the 3d architecture of multiple erythrocytes infected with plasmodium at nanoscale by focused ion beam-scanning electron microscopy. *Plos One.* **2012**, 7(3), 445.
- 114** Bruxel, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. *Quim. Nova.* **2012**, 35,(9), 1827.

115 Liu, W. et al. Facile spray-drying assembly of uniform microencapsulates with tunable core-shell structures and controlled release properties. *Langmuir*, **2011**, 27(21), 12910.

Müller R., Thaniele

7 ANEXO

Caracterização estrutural de nanocápsulas de poli(ϵ -caprolactona) e de Eudragit® S 100 através de microscopia eletrônica de varredura por feixe de emissão de campo (FEG) e por feixe de íons focalizados (FIB)



ANEXO 1



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Bento Gonçalves 9500 Prédio 43177
Bairro Agronomia • CEP 91501-970
CAIXA POSTAL 15057 • Porto Alegre, RS
Telefone/Fax: 51 316 7056
e-mail cme@if.ufrgs.br
www.cme.ufrgs.br

PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA MEV:

Para obtermos boas imagens no Microscópio Eletrônico de Varredura, devemos primeiro saber um pouco sobre a preparação dessas amostras.

A etapa mais importante neste processo é a fixação, é a primeira etapa, é quando se deixa principalmente a superfície do material o mais resistente possível.

O fixador ideal para Microscopia Eletrônica de Varredura ou Transmissão é aquele que contém na fórmula o Glutaraldeído. A escolha do fixador dependerá do pesquisador, do tipo de material que ele está trabalhando, do tipo de técnica que usará para alcançar seus propósitos.

O fixador faz com que o material fique exatamente como estava na forma viva, também deixará o tecido mais rígido, para que quando a amostra receba o feixe de elétrons ou passe pelo aparelho de “ponto crítico” por exemplo, não ocorram danos na superfície, que para MEV é o que interessa.

Após a fixação o material é lavado em uma solução tampão, que serve para retirar o excesso de fixador. Após então, será desidratado de uma maneira lenta e gradual. Na etapa em que o desidratante está puro (100%) podemos então levar as amostras para o aparelho de Ponto Crítico.

Dicas:

- Para uma boa fixação o volume de fixador deve ser mais ou menos 5X o volume da peça.
- Ao manusear as peças procure tocá-las o mínimo possível, use de preferência um pincel que não solte pêlos ou uma pinça, sempre delicadamente.
- Quanto menor e mais plana a peça, melhor será a sua visualização ao MEV. Se for preciso diminuir ou limpar o seu material, faça isso de preferência na terceira lavagem do Glutaraldeído.
- As amostras depois de prontas devem ser mantidas longe de pó e principalmente de umidade. Utilize um dessecador para guardá-las ou uma caixa com sílica.

PROTOCOLO BÁSICO :

FIXAÇÃO:

Glutaraldeído_ 25% ----- 1,2ml

Tampão Fosfato 0,2M ----- 5,0ml

H₂O destilada ----- 3,8ml

- A Fixação do material, por imersão, deve ser feita imediatamente após a coleta. O período de fixação varia conforme a amostra. Sugere-se de no mínimo uma semana.

LAVAGEM:

Tampão Fosfato 0,2M + H₂O destilada Proporção de 1:1

- O material deve passar por 3 lavagens (30min./cada).

DESIDRATAÇÃO:

Acetona 30% ----- 10min.

Acetona 50% ----- 10min.

Acetona 70% ----- 10min.

Acetona 90% ----- 10min.

Acetona 90% ----- 20min.

Acetona 100% ----- 10min.

Acetona 100% ----- 20min.

DESSECAÇÃO:

- No aparelho de Ponto Crítico, seguir exatamente o que diz o manual. Para se obter principalmente uma boa imagem ao Microscópio, esta etapa é de suma importância. Caso não tenha experiência com o equipamento peça auxílio ao técnico responsável.

No CME utilizamos um CRITICAL POINT DRYER da BALZERS CPD030. Após o Ponto Crítico as peças deverão ser colocadas no Stub, com o auxílio de uma lupa, para facilitar a visualização do ponto ou área de interesse, peça ajuda ao técnico para orientação na escolha do Stub.

METALIZAÇÃO:

- Esta etapa é feita na Metalizadora, tornamos o material condutivo por meio de deposição de um metal sobre a amostra. No CME temos alvo de Ouro e de Platina. Para uma boa cobertura deve-se seguir exatamente o que diz o manual, caso não tenha experiência com o equipamento peça auxílio ao técnico responsável.

No CME utilizamos um SPUTTER COATER da BALZERS SCD050.