



Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Centro de Tecnologia
Departamento de Engenharia Química
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MICRO E
NANOESTRUTURADOS DE QUITOSANA/MDI PARA
APLICAÇÕES COSMÉTICAS**

Bento Pereira da Costa Neto

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia de Medeiros Lula da Mata PPGEQ/UFRN
Co-orientadora: Dr^a Maria Inês Ré – IPT/SP

Natal / RN
Março / 2009

Bento Pereira da Costa Neto

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MICRO E
NANOESTRUTURADOS DE QUITOSANA/MDI PARA
APLICAÇÕES COSMÉTICAS**

*Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Engenharia
Química da Universidade Federal do Rio
Grande de Norte, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Mestre em
Engenharia Química.*

Natal/RN
Março/2009

Divisão de Serviços Técnicos
Catalogação da Publicação na Fonte.
UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede

Costa Neto, Bento Pereira da.

Desenvolvimento de sistemas micro e nanoestruturados de quitosana/MDI para aplicações cosméticas / Bento Pereira da Costa Neto.
– Natal, RN, 2009.

124 f.

Orientadora: Ana Lúcia de Medeiros Lula da Mata.

Coorientadora: Maria Inês Ré.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

1. Microencapsulação – Dissertação. 2. Policondensação interfacial – Dissertação. 3. Emulsificação espontânea – Dissertação. 4. Liberação controlada. I. Mata, Ana Lúcia de Medeiros Lula da. II. Ré, Maria Inês. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 66.08(043.3)

Bento Pereira da Costa Neto

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS MICRO E NANOESTRUTURADOS DE
QUITOSANA/MDI PARA APLICAÇÕES COSMÉTICAS**

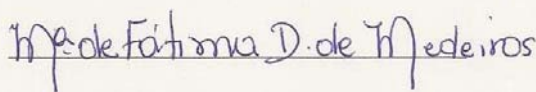
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - PPGEQ, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovado em 05 / Março / 2009




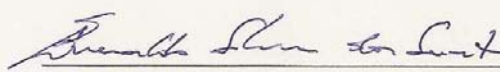
Prof.ª Dr.ª Ana Lúcia de M. Lula da Mata

Orientadora – UFRN



Prof.ª Dr.ª Maria de Fátima D. de Medeiros

Membro Interno - UFRN



Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos

Membro Interno – UFRN

Dr. Adriano Marim de Oliveira

Membro Externo - IPT

Dedicatória

A Deus, em quem deposito toda a minha fé e esperança. Obrigado por permanecer constante em minha vida e não me abandonar nos momentos mais difíceis;

Aos meus pais Antonio e Neta, os quais sempre me apoiaram nas realizações dos meus projetos. Agradeço por todo carinho e amor que sempre me dedicaram e, principalmente, por acreditarem em mim;

As minhas irmãs Marjorie, Maarâni e Lúcia, por toda amizade. Agradeço por sempre estarem ao meu lado e pelos conselhos que me deram;

A minha Noiva, Gidyonne, por sempre me apoiar e acreditar em mim. Agradeço por toda paciência nos momentos difíceis, por me fazer rir mesmo estando longe. Obrigado por tornar a minha vida mais bela;

Por último, mas não menos importante, ao Doutor Adriano Marim de Oliveira, a Autarquia do Saber. Agradeço pela dedicação, esforço e paciência. Obrigado pelas palavras amigas e pelos ensinamentos constantes. Essa dissertação não teria sido finalizada se não contasse com sua ajuda.

Agradecimentos

Às Professoras, Dra. Ana Lúcia de Medeiros e Dra Maria Inês Ré pela oportunidade oferecida, por ter confiado em minha capacidade de trabalho, pelas orientações e correções e por me proporcionar muitas oportunidades que contribuíram para a minha vida profissional.

Aos amigos do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, Ana Letícia, Vivianne Buono, Shirley, Suca, David, Kleber, Maria Helena, Priscila, Luciana e Marcio pela amizade, incentivo e apoio. Obrigado pelas contribuições de cada um tanto para a minha dissertação quanto para a minha vida. Entendo que amigos vão e vem, mas que um punhado deles, preciosos, eu tenho que guardar com carinho. Esses amigos preciosos são vocês.

Aos amigos da UFRN, Luiz, Ricardo Henrique e Iara pela amizade, companheirismo e dedicação durante a graduação e mestrado.

Ao meu grande amigo Pierre, o Anhangüera, por toda disposição que teve para me ajudar nos ensaios, pela grande amizade que nasceu entre nós, pelas longas e valiosas conversas que sempre tivemos e pelas risadas e mais risadas que demos ao longo dessa jornada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química pela oportunidade de melhorar minha qualificação profissional.

Ao IPT pela oportunidade de realizar os ensaios experimentais no Laboratório de Processos Químicos e Tecnologia de Partículas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

“Os emergentes campos da Nanociência e Nanotecnologia lideram níveis sem precedentes de compreensão e de controle das unidades estruturais de tudo o que é físico. Isto irá mudar sobremaneira como tudo será desenvolvido e fabricado.”

National Nanotechnology Initiative.

COSTA NETO, Bento Pereira - Desenvolvimento de sistemas micro e nanoestruturados de quitosana/MDI para aplicações cosméticas. Dissertação de Mestrado, UFRN, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Área de Concentração: Engenharia de Processos – Subárea de concentração: Encapsulação.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia de Medeiros Lula da Mata – PPGEQ/UFRN

Co-orientadora: Dr^a Maria Inês Ré – IPT/SP

Resumo: O presente trabalho visou o estudo e desenvolvimento de um sistema micro e nanoestruturado de quitosana reticulada por diisocianato, pela técnica de policondensação interfacial combinada com emulsificação espontânea, para encapsulação de benzofenona-3 (BZ-3), um filtro solar químico. Foi elaborado primeiramente um planejamento experimental de 2^3 para desenvolvimento da formulação de partículas de quitosana e MDI (4,4'-difenil metano diisocianato), onde as variáveis foram às concentrações de MDI, de quitosana e do solvente. A partir dos dados fornecidos pelo planejamento experimental, optou-se pelas condições de processo e formulação capazes de gerar o menor diâmetro de partícula. O estudo prosseguiu com a incorporação de BZ-3 e Miglyol (núcleo das cápsulas formadas). Suspensões de nanocápsulas com concentrações de 6,25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 18,75 mg/mL e 25 mg/mL de BZ-3 foram preparadas, porém durante o período de armazenamento ocorreu o aparecimento de precipitados cristalinos, nas suspensões de 18,75 mg/mL e 25 mg/mL de BZ-3. Este aparecimento de precipitados cristalinos foi atribuído à difusão da BZ-3 para a fase aquosa não ocorrendo sua encapsulação. A suspensão contendo 6,25 mg/mL de BZ-3 apresentou diâmetro médio de $1,47\mu\text{m}$, potencial zeta de 61 mV, pH de 5,64 e teor de encapsulação próximos a 100 %. A suspensão contendo 12,5mg/mL de BZ-3 apresentou diâmetro médio de $1,76\mu\text{m}$, potencial zeta de 47,4mV, pH 5,71 e teor de encapsulação próximos a 100 % e foi selecionada juntamente com a de 6,25 mg/mL para a continuidade do estudo. Estas formulações foram caracterizadas também pela morfologia, turbidimetria, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, DSC e foi elaborado um estudo de liberação controlada do fármaco em diferentes meios receptores. Em conclusão, o conjunto dos resultados obtidos demonstra que estas formulações são sistemas promissores para a aplicação cutânea de filtros solares.

Palavras-chaves: Microencapsulação; Policondensação interfacial; Emulsificação espontânea; Reticulação cruzada; Liberação controlada.

Abstract

Currently, studies in the area of polymeric microcapsules and nanocapsules and controlled release are considerably advanced. This work aims the study and development of microcapsules and nanocapsules from Chitosan/MDI, using a new technique of interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification, for encapsulation of BZ-3. It was firstly elaborated an experimental design of 2^3 of the particle in white without the presence of BZ-3 and Miglyol, where the variables were the concentrations of MDI, chitosan and solvent. Starting from the data supplied by the experimental design was chosen the experiment with smaller particle diameter and only added like this BZ-3 and Miglyol.

The suspension containing concentrations of 6.25 mg/mL, 12.5 mg/mL, 18.75 mg/mL, 25 mg/mL of BZ-3 were prepared, nevertheless, during the storage time, these formulations presented drug precipitates in the suspensions of 18.75 mg/mL and 25 mg/mL of BZ-3. This apparition of precipitate was attributed to the diffusion of BZ-3 for the aqueous phase without any encapsulation, suggesting so the use of the smaller concentrations of the BZ-3. The suspension containing 6.25mg/mL of BZ3 presented average size of 1.47 μ m, zeta potential of 61 mV, pH 5.64 and this sample showed an amount of BZ-3 and drug entrapment of 100 %. The suspension containing 12.5mg/mL of BZ-3 presented average size of 1.76 μ m, zeta potential of 47.4 mV, pH 5.71 and this sample showed an amount of BZ-3 and drug entrapment of 100 %. Then, showing such important characteristics, these two formulations were chosen for futher continuity to the study. These formulations were also characterized by the morphology, FTIR, stability for Turbiscan, DSC and a study of controlled release of the BZ-3 was elaborated in different receiving means.

Keywords: Microencapsulation; Interfacial polycondensation; Spontaneous emulsification; Cross-linking; Controlled release.

Lista de Figuras

<i>Figura 2.1. Diferentes áreas de aplicação da nanotecnologia.....</i>	08
<i>Figura 2.2. Representação de cápsulas e esferas.....</i>	10
<i>Figura 2.3. Esquema da emulsificação espontânea.....</i>	13
<i>Figura 2.4. Mecanismo de preparação de partículas usando a técnica de policondensação interfacial combinada com emulsificação espontânea.....</i>	15
<i>Figura 2.5. Fórmula estrutural do MDI.....</i>	22
<i>Figura 2.6. Fórmula estrutural da BZ-3.....</i>	23
<i>Figura 2.7. Estruturas de ressonância das benzofenonas.....</i>	24
<i>Figura 2.8. Triglicerídeos de ácido caprílico.....</i>	26
<i>Figura 2.9. Triglicerídeos de ácido cáprico.....</i>	26
<i>Figura 2.10. Estrutura molecular do Tween 80.....</i>	27
<i>Figura 2.11. Estrutura molecular do Span 80.....</i>	28
<i>Figura 3.1. Principais fatos históricos em nanotecnologia.....</i>	30
<i>Figura 4.1. Fluxograma das etapas de obtenção das partículas.....</i>	45
<i>Figura 4.2.. Representação esquemática do princípio de funcionamento do Turbiscan.....</i>	50
<i>Figura 5.1. Cristais de BZ-3 na fase aquosa (Microscopia óptica; 200X).....</i>	56
<i>Figura 5.2. Suspensões preparadas com diferentes concentrações de miglyol, microscopia óptica 200X: (a) 2000mg; (b) 2500 mg.....</i>	57
<i>Figura 5.3. Diâmetros de partículas com diferentes tipos de solventes.....</i>	58
<i>Figura 5.4. Gráfico de Pareto.....</i>	60
<i>Figura 5.5. Relação entre os valores preditos pelo tratamento matemático e os valores observados.....</i>	61
<i>Figura 5.6. Valor residual versus valores observados.....</i>	62
<i>Figura 5.7. Valor residual versus valores preditos.....</i>	62
<i>Figura 5.8. Superfície de resposta.....</i>	64

<i>Figura 5.9. Gráficos de variação de transmissão e backscattering da formulação de 6,25mg/mL.....</i>	68
<i>Figura 5.10. Gráficos de variação de transmissão e backscattering da formulação de 12,5mg/mL.....</i>	68
<i>Figura 5.11. Gráfico de diâmetro de partícula COULTER® granulometer para solução de 6,25mg/mL de BZ-3.....</i>	70
<i>Figura 5.12. Gráfico de diâmetro de partícula Zetamaster S para solução de 6,25mg/mL de BZ-3.....</i>	70
<i>Figura 5.13. Gráfico de diâmetro de partícula COULTER® granulometer para solução de 12,5mg/mL de BZ-3.....</i>	71
<i>Figura 5.14. Gráfico de diâmetro de partícula Zetamaster S para solução de 12,5mg/mL de BZ-3.....</i>	71
<i>Figura 5.15. Microscopia eletrônica de transmissão das partículas de Quitosana/MDI.....</i>	72
<i>Figura 5.16. Microscopia eletrônica de varredura das partículas.....</i>	72
<i>Figura 5.17. Microscopia óptica de uma cápsula.....</i>	73
<i>Figura 5.18. Comparação entre os FT-IR.....</i>	74
<i>Figura 5.19. FT-IR das cápsulas de quitosana/MDI.....</i>	75
<i>Figura 5.20. Curvas de TG e SDTA da amostra de quitosana de baixo peso molecular.....</i>	76
<i>Figura 5.21. Curvas DSC das partículas contendo 6,25 e 12,5 mg/mL de BZ-3, da quitosana e da BZ-3 pura.....</i>	77
<i>Figura 5.22. Potencial zeta das partículas: (a) 12mg/mL; (b) 6,25mg/mL.....</i>	78
<i>Figura 5.23. Perfis cinéticos de liberação de Bz3 de formulações de partículas quitosana/MDI: a) 6,25 mg/mL; b) 12,5 mg/mL livre de membrana.....</i>	79
<i>Figura 5.24. Curva de liberação das formulações 6,25 e 12,5 mg/mL em etanol.....</i>	80

Lista de Tabelas

<i>Tabela 2.1. Métodos de obtenção de microencapsulação. (Adaptada de BENITA, 1996).....</i>	12
<i>Tabela 4.1. Planejamento experimental para obtenção de partículas quitosana/MDI..</i>	43
<i>Tabela 5.1. Variáveis do planejamento experimental.....</i>	58
<i>Tabela 5.2. Planejamento experimental.....</i>	59
<i>Tabela 5.3. Efeitos calculados no Statística 7.0 para Planejamento Fatorial 2³</i>	59
<i>Tabela 5.4. Análise de variância.....</i>	65
<i>Tabela 5.4. Composição da suspensão de partículas contendo 6,25 mg/mL de BZ-3...</i>	66
<i>Tabela 5.5. Composição da suspensão de partículas contendo 12,5 mg/mL de BZ-3...</i>	66
<i>Tabela 5.6. Composição da suspensão de partículas contendo 18,75 mg/mL de BZ-3.</i>	67
<i>Tabela 5.7. Composição da suspensão de partículas contendo 25 mg/mL de BZ-3.....</i>	67
<i>Tabela 5.9. Porcentagem de BZ-3 encapsulada.....</i>	77

Lista de Abreviaturas e Siglas

BZ-3: Benzofenona-3;

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;

CTFA: Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association;

DSC: Análise de Calorimetria Diferencial de Varredura;

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura;

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão;

DTA: Análise térmica diferencial;

DP: Desvio padrão.

EPIs: Equipamentos de proteção individual;

FPS: Fator de Proteção Solar;

HLB: Hidrofilic-Lipofilic Balance (Balanço hidrófilo-lipófilo);

MCO: Metoxicinamato de octila;

MDI: 4,4'-difeníl metano diisocianato;

TG: Análise Termogravimétrica;

UV: Ultravioleta

UVA: Ultravioleta A

UVB: Ultravioleta B

µg/mL: Microgramas por mililitro;

mg/mL: Miligramas por mililitro;

µm: Micrômetro(s)

nm: Nanômetro(s)

µL: Microlitro(s)

mL: Mililitro(s)

min.: Minuto(s)

h: Hora(s)

λ: Comprimento de onda

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	02
2. ASPECTOS TEÓRICOS.....	06
2.1. NANOTECNOLOGIA.....	06
2.2. MICRO/NANOENCAPSULAÇÃO.....	09
2.3. MÉTODOS DE ENCAPSULAÇÃO.....	12
2.4. TÉCNICA DE EMULSIFICAÇÃO ESPONTÂNEA.....	13
2.5. TÉCNICA DE POLICONDENSAÇÃO INTERFACIAL.....	14
2.6. TÉCNICA DE POLICONDENSAÇÃO INTERFACIAL COMBINADA COM EMULSIFICAÇÃO ESPONTÂNEA.....	15
2.7. REAÇÃO DE RETICULAÇÃO CRUZADA.....	16
2.8. MECANISMOS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE ATIVOS.....	18
2.9. MATÉRIAS – PRIMAS.....	20
2.9.1. Quitosana.....	20
2.9.2. Diisocianato – MDI.....	22
2.9.3. Benzofenona-3.....	23
2.9.4. Miglyol.....	25
2.9.5. Tensoativos.....	27
2.9.5.1 Tween 80.....	27
2.9.5.2 Span 80.....	28
3. ESTADO DA ARTE.....	30

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	41
4.1. MATERIAIS.....	41
4.1.1. Equipamentos.....	41
4.1.2 Reagentes.....	42
4.2. ENSAIOS PRELIMINARES.....	42
4.3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	43
4.4. METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DAS PARTÍCULAS DE QUITOSANA/MDI.....	44
4.5. CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE PARTÍCULA DE QUITOSANA/MDI.....	46
4.5.1. Granulometria e índice de polidispersão.....	46
4.5.2. Microscopia e morfologia.....	46
4.5.3. Potencial zeta.....	47
4.5.4. Eficiência de encapsulação da BZ-3 por CLAE.....	47
4.5.5. Turbidimetria.....	49
4.5.6. Estudo da liberação controlada.....	50
4.5.6.1. Estudo da liberação controlada livre de membranas.....	50
4.5.6.2. Estudo da liberação controlada com membranas de diálise.....	51
4.5.7. pH.....	52
4.5.8. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	52
4.5.9. Análises térmicas.....	52
4.5.9. 1. Análise Termogravimétrica (TG) e Análise térmica diferencial (DTA).....	52
4.5.9.2. Análise de calorimetria diferencial de varredura – DSC.....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	56
5.1. ENSAIOS PRELIMINARES.....	56
5.1.1. Introdução do miglyol no sistema.....	56

5.1.2. Concentração do miglyol no sistema.....	56
5.1.3. Escolha do solvente.....	57
5.2. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	58
5.3. ENCAPSULAÇÃO DA BZ-3.....	66
5.4. ANÁLISE DA ESTABILIDADE FÍSICA DAS SUSPENSÕES (TURBIDIMETRIA DINÂMICA).....	67
5.5. GRANULOMETRIA E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO.....	69
5.6. MICROSCOPIA E MORFOLOGIA DAS PARTÍCULAS.....	72
5.7. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO.....	73
5.8. ANÁLISES TÉRMICAS.....	75
5.8.1. Análise Termogravimétrica (TG) e análise térmica diferencial (DTA) da quitosana.....	75
5.8.2. Análise de calorimetria diferencial de varredura – DSC.....	76
5.9. EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO.....	77
5.10. POTENCIAL ZETA.....	78
5.11. DETERMINAÇÃO DO PH.....	78
5.12. LIBERAÇÃO CONTROLADA.....	79
5.12.1. Estudo livre de membrana.....	79
5.12.2. Estudo de liberação incorporando membrana.....	80
6. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO.....	83
<i>SUGESTÕES DE CONTINUIDADE.....</i>	<i>86</i>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
ANEXOS.....	104

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

Introdução geral

No atual contexto mundial em que a competitividade industrial é crescente, o domínio da tecnologia, ou seja, a aplicação de princípios, métodos, instrumentos ou processos elaborados a partir da pesquisa científica para desenvolver e aperfeiçoar produtos, é essencial para qualquer país. Algumas tecnologias podem ser utilizadas em variados setores e permitem um controle mais sofisticado das propriedades de diferentes produtos que vem alcançando hoje maior valor estratégico. Uma destas tecnologias que apresenta um enorme potencial, é a encapsulação. Ainda pouco conhecida no Brasil, essa tecnologia envolve processos complexos que permitem incorporar a um material ativo novas propriedades funcionais e inteligentes, tornando mais eficaz o produto final do qual esse material fará parte (Filho & Oliveira, 1999).

A encapsulação é uma tecnologia que permite o revestimento fino a partículas sólidas, gotas de líquidos, dispersões, como um filme protetor. Os sistemas coloidais incluem as emulsões, esferas, cápsulas, lipossomas e complexos lipídicos e são capazes de atuar como veículos para fármacos lipofílicos e hidrofílicos. Os sistemas micros e nanoestruturados podem ser administrados pelas vias intravenosas, subcutâneas, oral, tópica, ocular e intramuscular. A principal vantagem destes sistemas é a capacidade de modificar consideravelmente a penetração intracelular das substâncias a eles associados (Alvarez-Román et al., 2001). A utilização dos sistemas coloidais como carreadores de substâncias de uso dermatológico tem sido alvo de inúmeras pesquisas, contribuindo para a introdução gradual destes sistemas no mercado farmacêutico e de cosméticos (Dingler et al., 1999; Umbach, 1995).

O termo partícula refere-se à esferas e cápsulas e esta tecnologia de produção de partículas é utilizada para transporte de fármacos hidrofóbicos. As partículas podem ser projetadas e produzidas com características específicas, permitindo maior eficiência de encapsulação e liberação controlada quando comparadas aos sistemas de encapsulação convencional. Elas são ainda atrativas por serem pequenas o suficiente para serem injetadas diretamente no sistema circulatório, além de poderem ser administradas por outras vias como pulmonar, nasal, transcutânea, transdérmica e oral (Picos et al., 2000).

Os componentes estruturais das partículas compreendem polímeros sintéticos ou naturais, onde os naturais são normalmente utilizados em aplicações de curta duração, enquanto os sintéticos podem apresentar liberação controlada por períodos prolongados. As esferas têm um tipo de estrutura matricial. A droga pode ser absorvida na superfície da esfera ou encapsulada dentro da partícula. No caso das cápsulas encontra-se um sistema vesicular onde o fármaco é confinado em uma cavidade (núcleo) dentro da partícula, recoberta por uma membrana polimérica (Couvrier, 1995).

As cápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (Weiss, 2001). Assim, um micro - nanocosmético pode ser definido como sendo uma formulação cosmética que veicula ativos ou outros ingredientes micro e nanoestruturados e que apresenta propriedades superiores quanto ao seu desempenho em comparação com produtos convencionais (Fronza et al., 2007). Logo, as micro e nanopartículas estão sendo propostas como veículos tópicos, especialmente para bloqueadores UV, com o propósito de prolongar o tempo de resistência dos filtros solares no estrato córneo (Alvarez-Román et al., 2004).

Tendo como base os conceitos de nanotecnologia, micro e nanoencapsulação o presente trabalho enquadra-se no âmbito das atividades da Rede de Pesquisas de Nanocosméticos financiada pelo CNP. Foi realizado em parceria com o Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT-SP) e o Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPGEQ/UFRN), tendo como alvo uma concentração de competências e esforços interinstitucionais para a obtenção e desenvolvimento de micro e nanopartículas poliméricas de Quitosana/MDI com o intuito de encapsular a Benzofenona-3, um ativo lipofílico aplicado em filtros solares. O presente trabalho se mostra inovador, trazendo para o âmbito do PPGEQ/UFRN uma nova linha de pesquisa: a micro e nanoencapsulação, podendo ser utilizada em parceria com projetos já elaborados com o uso da quitosana nos laboratórios da UFRN.

Acompanhando essa linha de raciocínio os objetivos específicos desse trabalho foram: desenvolver e aperfeiçoar o processo de obtenção das micro e nanocápsulas, obter os menores diâmetros de partícula sem a presença de MDI residual, obter a maior eficiência de encapsulação e elaborar um estudo de liberação do ativo em diferentes meios.

Esta dissertação apresenta, portanto, os resultados destes estudos e está dividida em seis capítulos. No Capítulo 1 foi feita uma breve introdução sobre o assunto em tela, abordando-se alguns trabalhos da literatura e ressaltando-se a importância da parceria realizada entre o PPGEQ/UFRN e o IPT-SP. No Capítulo 2 são abordados os aspectos teóricos referentes aos conceitos de nanotecnologia, micro e nanoencapsulação, os métodos de encapsulação, as técnicas de emulsificação espontânea e policondensação interfacial, a reação de reticulação cruzada, os mecanismos de liberação controlada e as matérias-primas utilizadas neste trabalho (quitosana, MDI, miglyol, BZ-3 e os tensoativos). O Estado da Arte está contemplado no Capítulo 3 onde é apresentado um “histórico” da nanotecnologia aplicada na área cosmética: como e quando teve início, metodologias e técnicas, quais rumos tomou e como se encontra hoje no cenário científico-tecnológico. O Capítulo 4 descreve a Metodologia Experimental utilizada para a realização desta pesquisa, os materiais utilizados, o planejamento experimental realizado, a metodologia para obtenção das partículas de quitosana/MDI e as caracterizações das suspensões de partículas de quitosana/MDI (granulometria, índice de polidispersão, morfologia, carga superficial, teor de ativo encapsulado, estabilidade física das suspensões e caracterizações térmicas). Os Resultados e Discussões são apresentados no Capítulo 5 analisando-os e discutindo-se as caracterizações realizadas nas suspensões de partículas de quitosana/MDI. Fechando esta Dissertação o Capítulo 6 apresenta uma breve discussão geral sobre os resultados e as conclusões obtidas no trabalho, propondo-se inclusive sugestões para trabalhos futuros.

CAPÍTULO 2

ASPECTOS TEÓRICOS

Aspectos teóricos

2.1. Nanotecnologia

Muito se tem discutido sobre a tendência de miniaturização que abrange desde computadores e periféricos a máquinas responsáveis pela produção dos mais diversos itens. Entretanto, um aspecto que tem inquietado o meio acadêmico nos últimos anos, relaciona-se a miniaturização de uma forma surpreendentemente diferente, não mais se restringindo a miniaturizar máquinas e equipamentos, mas em fabricá-los em escala atômica, ou melhor, dizendo, em escala nanométrica.

A nanotecnologia é o estudo e manipulação dos materiais quando reduzidos a partículas cujos tamanhos encontram-se na casa do nanômetro ou milionésimo do milímetro – número cem mil vezes menor do que o diâmetro de um fio de cabelo. Em média, um átomo mede de 0,2 a 0,4 nanômetro, logo outra definição pode ser dada para a ciência, por se, tratar-se da capacidade de manipular átomos e moléculas de forma a dar aos materiais propriedades diferentes das que eles apresentam em seu estado natural (Sant’anna, 2007).

Dois procedimentos de produção são utilizados atualmente em nanotecnologia, são eles: *bottom up* (de baixo para cima) e *top down* (de cima para baixo). O método *top down* refere-se à diminuição do material de sua forma volumosa (*bulk*) para dimensões nanométricas por técnicas de litografia. Esse método, no entanto, tem encontrado limitações sendo pouco utilizado. O método “*bottom up*”, refere-se à construção de dispositivos a partir de átomos ou moléculas ligados quimicamente. Nesse caso, as estruturas são vistas como versáteis “blocos de construção” para a obtenção de dispositivos nanométricos, por exemplo, a funcionalização de um substrato com moléculas de propriedades e funções específicas (Moraru; Panchapakesan; Huang, 2003).

Na escala nanométrica surgem novos fenômenos que não aparecem em escala macroscópica. As mudanças mais importantes de comportamento são causadas não

apenas pela ordem de magnitude da redução de tamanho, mas por novos fenômenos intrínsecos observados que se tornam predominantes em nanoescalas (Nicolau et al., 2000; Rieth, 2003; Galembeck, 2003). À medida que os corpos diminuem de tamanho, as forças gravitacionais, o atrito e a combustão diminuem sua influência, enquanto novas forças, como forças eletrostática ganham destaque. Na escala nanométrica a força de atração eletrostática entre dois prótons é cerca de 10^{36} vezes maior que a força gravitacional (Fishbine, 2002; Rocco, 1995; Rocco; Bainbridge, 2001; Rocco et al., 1999; Seeman, 2003).

Existe hoje uma produção científica significativa no Brasil, nos temas de manipulação de nano-objetos, nanoeletrônica, nanomagnetismo, nanoquímica e nanobiotecnologia, incluindo os nanofármacos, a nanocatálise e as estruturas nanopoliméricas. Também há uma produção tecnológica representada por patentes e há projetos sendo executados por empresas, isoladamente ou em cooperação com universidades ou institutos de pesquisa. Isto mostra que a nanotecnologia é multidisciplinar, unindo diversas áreas de conhecimento, tais como: química, física, biologia e engenharias. Apesar de estar relacionada a estruturas muito pequenas, a nanotecnologia traz benefícios enormes, permitindo atingir o que em alguns anos atrás era apenas ficção. Por esta razão, é agora um dos campos mais importantes mundialmente. Observando a relevância da nanotecnologia, a Figura 2.1 apresenta algumas possibilidades de aplicação dos nanomateriais em diferentes áreas da ciência.

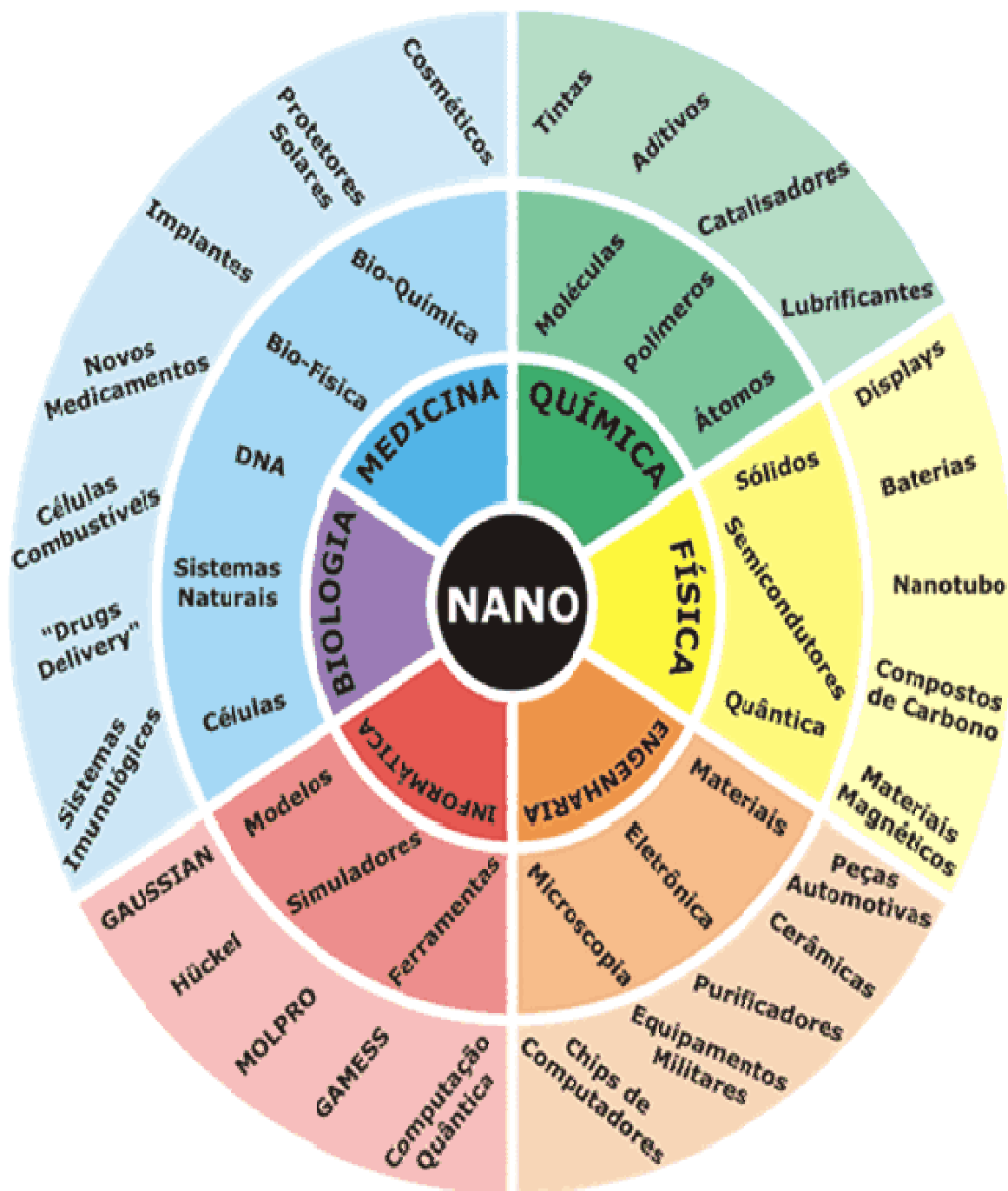


Figura 2.1. Diferentes áreas de aplicação da nanotecnologia (Adaptado do INOVABRASIL, 2007).

2.2. Micro/Nanoencapsulação

Define-se microencapsulação como uma tecnologia de empacotamento de sólidos, gotículas de líquido ou materiais gasosos em finas camadas poliméricas que podem liberar seu conteúdo a taxas controladas e condições específicas (Sparks, 1981). O material encapsulado é conhecido como ativo e o material de cobertura pode ser chamado de membrana, carregador ou parede (Gibbs et al., 1999).

As principais nanoestruturas utilizadas para encapsulação de ativos são as nanopartículas poliméricas, as nanopartículas lipídicas, os lipossomas e as ciclodextrinas. As vantagens desses sistemas são a melhoria da estabilidade química e física dos ativos, melhoria da biodisponibilidade, manutenção do ativo no tecido alvo, muitas vezes, possibilitando a penetração deste em zonas corpóreas de difícil acesso, solubilização de ativos hidrofóbicos, redução de efeitos colaterais e da toxicidade, assim como do número de doses e frequência de administração, proporcionando maior conforto ao paciente e, conseqüentemente, a maior adesão ao tratamento (Lasic, 1993; Szejtli, 1988).

Estes sistemas possuem características vantajosas que fazem deles promissores veículos para aplicações cosméticas, dentre as quais se destacam a capacidade de proteção a compostos lábeis contra degradação química, a possibilidade de controlar a liberação dos componentes ativos, a atuação como agentes oclusivos, permitindo um aumento no conteúdo de água na pele, e a potencial ação como bloqueadores das radiações UV, atuando como filtros físicos, podendo ser combinados a filtros químicos melhorando a fotoproteção (Wissing & Müller, 2003). Nanocarreadores apresentam tamanho reduzido possibilitando um aumento do contato de moléculas ativas com o estrato córneo, além de facilitar sua formulação em produtos dermatológicos e propiciar confortável aplicação cutânea (Alves et al., 2007; Guterres et al., 2007).

A obtenção de partículas é condicionada a vários fatores como: concentração do polímero e ativo, quantidade de tensoativo, concentração de óleo na fase orgânica e velocidade de difusão da fase orgânica na aquosa (Couvrier et al., 2002). Algumas características físico-químicas são essenciais para o equilíbrio dos sistemas, tendo como exemplo o diâmetro de partícula. Este é um parâmetro importante utilizado no controle

de qualidade, pois a estabilidade física das dispersões depende do tamanho da partícula e do índice de polidispersão (Müller-Goymann,2004). O pH também é uma característica físico-química importante a ser analisada, pois mudanças em seus valores podem estar associados à degradação do polímero ou de outros elementos pertencentes à formulação, sendo sua determinação também útil no monitoramento da estabilidade de suspensões coloidais poliméricas (Schaffazic et al., 2003; Guterres et al., 2007).

A microcápsula consiste, em geral, de uma camada de polímero que atua como um filme protetor, isolando a substância ativa e evitando os efeitos de sua exposição inadequada. Essa membrana desfaz-se sob estímulos específicos, liberando a substância em locais específicos ou na taxa mais adequada ao tratamento. Outra possibilidade de encapsulação, além das cápsulas, é a formação de microesferas. Neste segundo caso, o material ativo encontra-se disperso em uma matriz sólida de polímero (Ré, 2000). A Figura 2.2 representa bem essa diferença entre as cápsulas e esferas.

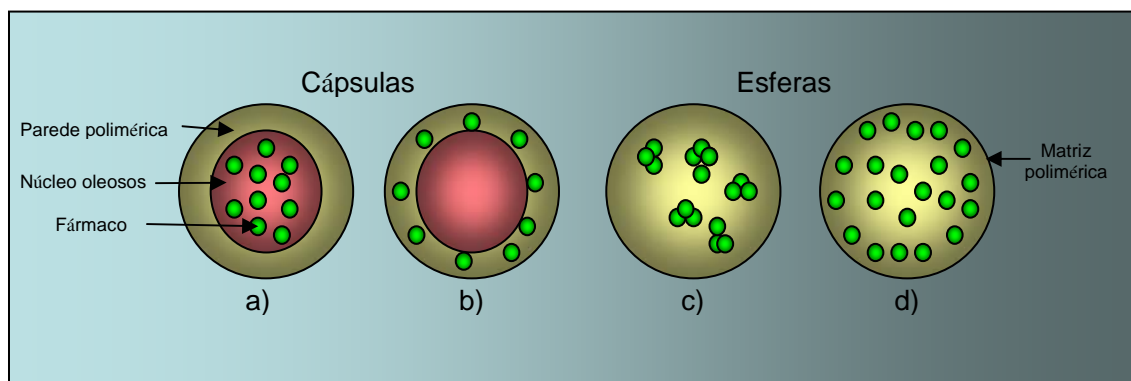


Figura 2.2. Representação de cápsulas e esferas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso; b) fármaco adsorvido à parede polimérica; c) fármaco retido na matriz polimérica; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica (Adaptado do INFARMA, 2005).

As microcápsulas são usadas principalmente para aumentar a estabilidade de uma droga, para modificar ou retardar sua liberação em locais específicos de ação, substâncias antiinflamatórias, por exemplo, podem ter seu tempo de atuação no plasma sanguíneo aumentado pela microencapsulação, prolongando seu efeito no organismo (Ré, 2000). As nanocápsulas apresentam uma série de vantagens em relação a outros sistemas e emulsões, pois conferem proteção do ativo nela incorporada frente à

degradação química, uma vez que o ativo fica retido no interior de uma matriz polimérica sólida ou de um invólucro polimérico que também tem a função de controlar a liberação do ativo no meio de dispersão (Dingler et al., 1999).

Um grande número de fármacos apresenta pouca solubilidade ou instabilidade em meio aquoso, fatores que podem originar problemas no desenvolvimento de formulações. Neste sentido, as nanopartículas poliméricas podem proteger moléculas lábeis e moléculas com problemas de solubilidade (Legrand et al., 1999).

Aplicando-se a micro e nanoencapsulação de fármacos na área cosmética obtém-se uma série de vantagens (Natura, 2007) tais como:

- Aumenta a penetração do ativo no substrato (pele ou cabelo);
- Liberação mais efetiva do ativo para o substrato (área de superfície);
- Possibilidade de distribuição de ativos mais uniformes no substrato (pele ou cabelo);
- Maior possibilidade de penetração através da pele causando melhora de eficácia biológica dos ativos;
- Aumenta a solubilidade dos ativos, permitindo maior flexibilidade na formulação;
- Aumento da estabilidade físico-química.

2.3. Métodos de Encapsulação

Vários métodos de encapsulação são aplicados atualmente, inclusive em escala industrial, como o “*Spray-drying*”, policondensação interfacial, entre outros. Estes métodos também podem ser divididos em duas classes, sendo a primeira aquela em que, durante o processo de formação das nanopartículas ocorre uma reação de polimerização; a segunda classe, a nanopartícula é formada por um processo físico-químico, empregando um polímero pré-formado (Reis et al., 2006). O processo de encapsulação polimérica envolve uma larga área de aplicações, as quais se podem citar: as formulações de produtos farmacêuticos e agrícolas, na indústria de cosméticos e em revestimentos. Este processo é muitas vezes utilizado por razões de toxicidade do produto à ser encapsulado, para mascarar gosto e odor, ou para facilitar a estocagem e o transporte do produto encapsulado (Janssen, 1995). A Tabela 2.1 mostra os vários métodos de encapsulação que são aplicados atualmente.

Tabela 2.1. Métodos de obtenção de microencapsulação. (Adaptada de BENITA, 1996).

Métodos Físicos	Métodos Físico-Químicos	Métodos Químicos
“ <i>Spray-drying</i> ”	Coacervação Simples	Polimerização interfacial
“ <i>Spray-chilling</i> ”	Coacervação Complexa	Polimerização “ <i>in-situ</i> ”
Leito fluidizado	Emulsificação e evaporação de solvente	
Deposição eletrostática	Gelificação iônica/térmica	
Extrusão centrífuga	Incompatibilidade polímero - polímero	
Separação rotacional de suspensões		
Centrifugação multiorifício		
Revestimento em turbinas		
Dessolvatação em meio líquido		

2.4. Técnica de emulsificação espontânea

Na emulsificação clássica preparam-se duas fases, uma lipofílica e outra hidrofílica, que são aquecidas separadamente e vertidas, uma sobre a outra, sob agitação, seguida da redução do diâmetro médio das gotículas realizado através de métodos físicos (Kessler, 2001; Fronza; Campos; Teixeira, 2004). A preparação de formulações por esta técnica foi descrita para diversos fármacos por Sznitowska et al (2001), assim como para o diazepam (Levy & Benita, 1989) e mais recentemente, para a nalbufina (Wang et al., 2006).

A emulsificação espontânea é uma alternativa interessante para estudos de desenvolvimento, uma vez que permite a preparação de pequenos volumes de formulação. Outra vantagem desta técnica é que a preparação das nanoemulsões é realizada sem necessidade de aquecimento das fases, o que é interessante para fármacos termos-sensíveis. Por esse método, o fármaco lipofílico é dissolvido em um solvente orgânico miscível em água juntamente com o óleo que constitui a fase interna da nanoemulsão e com um tensoativo lipofílico. A fase aquosa é composta, além de água, de um tensoativo hidrofílico. Após a preparação das duas fases, verte-se a fase orgânica sobre a aquosa sob agitação moderada, e o solvente orgânico é retirado por evaporação à pressão reduzida (Yu et al., 1993; Pouton, 1997; Bouchemal et al., 2004, b). A Figura 2.4 representa bem o esquema da emulsificação espontânea.

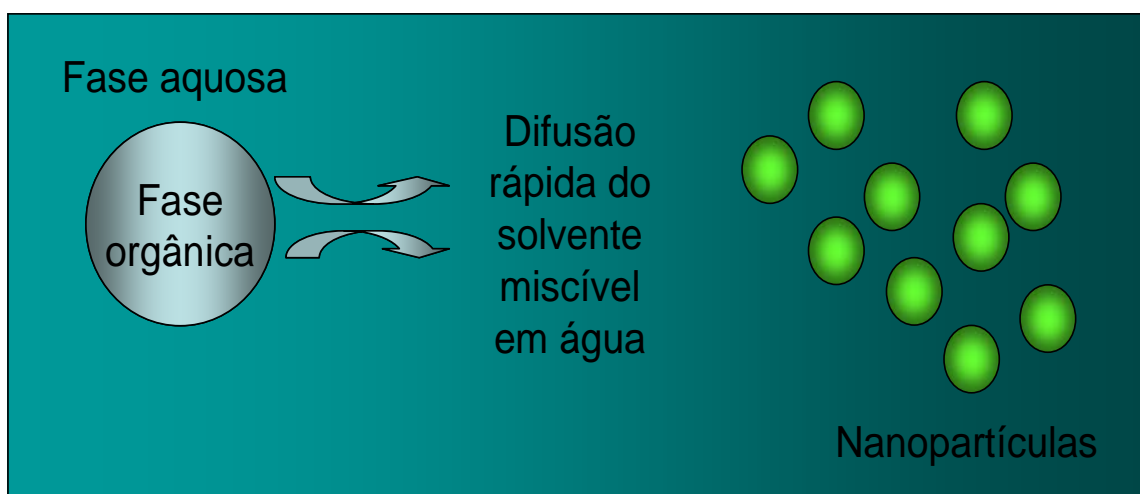


Figura 2.3. Esquema da emulsificação espontânea.

2.5. Técnica de policondensação interfacial

O método de policondensação interfacial foi descrito por Chang para a preparação de células artificial em 1960 (Chang & Granato, 1992). Ela envolve dois monômeros complementares na interface de duas fases imiscíveis. Na prática, se os dois monômeros têm valores de coeficientes de partição relativamente elevados e opostos, que pode ser assumido de forma a satisfazer os critérios de solubilidade implícita na definição de policondensação interfacial. Em um sistema, o local inicial da policondensação pode estar em um lado ou no outro lado da interface, em função dos coeficientes de partição dos dois monômeros no sistema de duas fases. Em outras palavras, a reação policondensação começa quando o produto das concentrações dos dois monômeros tem o valor mais elevado.

A técnica de policondensação interfacial envolve duas etapas (Bouchemal et al., 2002):

- Emulsificação: formação de emulsão O/A utilizando uma agitação mecânica durante alguns minutos. O monômero está delimitado nas gotas da emulsão.
- Polimerização: Um segundo monômero é adicionado à fase externa da emulsão e a etapa de policondensação ocorre na interface líquido-líquido da emulsão.

A etapa de emulsão é a de maior importância no processo clássico de policondensação interfacial, pois ela determina o tamanho e índice de polidispersão das partículas. Uma quantidade de energia mecânica é mantida durante alguns minutos para conseguir a etapa de emulsificação e uma distribuição de tamanho estável. Além disso, o agente ativo poderia difundir juntamente com o solvente para a fase aquosa, enquanto o rendimento do encapsulamento decresceria (Frère; Danicher; Gramain, 1998).

2.6. Técnica de policondensação interfacial combinada com emulsificação espontânea

A técnica de policondensação interfacial combinada com emulsificação espontânea trata-se de uma etapa do processo, onde uma fase orgânica (S_1) é composta por um solvente miscível em água, monômero, óleo, ativo e um surfactante lipofílico, onde essa fase orgânica é injetada em uma fase aquosa contendo o polímero e o emulsificante hidrofílico. O solvente miscível em água deve difundir-se para a fase aquosa (S_2), o óleo precipita como nano-gotas, o polímero e o monômero reagem na interface, formando uma membrana ao redor da nano-emulsão levando a formação da nanocápsulas (Montasser et al., 2001). A Figura 2.4 apresenta as etapas da técnica de policondensação interfacial combinado com a emulsificação instantânea.

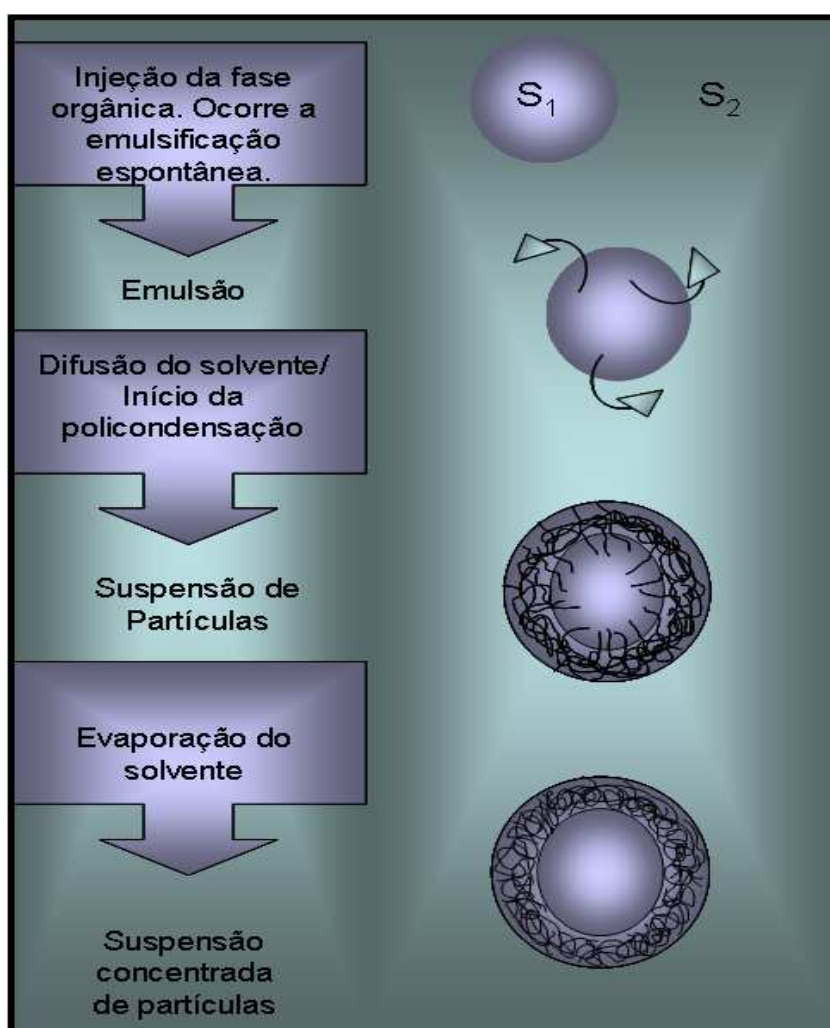


Figura 2.4. Mecanismo de preparação de partículas usando a técnica de policondensação interfacial combinada com emulsificação espontânea (Montasser et al., 2001).

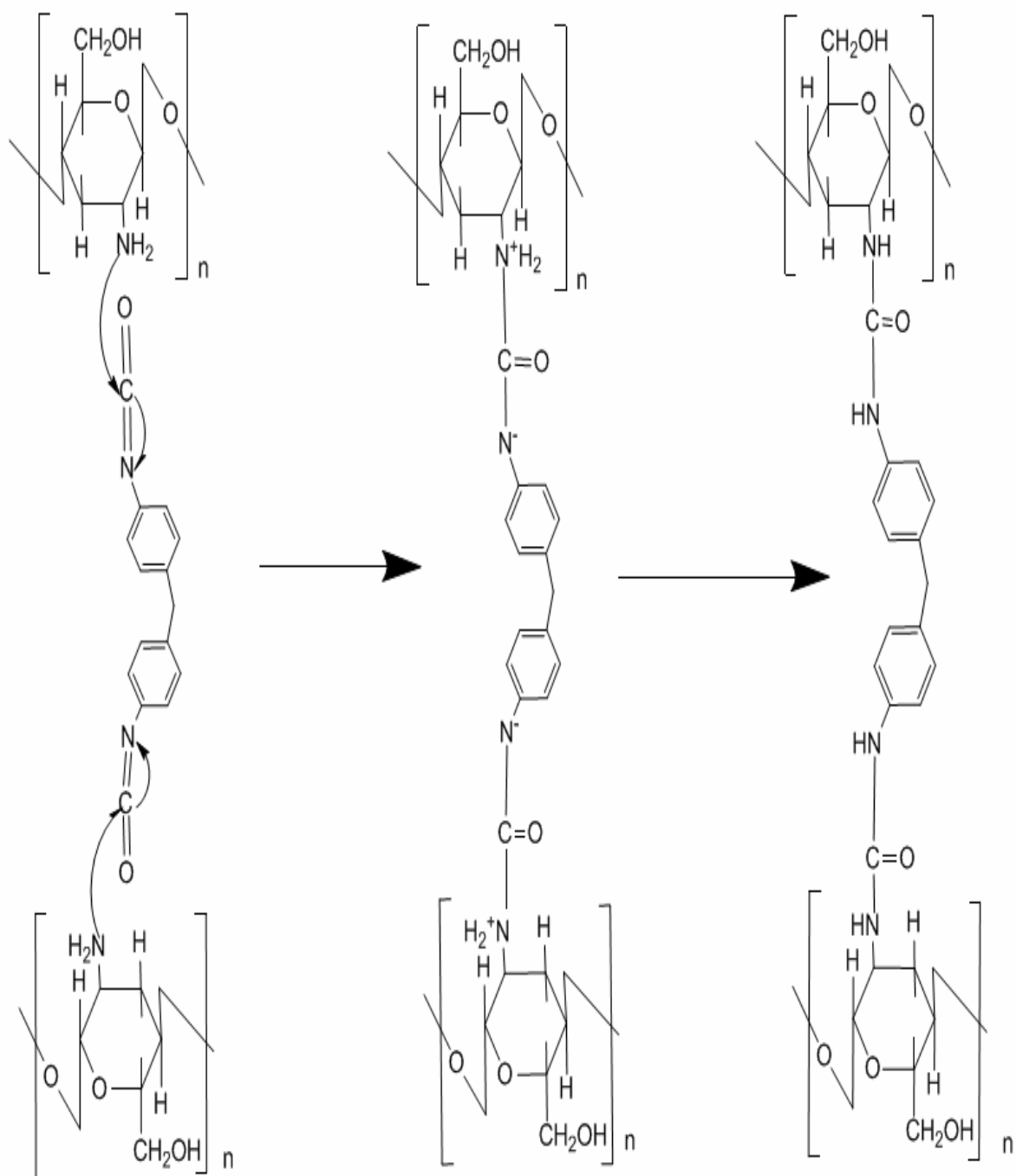
2.7. Reação de Reticulação Cruzada

A reticulação cruzada é uma reação química que une duas ou mais moléculas por ligações covalentes. Reagentes reticulantes contêm extremidades reativas para grupos funcionais específicos. O processo de reticulação introduz ligações cruzadas, ou seja, ligações entre moléculas lineares produzindo polímeros tridimensionais com alta massa molar. Com o aumento da reticulação, a estrutura se torna mais rígida (Clegg & Collyer, 1991).

A quitosana possui grupos funcionais amina e hidroxilas que fornecem excelentes sítios para reação da reticulação cruzada. Diversos reagentes, incluindo epóxi de glutaraldeído, goma de dialdeído, diisocianatos e compostos de natureza não-tóxicas têm sido utilizados como agentes reticuladores de quitosana. Entre estes estão os diisocianatos, uma das importantes classes de reticuladores de quitosana, pois os isocianatos possuem alta reatividade para com o grupo funcional amina, bem como para grupo de hidroxila (Santosh et al., 2007).

No caso do uso da técnica de policondensação interfacial os grupos de isocianato podem reagir com a água pela difusão do diisocianato para a fase aquosa formando um grupo de ácido âmico, que é instável e se dissocia em uma cadeia com grupo amina e dióxido de carbono (Jabbari & Khakpour., 2000). Esta reação encontra-se representado na Equação (1). A reação de reticulação cruzada esperada entre a quitosana e o MDI (4,4'-difetil metano diisocianato), encontra-se representado na Equação (2).





Equação (2) Reação de reticulação entre quitosana e MDI.

2.8. Mecanismos de liberação controlada de ativos

A tecnologia de liberação controlada caracteriza o sistema capaz de prover algum controle terapêutico, seja de natureza temporal, espacial ou ambos. Quando o veículo empregado promove apenas uma liberação em tempo prolongado podemos denominar como liberação sustentada. Tal tecnologia envolve diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir muito para o avanço da saúde humana. Os sistemas de liberação oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencionais (Duran; Marcato; Teixeira, 2007), tais como:

- Maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco;
- Diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação;
- Natureza e composição dos veículos, além de proteção contra mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (inativação prematura);
- Administração segura, sem reações inflamatórias locais;
- Diminuição do número de doses devido à liberação progressiva;
- Possibilidade de direcionamento a alvos específicos.

Ensaio para avaliar a liberação de um ativo na pele são de difícil interpretação, devido à natureza do estrato córneo e a interação com o veículo (Cross et al., 2001). Fármacos, quando encapsulados no interior de matrizes poliméricas, não estão prontamente disponíveis para o sistema biológico como quando em solução. Assim, o polímero tem que dissolver ou desintegrar para que o fármaco possa ser liberado, ou então o fármaco tem que dissolver e/ou difundir do interior da matriz. De qualquer modo, a liberação do fármaco para o meio fisiológico é estendida a um tempo muito maior comparado ao fármaco na sua forma livre, sendo esta característica um dos principais fatores para a pesquisa e desenvolvimento de sistemas microparticulados (Filho & Oliveira, 1999).

Os sistemas de liberação controlada podem ser classificados em diferentes classes, destacando-se: sistemas controlados por difusão, sistemas ativados por solvente, sistemas controlados quimicamente. Nos sistemas difusivos, o ativo pode estar

armazenado de duas formas diferentes: em reservatório (micro/nanocápsulas) ou em uma matriz (micro/nanoesferas). Neste tipo de sistema de liberação o ativo irá difundir do interior da partícula e as características físico-químicas do ativo e do polímero irão governar o perfil de liberação controlada. O controle difusivo pode ser otimizado com a utilização de materiais estímulos-resposta, que por meio de estímulos de temperatura, pH, força iônica, força elétrica, compostos químicos, enzimas e ultrassom aumentam ou diminuem a difusão do ativo pela matriz polimérica (Benita, 1996).

Polímeros biodegradáveis são aqueles em que a quebra das cadeias resulta em unidades monoméricas que podem ser eliminadas pelas vias metabólicas normais e essa quebra das cadeias pode ocorrer por ação de hidrólise (degradação hidrolítica) ou de enzimas (degradação enzimática). Sistemas erosivos ou degradáveis e, mais particularmente, aqueles que se degradam em meio biológico têm encontrado grande utilidade no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada (Lima & Rodrigues-Júnior, 1999).

A eliminação natural de um polímero após liberação total do ativo tem a vantagem de dispensar o inconveniente de acúmulo de polímero no organismo. Sendo assim, sistemas micro e nanoestruturados biodegradáveis e biocompatíveis (microesferas, microcápsulas, nanoesferas e nanocápsulas) têm sido desenvolvidos para liberação controlada de drogas (Soppimath et al., 2001; Benoit, 1996). O papel do polímero na formulação desses sistemas de liberação controlada é muito diferente do papel de um excipiente inerte em formulações farmacêuticas. O polímero influencia não apenas na cinética de liberação do agente ativo como esperado, mas também na estabilidade da droga, na toxicidade e na compatibilidade com o organismo vivo (Anderson & Shive, 1997).

A utilização destes sistemas em liberação controlada de fármacos envolve um amplo campo de estudos e tem reunido muitos esforços, atualmente, na área de nanopartículas. Estes esforços estão representados pelas novas estratégias para a veiculação de ingredientes ativos, os quais incluem aplicações importantes das ciências de polímeros, de surfactantes e de colóides.

2.9. Matérias - primas

2.9.1. Quitosana

A quitosana é um biopolímero do tipo polissacarídeo amino. Constitui a maior parte dos exoesqueletos dos insetos, crustáceos e parede celular de fungos. Por se tratar de um polímero natural biodegradável extremamente abundante e atóxico a quitosana tem sido proposta como um material potencialmente atraente para usos diversos. É solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação (adição de prótons) do grupo amino (NH_3^+), que confere propriedades especiais diferenciadas em relação às fibras vegetais (Goosen, 1996; Roberts, 1992).

A quitosana é geralmente obtida pela desacetilação da quitina, uma reação que pode ser executada em diferentes condições empregando diferentes álcalis. Entretanto, a execução da reação de desacetilação de quitina em temperaturas elevadas e empregando soluções concentradas de NaOH é o método mais usual para obtenção da quitosana (Campana & Desbrières, 2000).

Adicionalmente, a quitosana possui atividade bacteriostática, que reduz o crescimento de bactérias e outros tipos de microrganismos que entram em contato com a mesma. Outra propriedade importante é a reconhecida propriedade homeostática da quitosana que auxilia a cicatrização e estanca sangramentos em lesões cutâneas. Essa propriedade permite a criação de bandagens para estancar sangramentos, e hemorragias em ferimentos e incisões, protegendo de forma simultaneamente a área afetada de infecções. Devido a sua habilidade em formar filmes hidrofílicos (que absorvem água) sobre a pele, os cientistas estão investigando o uso da quitosana para o tratamento de queimaduras.

A quitosana possui várias características que a tornam atraente para a utilização em cosméticos. Ela se destaca por apresentar carga global positiva em pH biológico, ou seja, apresenta-se como um polímero policatiônico, enquanto a maioria dos biopolímeros apresentam-se negativamente carregados nas mesmas condições. As cargas positivas da quitosana interagem com tecidos negativamente carregados, tais

como pele e cabelo. Essa capacidade bioadesiva da quitosana é o principal fator para o seu uso em cosméticos (Polymar, 2007).

Nos produtos para a pele, a quitosana encontra aplicação, principalmente por conta da sua capacidade de formar camadas protetoras transparentes que apresentam a propriedade de reter a umidade, sem causar reações alérgicas. A quitosana apresenta-se ainda como uma matriz apropriada para outros ingredientes ativos, como pigmentos e fragrâncias em diversos tipos de cosméticos. O caráter hidrofílico e hidrofóbico da quitosana faz deste polímero um potente estabilizador de emulsões, o qual tem aplicação direta em produtos com baixo pH.

Em composições de produtos para tratamento da pele, a adição da quitosana aumenta a capacidade de retenção de umidade. Devido à presença de grupos amino, a quitosana reage quimicamente com facilidade com produtos oxidantes protegendo efetivamente as células epiteliais desses compostos. Outro aspecto muito importante é que substâncias que absorvem radiação ultravioleta e corantes podem ser facilmente ligadas de forma covalente aos grupos amino da quitosana (Polymar, 2008).

Em protetores solares, a quitosana reduz a perda dos filtros UV decorrente da ação da água ou suor. Essa propriedade melhora a tolerância da pele ao protetor e protege contra o ressecamento da mesma. A quitosana forma um filme sobre a pele que reduz a quantidade de luz ultravioleta absorvida pela pele, aumentando o fator de proteção solar. Em batons, a quitosana (utilizada nas concentrações de 0,05% a 1%) aumenta a resistência dos filtros UV e de substâncias lipofílicas ativas, protegendo a pele contra o ressecamento (Polymar, 2007).

2.9.2. Diisocianato – MDI

Os isocianatos são substâncias altamente reativas e que apresentam muitas aplicações em transformações sintéticas e processos industriais. Os isocianatos são altamente insaturados e reagem rapidamente com substâncias que possuem prótons ativos, como álcool e fenol. A aplicação de diisocianatos no campo da química de polímero tem tomado a dianteira para a preparação de vários tipos de polímeros de condensação como poliamidas, poliuretano e poliuréias (Tamami & Koohmareh, 2007). Os isocianatos possuem o grupo NCO que reage com compostos que possuam átomos de hidrogênio ativo, como os polióis, a água, os extensores de cadeia, etc. Todos os isocianatos usados comercialmente possuem no mínimo dois grupos funcionais. Deles, mais de 95% são aromáticos à base do TDI (31%) e dos diferentes tipos de MDI (66%). Temos ainda os isocianatos especiais como: 1,5-naftaleno diisocianato (NDI) usado em elastômeros sólidos e microcelulares de alto desempenho; bitolileno diisocianato (TODI) com propriedades superiores em altas temperaturas; e p-fenileno diisocianato (PPDI) com propriedades dinâmicas e termomecânicas superiores (Poliuretanos, 2008).

O 4,4'-difenil metano diisocianato, $\text{CH}_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{NCO})_2$, também conhecido como MDI é uma molécula simétrica possuindo grupos NCO com reatividades iguais como mostra a Figura 2.5. Os diisocianatos são classes importante de reagentes para a reticulação cruzada da quitosana porque os isocianatos possuem reatividade elevada para o grupo amina assim como para grupos de hidroxilas. Mas, o maior problema é que a maioria dos diisocianatos disponíveis no mercado tem reatividade elevada com água e é insolúvel em soluções aquosas ácidas (Jin; Song; Hourston, 2004).

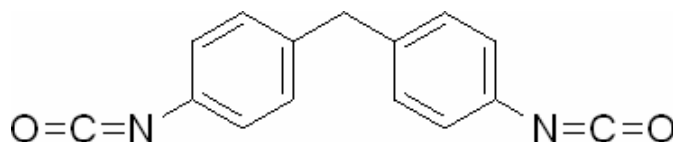


Figura 2.5. Fórmula estrutural do MDI.

2.9.3. Benzofenona-3

A benzofenona-3 também conhecida como oxibenzona, metanona e difenilcetona, é um derivado benzofenônico utilizado em aplicações tópicas como filtro solar químico, que necessita ser adequadamente solubilizada nas emulsões de forma a se evitar a recristalização e conseqüente perda e/ou diminuição da sua efetividade. Embora tipicamente as benzofenonas sejam absorvedores UVB (290 a 320 nm), a benzofenona-3 também absorve radiação UVA (320 a 360 nm), podendo ser considerado um filtro de largo espectro. É utilizada como co-absorvedor, em associação a filtros específicos de UVB (Martindale, 1999; Flor; Davolos; Correa, 2007). Sua fórmula estrutural está representada na Figura 2.6.

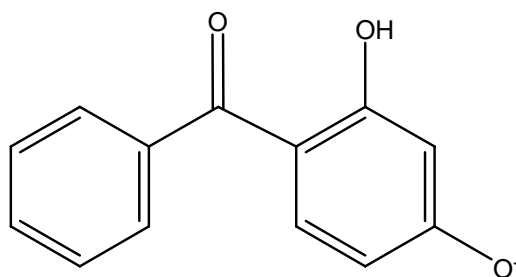


Figura 2.6. Fórmula estrutural da BZ-3.

As benzofenonas são as únicas classes de filtros solares formada por cetonas aromáticas. A deslocalização por ressonância é acrescida pela presença de um grupamento doador de elétrons nas posições *orto* e/ou *para*. O grupamento carbonila participa deste processo, sendo o grupamento receptor de elétrons (Shaath, 1997). A BZ-3 possui dois picos de absorção com λ máximos em 288 nm e 325nm, é fotolábil e pode ser oxidada rapidamente (Kullavanijaya & Lim, 2005).

Quando comparadas a outros filtros, as benzofenonas fazem ressonância mais facilmente requerendo menor energia quântica para a transição eletrônica como apresenta a Figura 2.7 e como a energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda ($E = hc/\lambda$), os compostos desta classe absorverão a energia com valores correspondentes de comprimento de onda acima de 320 nm (Skoog & Leary, 1992; Shaath, 1997).

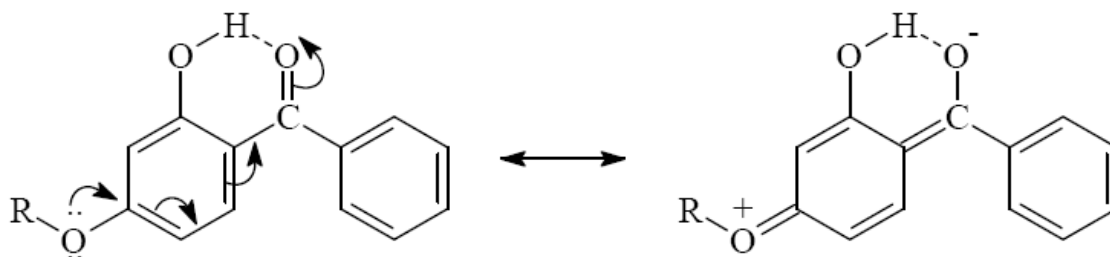


Figura 2.7. Estruturas de ressonância das benzofenonas (Shaath, 1997).

Embora seja um filtro amplamente utilizado, a BZ-3 pode causar reações adversas. A BZ-3 pode causar eritemas faciais em pessoas alérgicas a este composto (Nedorost, 2003), podendo causar também urticária logo após aplicação e uma dermatite tardia (Collins & Ferguson, 1994).

A ANVISA aprova o uso da BZ-3 como filtro solar em produtos para higiene pessoal, cosméticos e perfumes na concentração máxima de 10% e ressalta que para concentrações maiores que 0,5% deve-se incluir a seguinte advertência na rotulagem: contém oxibenzona (ANVISA, 2002), mas sua concentração de uso varia normalmente entre 2 a 6%. Possui fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_3$, massa molar de 228,2 g/mol, ponto de fusão entre 62 e 64 °C, dose letal (oral) menor que 5 g/kg (Yesudian, 2002; Flor; Davolos; Correa, 2007). Sua solubilidade de acordo com a comissão europeia é de:

- Água: 0.0037 g/l (20°C);
- Glicerina: < 0,01%;
- Etanol: 6,0%;
- Isopropanol: 10,0%;
- Butanol: 10,0%;
- Miglyol® 812: 14,0%;
- Acetona: > 20,0%;
- Clorofórmio: > 20,0%.

2.9.4. Miglyol

O Miglyol é um óleo neutro de aparência clara, ligeiramente amarelada praticamente incolor e de odor e sabor neutro, constituído de uma mistura de triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico. É um bom solvente, como outros óleos éster e possui baixa viscosidade. Não é sensível ao calor, mesmo em climas quentes, refrigeração não é necessária, têm um baixo teor de água, e, portanto, não é sensível a divisão hidrolítica e microbiana. O miglyol é solúvel a 20 ° C, nos seguintes solventes: Hexano, tolueno, éter etílico, acetato de etila, acetona, isopropanol, etanol a 96% (Sasol, 2008).

O miglyol possui as seguintes vantagens em comparação com óleos naturais:

- Alta estabilidade contra a oxidação;
- Permanece líquido a 0 ° C;
- Excelente espalhabilidade sobre a pele e boa absorção cutânea;
- Não inibe a respiração da pele;
- Promove excelente penetração;
- É emoliente (hidrata a pele e restaura a oleosidade perdida devido ao ressecamento);
- Boas características de solubilidade.

O ácido caprílico é o nome usual dado ao ácido graxo de cadeia normal aberta homogênea formada por oito carbonos, também conhecido como ácido octanóico. É encontrado em sua forma natural nos coqueiros e no leite materno. Consiste num líquido oleoso, de gosto desagradável e rançoso, e que é pouco solúvel em água. Possui a fórmula química $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$. A Figura 2.8 ilustra os triglicerídeos de ácido caprílico.

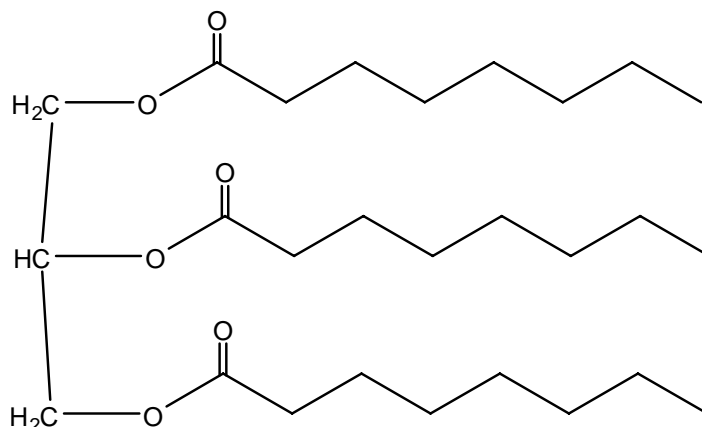


Figura 2.8. Triglicerídeos de ácido caprílico.

O ácido cáprico, também conhecido como ácido decanóico, é um ácido carboxílico de fórmula $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$. Sintetizado a partir de células da pele de caprinos, é responsável pelo odor característico da espécie, a Figura 2.9 ilustra o triglicerídeo de ácido cáprico.

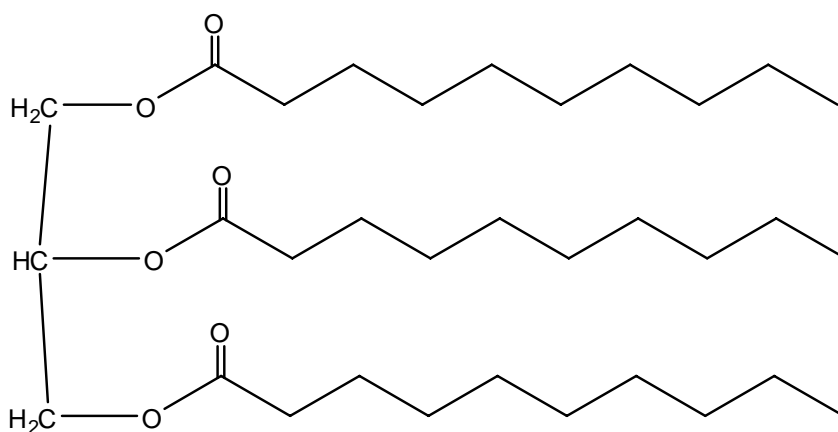
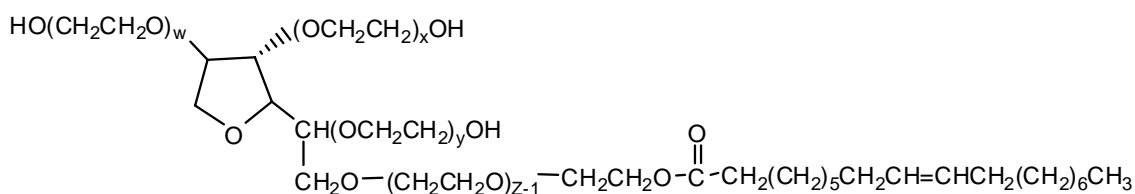


Figura 2.9. Triglicerídeos de ácido cáprico.

2.9.5. Tensoativos

2.9.5.1 Tween 80

O tween é composto por ésteres de sorbitan etoxilados. Conforme o tipo de ácido graxo de origem e grau de etoxilação pode ser obtido produtos com diferentes balanços hidrofílico-lipofílico (HLB), que se adaptam as diversas aplicações, mas no caso do tween 80 seu HLB é de 15,5. Sua estrutura se encontra representada na Figura 2.10.



Somatório de $w+x+y+z=20$

Figura 2.10. Estrutura molecular do Tween 80.

A característica hidrofílica da cadeia de polioxietileno faz do tween, tensoativos hidrofílicos (alto HLB), geralmente solúveis ou dispersíveis em água e empregados para obter emulsões do tipo óleo em água (O/A), como dispersantes ou solubilizantes de óleos e como cotensoativos em xampus. Estas características do tween são determinantes para suas aplicações em cosméticos, por exemplo, em cremes e loções. Nestes tipos de produtos a presença de grupos hidrofílicos e lipofílicos nas moléculas promove uma redução da tensão interfacial entre os componentes da formulação, permitindo a obtenção de emulsões estáveis (Mapric, 2008). O Tween 80 é praticamente não irritante possuindo uma toxicidade potencialmente muito baixa. A ingestão diária em decigramas por quilograma de peso corpóreo, correspondente a um adulto pesando 70 kg consumindo cerca de 1,75 mg de tween 80 diariamente sem qualquer risco de toxicidade potencial (Epic, 2008).

2.9.5.2 Span 80

O Span 80 ou Sorbitana monooleato é éster de sorbitana amplamente usado em produtos alimentícios e farmacêuticos. É um tensoativo não iônico (Epic, 2008). Sua estrutura molecular é representada pela Figura 2.11.

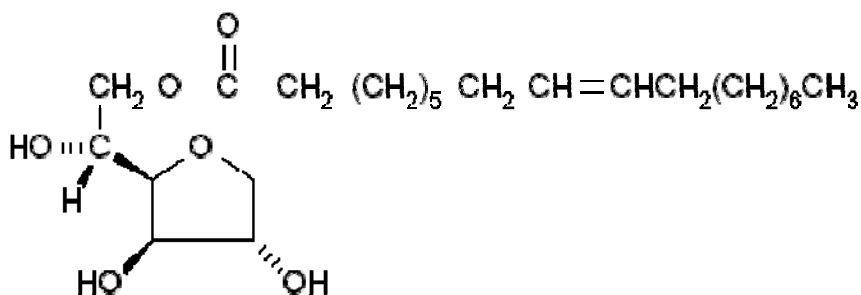


Figura 2.11. Estrutura molecular do Span 80.

O Span é tensoativo lipofílico, ou seja, exibem baixos valores de HLB. O caráter lipofílico faz com que este produto seja solúvel ou dispersível em óleo, favorecendo sua aplicação em emulsões do tipo água em óleo (A/O).

O Span e o Tween 80 têm uso previsto no “*Cosmetic Ingredient Handbook*” da CTFA e na Farmacopéia Americana (USP). O relatório sobre segurança dos produtos do “*Cosmetic Ingredient Review*” conclui que estes produtos são seguros para uso em formulações cosméticas. O Span e o Tween não são irritantes aos olhos e à pele, conforme testes realizados em coelhos e em seres humanos, porém em se tratando de produtos químicos puros recomenda-se, quando de seu manuseio, a utilização de EPIs como luvas de PVC, óculos de segurança e avental (Oxiten, 2008).

CAPÍTULO 3

ESTADO DA ARTE

Estado da arte

Durante uma palestra para a Sociedade Americana de Física em 1959, o físico americano Richard Feynman (1918-1988) apresentou seu projeto para uma nova pesquisa. Em sua apresentação intitulada “*There is plenty of room at the bottom*”, ou em português: “Há muito espaço lá em baixo”, Feynman sugeriu meios para desenvolver a habilidade de manipular átomos e moléculas. Segundo o autor, “Os princípios da física não falam contra a possibilidade de se manipular as coisas átomo por átomo”. Feynman afirmou que há tanto lugar nessa pequena escala que, dominada a manipulação dos átomos individualmente, seria possível registrar tudo o que a humanidade escreveu até a presente data em um cubo de um décimo de milímetro de lado: ou seja, em um grão de poeira.

O termo *Nanotechnology* foi criado em 1974, na Universidade de Ciências de Tóquio pelo professor Norio Taniguchi para descrever a manufatura precisa de materiais com tolerâncias nanométricas. Na década de 80, o termo foi reinventado e sua definição expandida pelo professor K. Eric Drexler do *Massachusetts Institute of Technology - MIT*, mais especificamente em seu livro “*Engines of Creation – The Coming Era of Nanotechnology*”, de 1986. Sua tese de doutorado “*Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing and Computation*”, publicado em 1992 reacendeu o interesse pela tecnologia no meio científico mundial. Na Figura 3.1. estão listados eventos importantes em nanotecnologia.

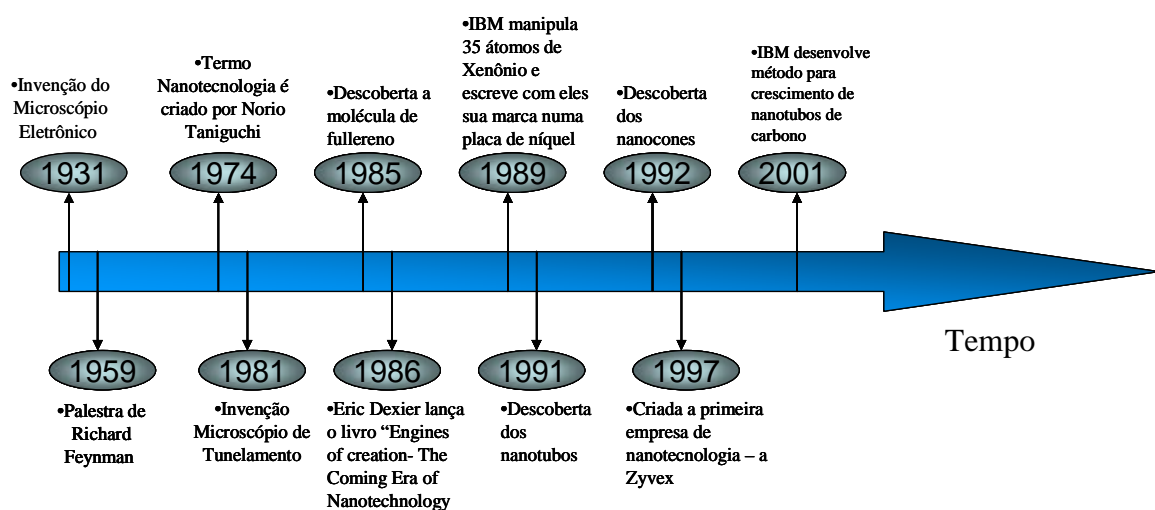


Figura 3.1. Principais fatos históricos em nanotecnologia.

A nanotecnologia farmacêutica teve início em meados da década de 1970 com os lipossomas como carregadores de fármacos hidrofílicos ou lipofílicos. Em 1980 surgiram as nanopartículas poliméricas carreadoras de fármacos lipofílicos, principalmente empregando polímeros biodegradáveis. Na década de 1990 surgiram as nanopartículas lipídicas sólidas. Cada um desses sistemas apresenta peculiaridades que devem ser consideradas na escolha do sistema de liberação. Mas foram as emulsões os primeiros sistemas de liberação de ativos cosméticos na pele, e constituem uma dispersão composta por gotículas de um líquido, distribuídas em um veículo no qual é imiscível, a fase dispersante, por intermédio de um tensoativo (Ansel; Popovich; Allen, 2000). Deve-se destacar que o desenvolvimento de novos sistemas de liberação em cosméticos foi influenciado principalmente pelo estudo de novos tensoativos sintéticos e pela maior compreensão da estrutura e função da pele em relação à absorção percutânea, tendo sido intensamente estudados, ao longo dos anos (Nacht, 1995; Magdassi, 1997).

A área de cosméticos vem empregando nanotecnologia nos mais diversos produtos, como: partículas metálicas para aumento de brilho em maquiagens; nanoemulsões para cabelos que são hidratantes mais promissores; proteção de ativos contra a degradação, por exemplo no encapsulamento da vitamina C; liberação em camadas mais profundas da pele de ativos anti-rugas; melhoria da textura do creme e formação de um filme mais eficiente de protetores solar, como exemplo, o emprego de nanopartículas de dióxido de zinco. Tais produtos, no entanto, devem ser cuidadosamente investigados anteriormente à introdução no mercado, uma vez que tais sistemas nanoparticulados apresentam inúmeros benefícios, mas também podem ter algum efeito danoso. As nanopartículas de dióxido de zinco em proteção solar, por exemplo, não devem penetrar até camadas mais profundas da pele, uma vez que poderia ocasionar reações inclusive de danos ao DNA (Nanobiotecnologia, 2008).

Em 1891, Hammer publicou uma revisão em que ele descrevia a influência da luz sobre a pele. Ele reuniu diversas evidências de que a queimadura solar era devida à radiação UV e foi o primeiro a recomendar o uso de filtros solares químicos: “Materiais que impedem a radiação UV de atingir a pele protegendo-a contra os eritemas solares” (Urbach, 2001).

Os filtros solares têm seu uso relatado no cenário mundial a partir de 1928, quando foi lançada nos Estados Unidos uma emulsão contendo dois filtros solares químicos, o salicilato de benzila e o cinamato de benzila. Durante a II Guerra Mundial o exército americano fez uso de vários produtos de natureza física e química, o que acabou resultando em uma relação de produtos aprovados e suas concentrações de uso, entre estas substâncias destacam-se: ácido paminobenzóico PABA (3 %), salicilato de etilhexila (5 %), salicilato de homometila (8 %) e salicilato de dipropilenoglicol (4 %) (Shaath, 1997).

Alvarez-Román et al., (2001) elaboraram o primeiro estudo de encapsulação de um filtro solar. Eles estudaram nanocápsulas contendo metoxicinamato de octila (MCO), um filtro solar lipofílico e avaliaram o perfil de liberação das mesmas incorporadas em um gel, bem como sua habilidade em proteger a pele de porco contra a radiação UVB. As nanocápsulas proporcionaram uma liberação contínua da substância no modelo utilizando a pele de porco. A finalidade do estudo foi constatar o efeito das nanocápsulas na fotoproteção. Foi observado que a proteção contra eritema induzido por radiação ultravioleta foi expressivamente maior ($p < 0.05$) a partir do gel contendo nanocápsulas, as quais foram produzidas utilizando poli (epsilon-caprolactona) pelo método de deposição interfacial. A taxa de encapsulação foi alta ($99 \pm 1\%$ da concentração inicial de MCO), sendo obtidas nanocápsulas com um diâmetro médio de 300 nm. Segundo os autores, os resultados apresentados sugerem que as nanopartículas, devido à sua alta área superficial específica, são capazes de cobrir eficientemente a superfície da pele e melhorar a habilidade do protetor solar em inibir o eritema. Os pesquisadores destacaram que os resultados deste estudo enfatizam o potencial de nanocápsulas como novos sistemas de distribuição de substâncias ativas na pele.

Em outro estudo desenvolvido por Alvarez-Román et al., (2004) avaliou-se a retenção do MCO no estrato córneo de pele suína através da técnica de “*tape stripping in vitro*”. A quantidade de filtro solar químico retida no estrato córneo foi 3,4 vezes maior quando vinculado a nanocápsulas de poli(ε-caprolactona) do que na forma livre. Após 6 horas de experimento o filtro solar não foi detectado no compartimento receptor. Neste mesmo estudo avaliou-se, através de microscopia confocal, a distribuição de uma sonda fluorescente nanoencapsulada e livre. Observou-se uma melhora na distribuição da sonda quando liberada a partir das nanopartículas, porém os autores afirmam que as

imagens não possibilitam definir se a sonda, melhor distribuída, é originalmente nanoencapsulada ou livre.

Em outro estudo sobre nanocápsulas contendo MCO, Jiménez et al., (2004) compararam o desempenho do ativo na forma livre e na forma encapsulada, sendo preparadas quatro emulsões A/O e O/A contendo MCO. A técnica utilizada para preparar as nanocápsulas foi a de deposição interfacial, utilizando poli (epsilon-caprolactona), e as formulações foram aplicadas em pele de porco num estudo *in vitro*. As nanocápsulas obtidas apresentaram um diâmetro médio de 374 nm e uma alta percentagem de encapsulação (97,52%). Os autores verificaram que as nanocápsulas diminuíram a penetração cutânea do MCO, retendo esta substância na superfície da pele, o que é fundamental para uma efetiva fotoproteção. Além disso, proporcionaram uma liberação contínua aumentando, conseqüentemente, o tempo de contato do ativo com a superfície da pele. Diante dos resultados, os pesquisadores salientaram que emulsões contendo nanocápsulas podem ser utilizadas como carreadores de moléculas ativas, sendo novos tipos de sistemas de aplicação de substâncias na pele. Os dados demonstram que a aplicabilidade das nanocápsulas em produtos destinados à fotoproteção representa um vasto potencial de mercado.

O método de obtenção de nanocápsulas e sua penetração cutânea foram avaliados por Olvera-Martínez et al., (2005). Neste estudo os autores obtiveram nanocápsulas de MCO através do método de emulsificação-difusão com diâmetros entre 400 e 615 nm e nanoemulsão com aproximadamente 160 nm. Após caracterização dos nanocarreadores a penetração cutânea do filtro solar foi avaliada, a partir das nanocápsulas, nanoemulsão e emulsão convencional, através da técnica de “*tape stripping in vivo*”, determinando a quantidade de MCO retida no estrato córneo. A incorporação do MCO em nanoemulsão aumentou sua penetração quando comparada ao ativo incorporado em nanocápsulas ou na emulsão convencional. Os autores atribuem o aumento da penetração do ativo incorporado na nanoemulsão ao tamanho das gotículas e a flexibilidade das mesmas quando comparadas às nanocápsulas, que apresentaram diâmetro médio maior além de serem estruturas mais rígidas.

Para avaliar o local de liberação do MCO a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em um gel de hidroxietilcelulose e sua penetração cutânea, Weiss-Angeli (2007), desenvolveu um novo sistema de extração do ativo retido na pele nos

experimentos de penetração cutânea utilizando célula de difusão de Franz. Neste trabalho dois protocolos foram empregados, no primeiro o MCO foi extraído das diferentes camadas da pele em estudo utilizando um solvente de extração convencional, acetonitrila, possibilitando o doseamento do ativo livre e encapsulado, pois este solvente dissolve as nanocápsulas. O segundo protocolo empregado utilizou como solvente de extração o miristato de isopropila, que não solubiliza o polímero, mas solubiliza o filtro solar livre, e posterior ultracentrifugação, separando as nanocápsulas presentes no sistema e possibilitando o doseamento do ativo livre. Os resultados demonstram não haver diferença entre as quantidades doseadas através dos dois protocolos nas camadas mais profundas da pele. Entretanto, na superfície cutânea houve uma diferença significativa entre a quantidade de filtro livre e total, indicando haver liberação do ativo a partir das nanocápsulas acumuladas nesta camada da pele. Os autores concluem que esse efeito pode ser explicado pelo reduzido tamanho das nanocápsulas e pela hidrofobicidade do polímero, poli(ϵ - caprolactona), ambos fatores que contribuem para o acúmulo de nanocápsulas na superfície da pele.

Os mecanismos de permeação de nanopartículas poliméricas preparadas com poli(ϵ -caprolactona)-b-poli(etilenoglicol) contendo minoxidil e o efeito do tamanho das nanopartículas sobre a taxa de permeação do fármaco foram avaliados por Shim et al., (2004). Foram preparadas nanopartículas com diâmetros médios de 40 e 130 nm, que foram avaliadas através de célula de difusão de Franz utilizando-se como membrana de estudo a pele de “porcos da índia” com e sem pêlos. Os resultados sugeriram que, para as membranas com pêlos, as partículas de menor tamanho facilitaram amplamente a permeação do minoxidil para o compartimento receptor, aumentando 1,5 vezes a quantidade permeada até a epiderme e 1,7 vezes a quantidade no fluido receptor, quando comparadas às partículas maiores. No entanto, para as membranas sem pêlos, a permeação do fármaco não foi dependente do tamanho de partícula, sugerindo que a liberação do minoxidil a partir das nanopartículas pode acontecer, principalmente, nos folículos pilosos.

Nanocápsulas contendo o antisséptico clorexidina aumentam o tempo de contato desta substância com a pele, como verificaram Lboutounne et al., (2002) utilizando pele de porco. As nanoestruturas foram preparadas utilizando poli(epsilon-caprolactona), através do método de deposição interfacial, e proporcionaram uma liberação contínua da

substância por pelo menos 8 horas. Houve uma alta taxa de encapsulação do antisséptico, corroborando com Jiménez et al., (2004). 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 *Staphylococcus epidermidis*.

Perioli et al., (2006) utilizaram a TG e DSC para caracterizar a inclusão do filtro solar, ácido sulfônico fenibenzilimidazol, em argila aniônica e concluíram que as hidrotalcitas (hidróxidos duplos lamelares com elevada capacidade de troca aniônica) foram boas matrizes para a incorporação de o filtro solar. Já Scalia; Villani; Casolari (1999) utilizaram a análise térmica, DTA e TGA, além de outros métodos analíticos para a comprovação da inclusão de filtro solar, 2-etil-hexil-p-dimetilaminobezoato, na cavidade de ciclodextrina.

Pérez et al., (2004) realizaram estudo termoanalítico de substâncias que atuam como filtros solares, isoladas e na forma de misturas, com objetivo de avaliar o comportamento térmico por TG e por DSC. A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que a decomposição térmica dos filtros solar despertou o interesse para posterior estudo por TG isotérmica, visando à determinação da meia-vida destes materiais. A técnica forneceu informações importantes quanto ao comportamento térmico dos filtros solares.

A análise térmica, juntamente com outros parâmetros analíticos, reologia, espectrofotometria no ultravioleta (UV) e cromatografia líquida de alta eficiência, foram utilizados no estudo de estabilidade de emulsões contendo filtros solares que absorveram nas regiões do UV e infravermelho. No trabalho realizado por Pérez et al., (2004), a DSC, TG e DTG foram utilizadas para verificar o comportamento térmico dos filtros solares, benzofenona-3 e p-metoxinamato de octila (Santoro et al., 2000).

Com relação à estabilidade das emulsões, Silva; Nacco; Matos (1994) propuseram a aplicação da análise térmica na avaliação de emulsões O/A, sendo abordada a liberação de água a partir da elaboração de curvas TG, uma vez que a temperatura de liberação da água é uma primeira característica representativa da força de ligação da água. Foi sugerida a técnica para o desenvolvimento de formas de

liberação controlada de água e a investigação de transição de fase e estabilidade de formulações.

Já os estudos com a quitosana se destacam os publicados por Tharanathan & Prashanth (2007) que realizaram uma extensa pesquisa sobre a quitina e a quitosana, pesquisando suas modificações e aplicações. Neste estudo ficou comprovado que as áreas de aplicações da quitina/quitosana e seus derivados são ilimitados, uma vez que estes podem ser obtidos na forma de fibras, microesferas e nanopartículas. São mencionadas aplicações na área de alimentos e nutrição, ciência dos materiais, ciências médicas e farmacêuticas, microbiologia, imunologia, dentre outras.

Moura; Aouada; Mattoso (2008) desenvolveram nanopartículas através da polimerização do ácido metacrílico na presença da quitosana, neste estudo foram analisados o diâmetro da partícula que ficou entre 99 a 218nm, potencial zeta que diminui com o aumento do pH, infravermelho, ressonância magnética nuclear e microscopia eletrônica de transmissão. As nanopartículas obtidas apresentaram uma morfologia bem homogênea além de um índice de polidispersão baixo. Foi observado também que o diâmetro da partícula dependia da concentração da quitosana durante o método de preparação: quanto maior a concentração de quitosana menor seria a partícula.

Jiang et al., (2006) estudaram a aplicação de um sistema de dispersão de nanopartículas de quitosana em queimaduras da pele. Eles evidenciaram que o sistema de dispersão de nanopartículas de quitosana possuía efeitos curativos e reduzia o tempo de cura e cicatrização, sugerindo que este sistema poderia ser desenvolvido para uma nova perspectiva médica. O filme protetor de quitosana permite a passagem de oxigênio permitindo uma rápida cicatrização. Além disso, após a cicatrização do ferimento, não havia necessidade de remover a quitosana, pois as enzimas presentes nos tecidos epiteliais degradam o polímero permitindo a sua absorção pelo organismo. Como benefício adicional, evita-se danos na área cicatrizada causados pela remoção da bandagem.

As benzofenonas começaram a ser utilizadas como filtros solares no final da década de 50. A benzofenona-3 (BZ-3) (2-hidroxi-4-metoxibenzofenona) ou oxibenzona, um composto lipofílico, é o mais utilizado dessa categoria nos Estados

Unidos (Nedorost, 2003). Além dos problemas dermatológicos associados à BZ-3, algumas pesquisas têm levantado a possibilidade de ações adversas sistêmicas da BZ-3. Hayden et al., (1997) quantificaram a absorção sistêmica da BZ-3 em voluntários humanos. Após 12 horas de ensaio, 1% a 2%, da quantidade de BZ-3 aplicada na pele, foi detectado na urina. Nesta pesquisa foram utilizadas quantidades de filtro seis vezes maiores que as utilizadas para determinação do fator de proteção solar (Hayden et al., 1997).

Luppi et al., (2003) estudaram a permeação, através de célula de difusão de Franz, da BZ3 nanoencapsulada, utilizando como polímero o álcool polivinílico ligado a diferentes ácidos graxos com dois graus de substituição (40 e 80 %), visando aperfeiçoar uma formulação que limite a permeação do ativo através da pele até a circulação sistêmica. A natureza dos substituintes e o grau de substituição influenciaram no tamanho de partícula e na habilidade de interação do ativo com a pele. As nanopartículas obtidas com baixo grau de substituição apresentaram melhor localização do ativo na epiderme, entretanto às obtidas com alto grau de substituição preveniram a absorção percutânea da BZ3.

Simeoni et al., (2006) estudaram a influência da complexação da BZ3 com hidropropil- α -ciclodextrina (HP- α -CD) e sulfobutileter- β - ciclodextrina (SBE- β -CD) na penetração cutânea do filtro químico. Os estudos de penetração foram conduzidos em células de difusão de Franz. Os resultados demonstram que a complexação da BZ3 em HP- α -CD não alterou seu perfil de penetração, porém a complexação com SBE- β -CD reduziu significativamente a penetração percutânea (quantidade detectada tanto no estrato córneo, quanto epiderme e derme), minimizando assim o contato do filtro solar com a pele e os riscos toxicológicos associados a ele. Segundo os autores este aspecto é particularmente importante em preparações comerciais contendo BZ3, visto que estas contêm elevadas concentrações do filtro solar e são aplicadas repetidas vezes em grandes extensões de pele permanecendo por um longo período de tempo.

Em um estudo de segurança da BZ-3, após administração dérmica em ratos, a BZ-3 formulada em uma base oleosa foi aplicada na dose de 100 mg/Kg de peso corpóreo, duas vezes ao dia, por quatro semanas. Baseando-se nos seus resultados bioquímicos, hematológicos e patológicos sugeriu-se que a BZ-3 não é tóxica nas condições da pesquisa (Okereke et al., 1995).

As nanopartículas poliméricas têm sido extensivamente estudadas como carreadores de fármacos nos campos farmacêuticos e médicos, porque eles mostram-se promissores como sistemas de entrega de droga e de liberação controlada ou sustentada. Foram desenvolvidos vários métodos para obtenção de nanopartículas durante as últimas duas décadas, classificadas de acordo com a formação da partícula: se envolve uma reação de polimerização, surge de uma macromolécula ou de um polímero pré-formado. Reis et al., (2006) fez uma revisão destes métodos onde foram descritos os métodos de preparação mais importantes para a obtenção de nanopartículas, especialmente os que fazem uso de polímeros naturais. As vantagens e desvantagens foram apresentadas facilitando a seleção do método de encapsulação apropriado, de acordo com a aplicação específica.

Segundo Bouchemal et al., (2004) (a), o alfa-tocoferol (vitamina E) é largamente utilizado como antioxidante em muitos cosméticos, mas apresenta uma rápida degradabilidade, devido à sua sensibilidade à luz, ao calor e ao oxigênio. Os pesquisadores relatam que carreadores capazes de encapsular substâncias ativas, tais como nanocápsulas, são uma oportunidade atraente para proteger moléculas contra a degradação. Este grupo de pesquisa produziu nanocápsulas de 150 a 500 nm encapsulando o alfatocoferol, utilizando o polímero poliuretano e poli (éter uretano), através de uma nova técnica que engloba a policondensação interfacial (Montasser et al., 2001) combinada com emulsificação espontânea. Os autores verificaram que o método oferece numerosas vantagens, quando comparado à técnica clássica de policondensação interfacial. Eles destacam que uma das vantagens destes sistemas nanométricos está em apresentar uma enorme área superficial, o que torna tais dispositivos convenientes para importantes aplicações cosméticas e farmacêuticas, bem como formulações tópicas de substâncias lipofílicas encapsuladas para uma liberação homogênea.

As nanoemulsões consistem em dispersões de óleo/água, obtendo gotículas de diâmetro entre 100-600 nm. No trabalho elaborado por Bouchemal et al., (2004) (b), as nanoemulsões foram preparadas pelo mecanismo de emulsificação espontânea, que se inicia quando uma fase orgânica e uma fase aquosa são misturadas. A fase orgânica é uma solução homogênea de óleo, surfactante lipofílico solvente miscível em água, a fase aquosa consiste de um surfactante hidrófilo e água. Um estudo experimental de

otimização do processo de obtenção da nanoemulsão baseado na distribuição de tamanho foi executado. Os resultados mostraram que a composição da fase orgânica inicial era de grande importância no processo de emulsificação espontânea, e também para as propriedades físico-químicas das emulsões obtidas. Primeiramente, o HBL da nanoemulsão foi superior a 8, obtendo gotas de diâmetro de 171 nm. Segundo, a concentração do solvente miscível em água (acetona) e seu efeito no processo de emulsificação foram estudados, verificando que quanto mais polar o solvente menor será o diâmetro da partícula. A etapa de emulsificação representa um importante passo na obtenção de partículas poliméricas usando nanoprecipitação ou policondensação interfacial combinado com emulsificação espontânea.

Bouchemal et al., (2006) em um outro estudo, obtiveram partículas nanométricas que possuíam um núcleo oleoso e uma parede polimérica (nanocápsulas), combinando em uma única fase o processo de emulsificação e uma reação de polimerização de interfacial. A emulsificação espontânea produziu uma dispersão de gotículas de óleo entre 100-400 nm de diâmetro, onde, logo em seguida, a reação de policondensação interfacial aconteceu. O processo foi aperfeiçoado considerando à escolha do α -tocoferol como óleo e fez destaque à presença de monômeros dentro da fase aquosa e da fase orgânica e a conversão deles em polímero. A causa principal de dificuldades era a grande concentração de monômeros de diamina na fase aquosa que fez as gotículas de óleo imediatamente instável ocorrendo agregação depois da formação. Foi observado que, uma vez que o emulsificante tenha sido adsorvido e a polimerização completada, as suspensões finais de nanocápsulas permaneceram estáveis por longos períodos. Uma população secundária de partículas micrométricas que coexistiram com as nanocápsulas estava presente em vários casos onde era desfavorável sua presença, considerando a aplicação delas como um sistema de entrega de droga para aplicações cosméticas.

Na busca por material científico indexado em bancos de dados, foram encontrados poucos trabalhos direcionados especificamente a nanocápsulas em cosméticos. A escassez de informações técnico-científicas talvez possa ser explicada pelo fato de que a utilização de nanocápsulas em cosméticos é bem mais recente que o uso das mesmas em fármacos, para os quais já há um número bem maior de estudos publicados.

CAPÍTULO 4

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4. Metodologia experimental

4.1. Materiais

4.1.1. Equipamentos

- ✓ Reator mecanicamente agitado de 200ml;
- ✓ Condensador de allihn tipo bola;
- ✓ Termômetro digital portátil tipo espeto, modelo TM879, Marca Equitherm, faixa de temperatura -50 °C a 300 °C, com precisão de + 1 °C;
- ✓ Centrífuga Selecta, Modelo Medifriger-BL;
- ✓ Banho termostático Haake DC 30;
- ✓ CLAE Shimadzu, Modelo CBM-20A;
- ✓ Espectrofotômetro Cintra, Modelo Cintra 10E;
- ✓ Zetamaster (Medidor de potencial Zeta) - Marca Malvern, Modelo Zetamaster S;
- ✓ Incubadora Nova Ética, Modelo 430;
- ✓ DSC- Marca Mettler Toledo, Modelo DSC822;
- ✓ TG - Marca Mettler Toledo, Modelo SDTA851;
- ✓ Balança de precisão Marca Mettler Toledo, Modelo XS205;
- ✓ Espectrômetro Perkin Elmer, Modelo Spectrum One;
- ✓ Turbiscan Lab - Versão Expert;
- ✓ Beckman Coulter - LS230 Laser Diffraction Particle Size Analyzer;
- ✓ Microscópio óptico Nikon Eclipse, Modelo E400 POL;
- ✓ Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol, Modelo JSM-6360LV;
- ✓ Microscópio Eletrônico de Transmissão Philips, Modelo CM120;
- ✓ pHmetro DIGIMED, Modelo DM 21;
- ✓ Ultrassom Elma, Modelo T460;
- ✓ Balança analítica Ohaus, Modelo E12140

4.1.2 Reagentes

- ✓ Quitosana de baixo peso molecular - Sigma-Aldrich;
- ✓ Diisocianato - Sigma-Aldrich;
- ✓ Span 80 - Oxiteno;
- ✓ Tween 80 - Sigma-Aldrich;
- ✓ Benzofenona-3 - Delaware;
- ✓ Água ultrapura.
- ✓ Acetona - Quimex;
- ✓ Ácido acético glacial - Sigma-Aldrich;
- ✓ Miglyol cedido gentilmente pela Dhaymers Química Fina;
- ✓ Óleo mineral NP-35 ANIDROL;
- ✓ Etanol - Quimex;
- ✓ Isopropanol - Quimex;
- ✓ Metanol grau CLAE-Merck;

4.2. Ensaio preliminares

Nos ensaios preliminares foram estudadas, de forma randômica, as concentrações das matérias primas e algumas variáveis de processo, variando seus valores dentro do sistema. Obteve-se assim uma série de informações importantes para o estudo de obtenção das micro/nanopartículas, tais como: tipo de solvente utilizado, os limites máximos e mínimos para um planejamento experimental das variáveis estudadas, temperatura de execução dos ensaios, intensidade de agitação mecânica do sistema e a solubilidades da BZ-3 em Miglyol.

4.3. Planejamento experimental

Os ensaios para obtenção de partículas quitosana/MDI, conforme o planejamento experimental, foram realizados em um reator mecanicamente agitado acoplado a um banho termostático com controle de temperatura e a um condensador.

O sistema estudado consistiu de uma fase orgânica e uma fase aquosa, com as seguintes composições:

1. Fase orgânica: monômero (MDI), solvente (acetona) e tensoativo (Span 80).
2. Fase aquosa: quitosana, tensoativo (Tween 80) e ácido acético.

Os intervalos deste estudo de sensibilidade paramétrica foram escolhidos de modo a abranger grande parte dos estudos apresentados na literatura. Para determinação das condições experimentais que encontrassem o menor diâmetro de partículas com máximo consumo de monômero, um planejamento experimental do tipo 2^3 resultando em 8 experimentos mais a réplica do ponto central em cada caso, totalizando 11 experimentos foi elaborado (Tabela 4.1). As variáveis independentes analisadas foram às seguintes:

- A. concentração de quitosana (0,1 a 0,5% m:m)
- B. concentração do diisocianato (0,1 a 0,25% m:m)
- C. razão mássica entre fases orgânica e aquosa (1:2 e 1:5).

Parâmetros fixados : tipo de solvente (acetona) e tempo de reação (4h).

Tabela 4.1. Planejamento experimental para obtenção de partículas quitosana/MDI.

Ensaio	A	B	C
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

A= MDI; B = quitosana; C = razão de fases orgânica: aquosa

A análise do planejamento experimental foi realizada através do software STATISTICA. Visando obter uma comparação direta do efeito de cada variável, as variáveis independentes foram normalizadas no intervalo de -1 a +1. O nível -1 representa o limite inferior e o nível +1 representa o limite superior de cada variável.

Do planejamento experimental, determinou-se as condições de formulação para a etapa seguinte do trabalho que consistiu na incorporação da substância ativa a encapsular, a benzofenona (BZ-3) e um outro componente destinado a formar um núcleo oleoso para retenção da BZ-3 no interior das partículas.

4.4. Metodologia para obtenção das partículas de quitosana/MDI

As suspensões de partículas contendo BZ-3 e Miglyol foram preparadas segundo método de polimerização interfacial combinado com emulsificação espontânea descrito anteriormente na literatura (Montasser et al., 2001). A Figura 4.1 apresenta o fluxograma das etapas de obtenção das partículas.

1. A solução orgânica (S_1) é composta pelo MDI, a Benzofenona-3, o tensoativo (Span 80), e o solvente miscível em água (acetona) e Miglyol. Primeiramente o MDI é solubilizado sob agitação mecânica na acetona; a seguir, adiciona-se BZ-3, Span 80 e Miglyol no sistema.
2. A fase aquosa (S_2) é formada por água ultrapura, quitosana de baixo peso molecular e tensoativo Tween 80. A quitosana é solubilizada por 24h em água ultrapura sob agitação mecânica com pH ajustado para 4,0 com ácido acético glacial. Após as 24 h a solução aquosa de quitosana é filtrada em uma peneira de 400 mesh.
3. Injeção da fase orgânica (S_1) na fase aquosa (S_2) sob agitação mecânica de 2400 rpm, a partícula precipita instantaneamente, e a membrana principal é formada imediatamente. Nessa etapa ocorre a difusão do solvente da fase orgânica para fase aquosa.
4. A agitação mecânica é mantida durante 4 h à temperatura de 50°C, a fim de assegurar o crescimento da parede polimérica (etapa de maturação).

5. A totalidade do solvente (acetona), bem como uma parte da água é removida por evaporação durante 10 min sob ação de vácuo.

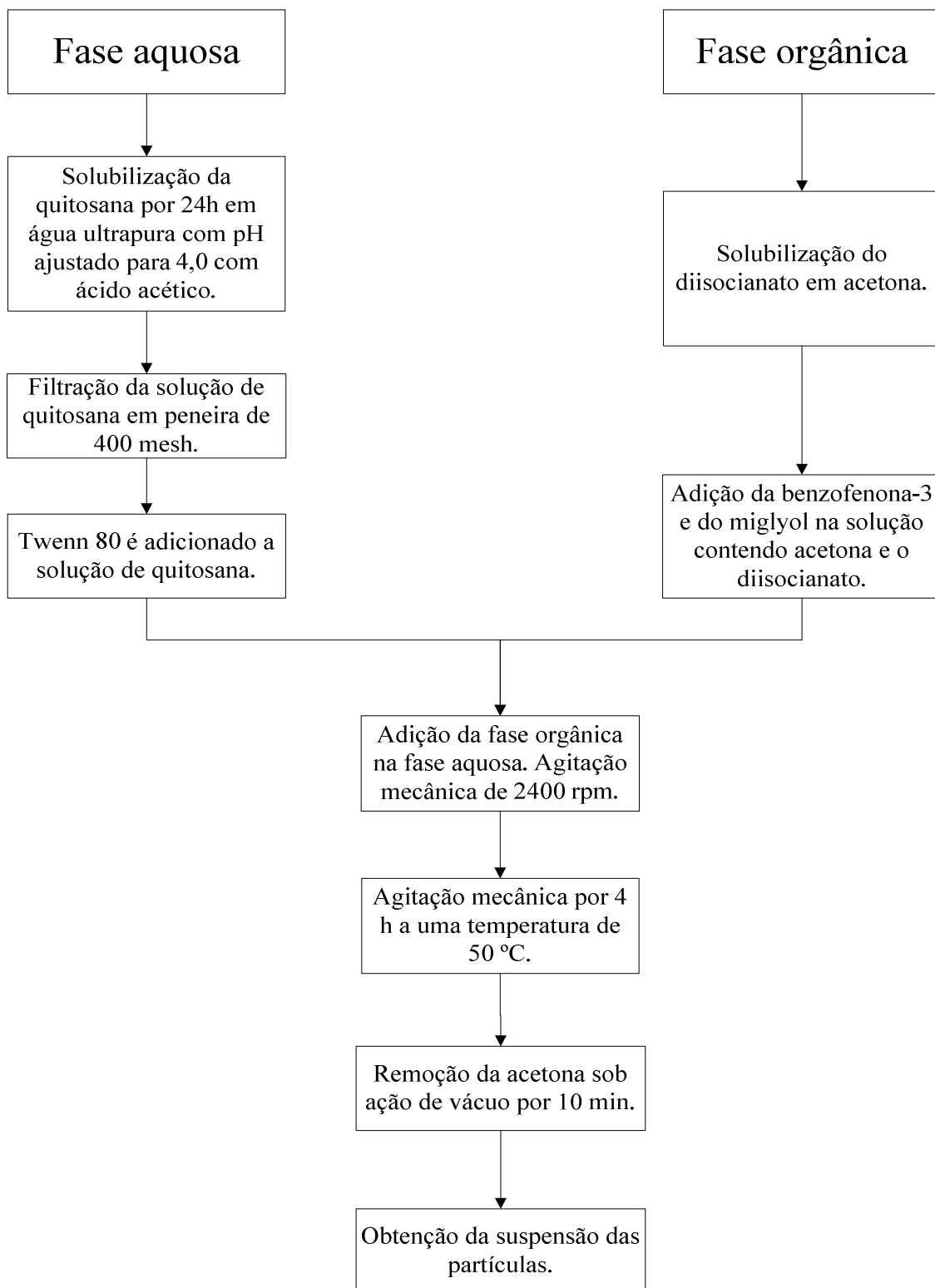


Figura 4.1. Fluxograma das etapas de obtenção das partículas.

4.5. Caracterização das suspensões de partículas de quitosana/MDI

Cada suspensão de partículas de quitosana/MDI foi caracterizada quanto a sua granulometria, índice de polidispersão, morfologia, carga superficial, teor de ativo encapsulado, estabilidade física das suspensões e caracterizações térmicas.

4.5.1. Granulometria e índice de polidispersão

A granulometria das partículas é medida em uma suspensão aquosa estática por espalhamento de luz laser em uma LS 230 COULTER ® granulometer. O LS 230 mede a granulometria das partículas usando o princípio da difração laser. Uma amostra é colocada no fluido do módulo onde é distribuída através de uma célula a velocidade constante. Um feixe de luz laser brilha através da célula onde é difratada pelas partículas no interior da amostra. A luz é dispersa e recolhida por um conjunto de detectores. As informações sobre as partículas menores que 0,04 µm são limitadas pela difração padrão do equipamento. Nesse caso, quando o diâmetro da partícula é menor que 0,04 µm, é usado outro equipamento. Esse equipamento é o Malvern, Modelo Zetamaster S, que trabalha por espalhamento de luz de ângulo fixo de 90° e obtém medições de 1 a 1000 nm.

As determinações do diâmetro e do índice polidispersão das micro e nanopartículas em suspensão foram realizadas através de espalhamento de luz dinâmico. As amostras foram diluídas 500 vezes (v:v) em água ultrapura à temperatura ambiente e os resultados determinados através da média de três repetições.

4.5.2. Microscopia e morfologia

A morfologia das nanopartículas foi investigada pela microscopia eletrônica de transmissão (TEM) Philips ® CM120, 80 kV. Geralmente, as amostras são preparadas pela colocação de uma gota em um apoio de grades collodion cooper (Malaiya e Vyas, 1988). No caso das micropartículas foi utilizado um Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol, Modelo JSM-6360LV onde uma pequena quantidade de micropartículas

é adicionada a uma fita de cobre fixada em um porta-amostra de latão. Em seguida, as amostras foram metalizadas com Au pelo processo de Sputtering (evaporação do metal e deposição de uma fina camada – 10nm - sobre a amostra) utilizando-se um metalizador BAL-TEC. Foi utilizado também um microscópio óptico Nikon Eclipse, Modelo E400 POL para observar se nos ensaios ocorria a difusão da BZ-3 da fase orgânica para a fase aquosa.

4.5.3. Potencial zeta

Os tensoativos estabilizam a interface da emulsão não apenas com a formação de uma barreira mecânica, mas também através da produção de uma carga elétrica de superfície, denominada potencial zeta, que tem a habilidade de produzir forças repulsivas entre as gotículas de óleo evitando a coalescência (Benita & Levy, 1993; Floyd, 1999).

A carga superficial das partículas foi verificada por um Malvern Zetasizer. As partículas foram diluídas 500 vezes (v:v) em solução de 1 mmol.L⁻¹ de NaCl à temperatura ambiente e os resultados determinados através da média de quinze repetições (Maia; Santana; Ré, 2004).

4.5.4. Eficiência de encapsulação da BZ-3 por CLAE

A quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou HPLC tem sido adotada para diversas análises por ser uma metodologia bastante versátil e prática, pois pode ser totalmente automatizada. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (Guimarães & Collins, 1997).

Além disso, existem ensaios descritos por CLAE com a separação e determinação de filtros solares (Vanquerp; Rodriguez; Coiffard, 1999; Ikeda; Suzuki; Watanabe, 1989; Gagliardi; Cavazzutti; Montanarella, 1989; Rastogi & Jensen, 1998;

Salvador et. al., 2003; Chisvert & Salvador, 2002; Dinunzio & Gadde, 1990; Scalia, 2000; Smyrniotakis & Archontaki, 2003).

Para separar as partículas do meio aquoso para uma futura análise de eficiência foi utilizado o método de centrifugação proposto por Cheng; Liang; Li, (2005), pois para a centrifugação de nanopartículas é necessário a utilização de uma ultracentrífuga. Pelo método proposto por Cheng; Liang; Li, (2005) não se faz necessário essa utilização. O método consiste em: um grama da suspensão é dispersa em 25 ml de uma solução aquosa de sacarose a 20% ($\rho = 1.0584 \text{ g/mL}$) em tubos de centrífuga e, em seguida, segue para centrifugação por 1h a 13400 rpm em temperatura ambiente. O equipamento utilizado foi uma centrífuga Selecta e o modelo é Medifriger-BL. O uso de uma solução concentrada de sacarose, como em muitos casos de separações biológicas, contribui para manter a separação entre diferentes tipos de nanopartículas por causa da diferença de densidade entre elas ao término da centrifugação (Cheng; Liang; Li, 2005).

As amostras foram centrifugadas pelo método proposto por Cheng; Liang; Li, (2005), re-suspensas e outras vez centrifugadas. Em seguida foram colocadas para secar em um dessecador protegido da luz por 24 h, para que não ocorresse a degradação da BZ-3. Após a secagem, as amostras foram pesadas de acordo com a curva de calibração do CLAE em um erlenmeyer de 50 ml e diluídas em 25 ml de isopropanol. As amostras foram submetidas ao ultrassom por 30 min para que ocorresse a ruptura da parede polimérica e a BZ-3 difundiu-se para o isopropanol. Em seguida foram transferidas para balões volumétricos de 50 ml e completados com isopropanol.

O doseamento da BZ-3 foi feito em triplicata e realizado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo metodologia descrita por Sarveiya; Risk; Benson, (2004), modificada. Em seguida, as amostras foram filtradas através de membrana (0,45 μm , Millipore), e analisadas através de CLAE em cromatógrafo Shimadzu, Modelo CBM-20A, utilizando-se detector ultravioleta visível 289 nm, coluna C-18. A fase móvel isocrática de metanol:água em uma proporção 95:5(v/v), com pH aparente igual a 4,0, fluxo de 1,0 mL por minuto, e como agente de pareamento iônico, perclorato de tetrabutilamônio (4mg%). O cálculo de rendimento de encapsulação da BZ-3 está descrito na Equação 3.

$$R = \frac{Mb_{z3clae} \times 100}{Mb_{z3}} \quad (3)$$

Sendo:

R: Rendimento de encapsulação (%);

Mb_{z3}: Massa da BZ-3 na amostra;

Mb_{z3clae}: Massa de BZ-3 obtida no CLAE.

4.5.5. Turbidimetria

Turbidimetria é um grau de medida da turvação de suspensão em um meio. Ela é determinada graças a um sistema ótico que mede a diminuição, a absorbância e a diminuição da intensidade de um raio luminoso que atravessa a suspensão.

Na determinação da transmitância das suspensões de nano e micropartículas será utilizado um equipamento de medidas de turbidez da marca Turbiscan LAb® que avalia a transmissão e o backscattering, utilizando uma fonte de infravermelho próximo (850 nm) e detectores que medem a quantidade de luz que é refletida (a 45° do feixe incidente) ou transmitida (a 180° do feixe incidente) através da amostra em análise.

O princípio da análise é fundamentado na alteração da fração volumétrica da gotícula/partícula, resultando na variação da transmissão e do backscattering (Figura 4. 2). Através desta análise é possível identificar fenômenos de migração de gotícula/partícula como cremagem (resulta da diferença de densidade entre as duas fases) e sedimentação, e fenômenos de alteração de diâmetro como floculação e coalescência. O maior benefício na utilização do Turbiscan é a detecção dos fenômenos de instabilidade em emulsões, suspensões ou espumas não diluídas, muito antes que estes fenômenos sejam detectados por observação visual do analista, especialmente no caso de sistemas opacos e concentrados (Mengual et. al., 1999; Lemarchand et al., 2003).

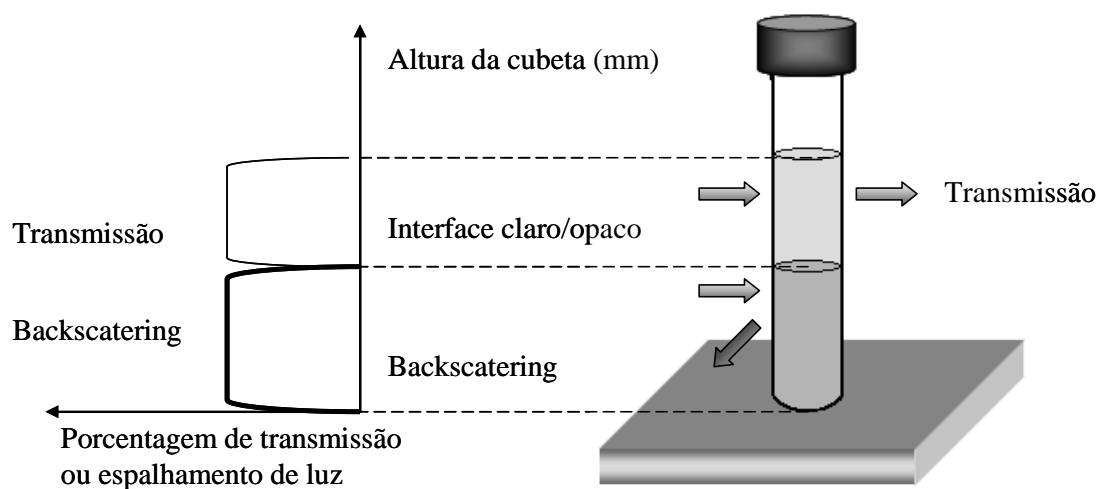


Figura 4.2. Representação esquemática do princípio de funcionamento do Turbiscan (Adaptado de DAOUD-MAHAMMED *et al.*, 2007).

As formulações contendo BZ-3 e miglyol foram analisadas pela metodologia proposta por Paese, 2008. Esta metodologia consiste em fazer as análises logo após a preparação por 24 horas à temperatura de 40°C, com varreduras a cada 10 min, possibilitando a identificação e o estudo dos fenômenos de instabilidade das mesmas.

4.5.6. Estudo da liberação controlada

4.5.6.1. Estudo da liberação controlada livre de membranas

Este método permite a investigação de liberação de um ativo encapsulado independente de membranas. O princípio do método reside na difusão do ingrediente ativo da formulação para um receptor lipofílico:

- 3 mL da dispersão contendo as cápsulas foram colocados em um tubo de vidro. 4 mL de uma solução aquosa de Tween 80 a 3% (pH 5,46) foram adicionados. 10 mL de triglicérides de cadeia média (Miglyol) foram cuidadosamente colocados vertidos sobre a solução aquosa. Miglyol foi escolhido como receptor por solubilizar a benzofenona-3 e não alterar a estrutura física das partículas de quitosana/MDI. As

amostras foram armazenadas em uma incubadora Ética, Modelo 430 sob condições controladas de temperatura e intensidade de agitação (32°C; 70 rpm). Amostras de 300 µl foram retiradas da fase oleosa após 1, 2, 4, 8 e 24 h, e diluídas com 2,7ml de etanol 96% (v/v). A absorbância foi medida em 286 nm usando um espectrofotômetro Cintra, Modelo Cintra 10E. Uma solução de Miglyol: etanol 96% (1:9) (v/v) foi usada como referência (Neubert & Wohlrab, 1990).

4.5.6.2. Estudo da liberação controlada com membranas de diálise

Etanol foi usado como meio receptor neste estudo. As amostras foram centrifugadas pelo método descrito no item 4.5.4.. Em seguida, o sedimento foi armazenado em um dessecador protegido da luz por 24 h, para que não ocorresse a degradação da BZ-3. As amostras secas foram pesadas e acondicionadas em membranas de diálise. Para cada amostra foram feitas três triplicatas. Para este estudo foram utilizados 200 mL do meio receptor, erlenmeyers de 250 mL e uma Incubadora Nova Ética, Modelo 430. As membranas foram submersas no meio receptor e a incubadora foi mantida a 37°C e agitação de 70 rpm. Foram retiradas alíquotas de 3 mL do etanol em um período de 3, 5, 10, 15, 20 e 30 min e também no período de 1, 2, 4, 8 e 24h.

As concentrações de BZ-3 nas amostras foram determinadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo metodologia descrita por Sarveiya e colaboradores (2004), modificada. A fase móvel isocrática de metanol água em uma proporção 95:5(v/v), com pH aparente igual a 4,0, fluxo de 1,0 mL por minuto, e como agente de pareamento iônico, perclorato de tetrabutilamônio (4mg/L).

O etanol foi escolhido como meio receptor por solubilizar a BZ-3 (a solubilidade da BZ-3 no etanol apresenta-se superior a 58 mg/mL à 37° C, valor verificado experimentalmente neste trabalho) e por estabelecer uma metodologia *in vitro* de análise comparativa de diferentes formulações.

4.5.7. pH

A determinação de pH foi realizada em pHmetro DIGIMED modelo DM 21, em potenciômetro calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas suspensões coloidais, após a preparação e durante um período de 9 meses, verificando se as amostras variavam ou fixavam o pH. Os resultados representam a média de três determinações.

4.5.8. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Amostras de partículas foram analisadas por transformada de Fourier usando espectroscopia de infravermelho, para verificar a formação da parede polimérica das cápsulas. A suspensão de partículas foi posta diretamente em cima das pastilhas de NaCl e logo em seguida foram postas no dessecador para secar. Os espectros de absorção das amostras foram obtidos em um espectrômetro Perkin Elmer, modelo Spectrum One, na faixa de 500 a 4000cm⁻¹.

4.5.9. Análises térmicas.

4.5.9.1. Análise termogravimétrica (TG) e Análise térmica diferencial (DTA).

A TG fornece dados com relação às variações de massa em função do tempo e/ou temperatura sob determinadas condições atmosféricas. Os experimentos são executados por meio de uma termobalança de elevada sensibilidade, reprodutibilidade e resposta rápida às variações de massa. As curvas obtidas fornecem informações relativas à composição e estabilidade térmica da amostra, dos produtos intermediários e do resíduo formado. Utilizando apenas a TG é possível estudar a decomposição térmica de compostos orgânicos, inorgânicos e de substâncias poliméricas, determinar a velocidade de evaporação e sublimação, desidratação e higroscopicidade (propriedade que os materiais porosos têm para, quando colocados no estado seco num determinado ambiente a uma determinada umidade relativa, reterem nos seus poros uma certa

quantidade de umidade existente no ambiente) (Wendlandt, 1986; Haines, 1995; Matos & Machado, 2004). Em resumo a TG indica eventos térmicos relacionados a variações de massa.

A DTA é a técnica pela qual a diferença de temperatura (ΔT) entre a substância e o material de referência (termicamente estável) é medida em função da temperatura, enquanto ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura. A temperatura é medida por termopares conectados aos suportes metálicos das cápsulas de amostra e do material de referência, ambos contidos no mesmo forno. As variações de temperatura na amostra são devidas às transições entálpicas ou reações endotérmicas ou exotérmicas. As curvas DTA representam os registros de ΔT em função da temperatura (T) ou do tempo (t), de modo que os eventos são apresentados na forma de picos. Os picos ascendentes caracterizam os eventos exotérmicos e os descendentes os endotérmicos (Wendlandt, 1986; Machado & Matos, 2004).

As curvas de TG e DTA da quitosana foram obtidas por um TG/SDTA - Marca Mettler Toledo, Modelo SDTA851 e as amostras foram pesadas em uma balança de precisão Marca Mettler Toledo, Modelo XS205. A partir dos dados obtidos foram feitos estudos mais detalhados de DSC das partículas. Foi usado um porta-amostra padrão de alumínio selado. As análises foram feitas em atmosfera de nitrogênio, a um fluxo de 80 mL.min⁻¹, na faixa de temperatura de 0 a 100°C na taxa de aquecimento de 10°C/min.

4.5.9.2. Análise de calorimetria diferencial de varredura - DSC

A DSC é a técnica de análise térmica, na qual se mede a alteração de energia fornecida à substância e a um material de referência (termicamente estável), em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura. Existem duas configurações possíveis para aparelhos de DSC: DSC com compensação de potência e DSC com fluxo de calor. Na primeira configuração a amostra e o material de referência são aquecidos em compartimentos separados em condições isotérmicas e submetidos à igual variação de potência de entrada no forno. Neste caso, os eventos são apresentados na curva DSC como picos, os ascendentes correspondem a processos endotérmicos e os descendentes a

exotérmicos. No caso da DSC com fluxo de calor, a amostra e o material de referência são colocados em cápsulas idênticas, localizadas sobre o disco termoelétrico e aquecidas por uma única fonte de calor. As curvas DSC obtidas nesse sistema mostram picos ascendentes que caracterizam eventos exotérmicos, enquanto os descendentes eventos endotérmicos (Wendlandt, 1986; Machado & Matos, 2004). Em resumo a DSC detecta eventos associados ou não à perda de massa.

Os termogramas de DSC das amostras foram obtidos por um Calorímetro Diferencial de Varredura DSC- DSC822 (Mettler Toledo) usando um porta-amostra padrão de alumínio selado onde as amostras foram pesadas em uma balança de precisão Marca Mettler Toledo, Modelo XS205. As análises foram feitas em atmosfera de nitrogênio, a um fluxo de 80 mL.min⁻¹, na faixa de temperatura de 0 a 100°C na taxa de aquecimento de 10°C/min.

CAPÍTULO 5
RESULTADOS E DISCUSSÕES

Resultados e discussões

5.1. Ensaio preliminares

5.1.1. Introdução do miglyol no sistema

No início deste estudo foram realizados diversos ensaios onde foram obtidas informações importantes sobre sistema, como por exemplo, a inclusão do miglyol na fase orgânica (Bouchemal et al., 2006). Sem a sua presença na fase orgânica a difusão do solvente para fase aquosa era extremamente rápida sequestrando assim a BZ-3 para o meio aquoso. A Figura 5.1 ilustra essa situação. A solução proposta foi então de usar o Miglyol como reservatório para a BZ-3, minimizando assim a difusão desta para a fase aquosa.

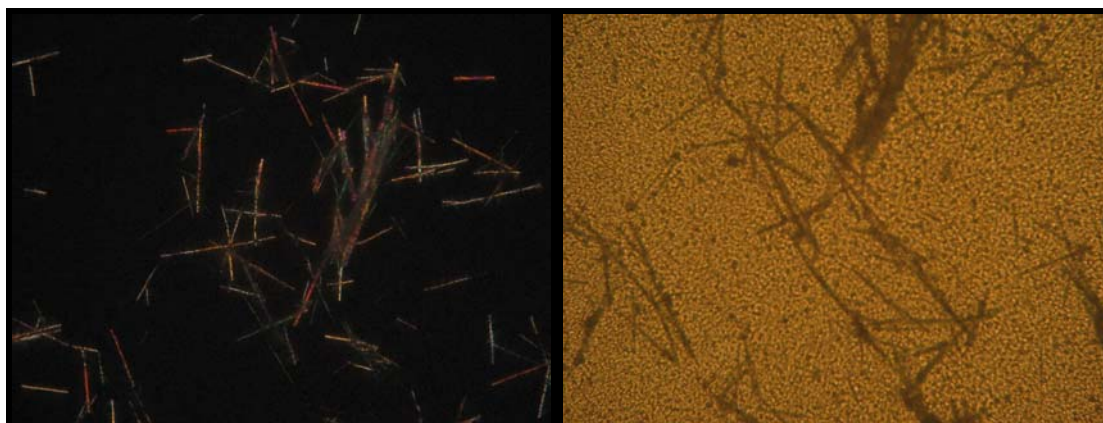


Figura 5.1. Cristais de BZ-3 na fase aquosa (Microscopia óptica; 200X).

5.1.2. Concentração do miglyol no sistema

Para verificar o efeito da concentração de miglyol no sistema estudado, primeiramente avaliou-se experimentalmente a solubilidade da BZ-3 neste meio (miglyol), que é de 210 mg/mL. Investigou-se o efeito da quantidade de miglyol no sistema. Foram preparadas suspensões de partículas fixando-se o valor da BZ-3 em 500mg e variando-se o volume do miglyol em 0,575, 1,15, 1,725, 2,3 e 2,875 mL. As seguintes concentrações de BZ-3 no miglyol foram obtidas respectivamente: 869,56 mg/mL; 434,78 mg/mL; 289,85 mg/mL; 217,39 mg/mL; 173,91mg/mL. Nas três primeiras concentrações que ficaram muito acima da solubilidade estabelecida de 210

mg/mL ocorreu a difusão da BZ-3 para o meio aquoso. Com as concentrações de 217,39 e 173,91mg/mL não houve difusão da BZ-3 para a fase aquosa (Figura 5.2.), porém notou-se a formação de aglomerados quando a concentração de 173,91 mg/mL foi empregada. Devido a isto, fixou-se a concentração de 217,39 mg de BZ-3 por mL de miglyol.

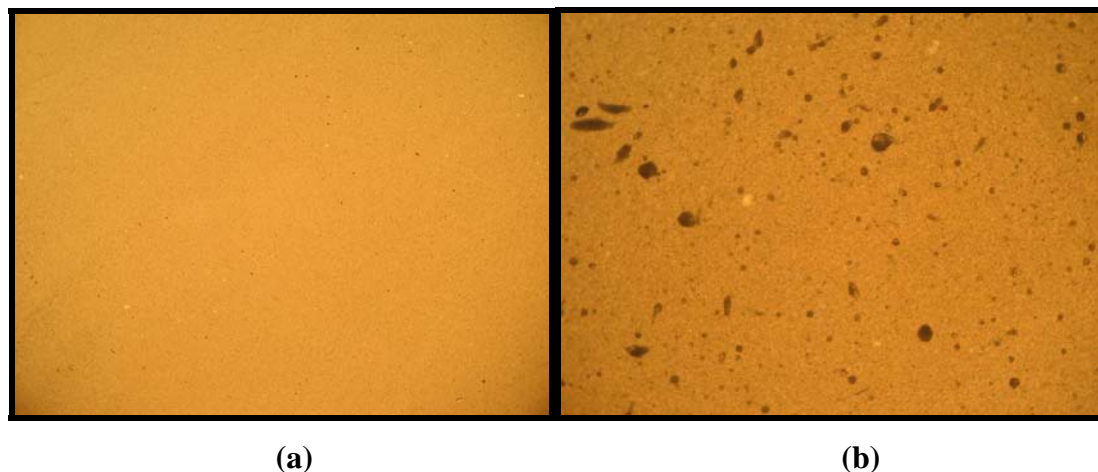


Figura 5.2. Suspensões preparadas com diferentes concentrações de miglyol, microscopia óptica 200X: (a) 2000mg; (b) 2500 mg.

5.1.3. Escolha do solvente

Na técnica de policondensação interfacial combinada com emulsificação espontânea quanto maior a polaridade do solvente, mais rápida será a difusão para a fase aquosa, conseqüentemente menor será o diâmetro da partícula formada a partir da fase dispersa da emulsão (Bouchemal et al., 2004 a). A Figura 5.3 apresenta uma análise granulométrica de três suspensões de partículas, obtidas empregando-se diferentes solventes orgânicos: acetona, acetato de etila e clorofórmio. Nota-se por estes resultados que a acetona, solvente de maior miscibilidade com água, favorece a formação dos menores diâmetros de partículas, razão de seleção deste solvente para a continuidade do trabalho.

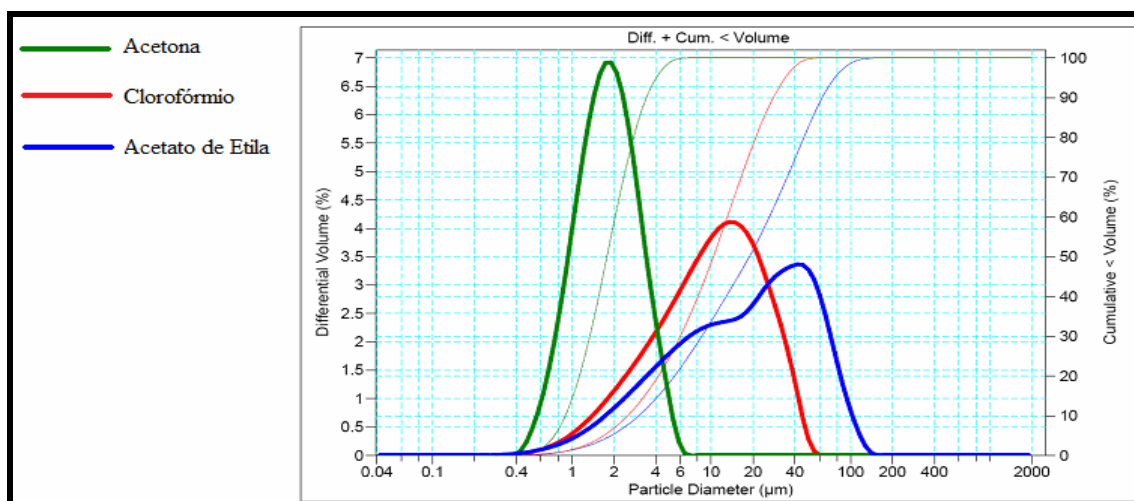


Figura 5.3. Diâmetros de partículas com diferentes tipos de solventes.

5.2. Planejamento experimental

Um planejamento fatorial 2^3 resultando em 8 experimentos mais a tréplica do ponto central, totalizando 11 experimentos, foi elaborado visando extrair o máximo de informações do processo de obtenção das partículas de quitosana/MDI, já que o caso em estudo se trata de um processo de obtenção de um menor diâmetro de partícula. Tal planejamento foi capaz de avaliar a influência das variáveis na obtenção das partículas bem como de propor um modelo matemático que representasse o seu diâmetro. As variáveis independentes neste estudo foram: (A) concentração do diisocianato da unidade; (B) concentração de quitosana; e (C) razão mássica fase orgânica: fase aquosa (Tabela 5.1). O diâmetro de partícula foi definido como variável-resposta. Os resultados do planejamento experimental se encontram na Tabela 5.2. Estes dados foram submetidos a uma regressão linear utilizando o Statistica 7.0, onde foi possível calcular os efeitos de cada variável (Tabela 5.3).

Tabela 5.1. Variáveis do planejamento experimental.

Variável	-1	0	1
A Concentração de MDI (m:m)	0,1	0,175	0,25
B Concentração de Quitosana (m:m)	0,1	0,300	0,5
C Razão mássica fase orgânica: fase aquosa	1:5	7:20	1:2

Tabela 5.2. Planejamento experimental.

Ensaio	A	B	C	A	B	C	Dp
1	-1	-1	-1	0,1	0,1	1:5	1,289
2	-1	-1	1	0,1	0,1	1:2	1,459
3	-1	1	-1	0,1	0,5	1:5	0,371
4	-1	1	1	0,1	0,5	1:2	1,601
5	1	-1	-1	0,25	0,1	1:5	5,113
6	1	-1	1	0,25	0,1	1:2	7,034
7	1	1	-1	0,25	0,5	1:5	8,761
8	1	1	1	0,25	0,5	1:2	6,129
9	0	0	0	0,175	0,3	7:20	2,739
10	0	0	0	0,175	0,3	7:20	2,692
11	0	0	0	0,175	0,3	7:20	2,591

Tabela 5.3. Efeitos calculados no Statística 7.0 para Planejamento Fatorial 2³

Effect Estimates; Var.:Dp; R-sqr=.89719; Adj.:.74298 (Spreadsheet1) 2**(3-0) design; MS Pure Error=.005719 DV: Dp										
Factor	Effect	Std.Err. Pure Err	t(2)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coeff.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	3,616273	0,022802	158,5979	0,000040	3,51817	3,714380	3,616273	0,022802	3,518166	3,714380
A	5,579250	0,053474	104,3352	0,000092	5,34917	5,809331	2,789625	0,026737	2,674584	2,904666
B	0,491750	0,053474	9,1960	0,011619	0,26167	0,721831	0,245875	0,026737	0,130834	0,360916
C	0,172250	0,053474	3,2212	0,084360	-0,05783	0,402331	0,086125	0,026737	-0,028916	0,201166
1 by 2	0,879750	0,053474	16,4518	0,003674	0,64967	1,109831	0,439875	0,026737	0,324834	0,554916
1 by 3	-0,527750	0,053474	-9,8692	0,010111	-0,75783	-0,297669	-0,263875	0,026737	-0,378916	-0,148834
2 by 3	-0,873250	0,053474	-16,3303	0,003729	-1,10333	-0,643169	-0,436625	0,026737	-0,551666	-0,321584

As variáveis estudadas individualmente bem como suas interações se mostraram estatisticamente significativas com exceção da variável C. A variável MDI foi estatisticamente mais significativa para um nível de 95% de confiança. Isto pode ser constatado através do diagrama de Pareto (Figura 5.4), que ilustra os efeitos das variáveis estudadas individualmente bem como suas interações, de duas a duas, com relação ao diâmetro das partículas. O efeito da variável será tão significativo quanto mais à direita da linha vermelha ele estiver, no nível de significância de 95 % de confiança.

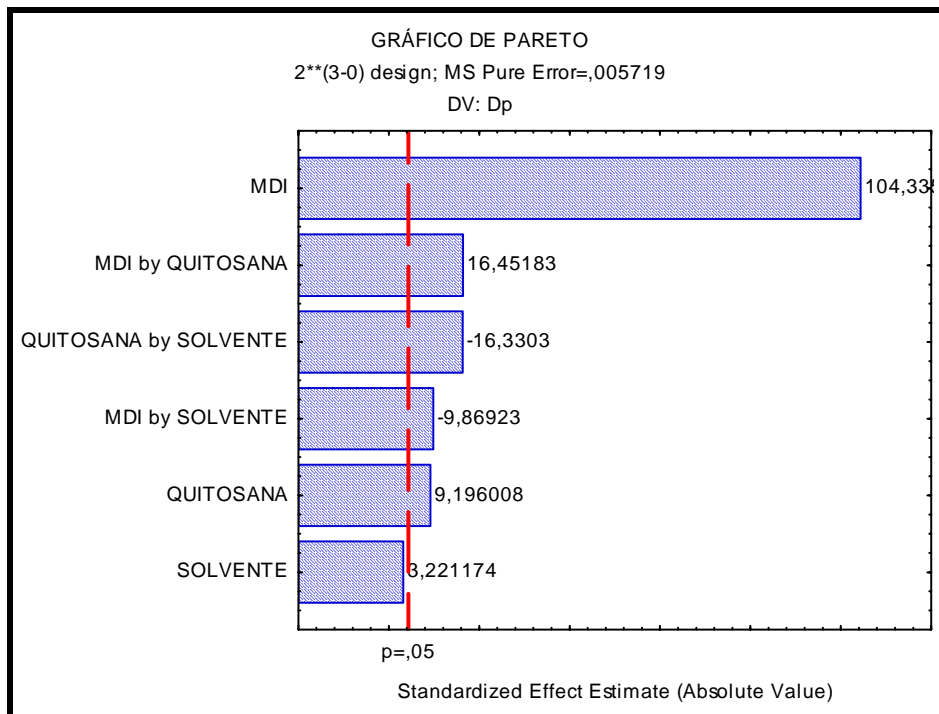


Figura 5.4. Gráfico de Pareto.

Com a regressão dos dados utilizando-se o Statistica 7.0, obteve-se um modelo matemático (Equação 3) para a obtenção do diâmetro da partícula considerando o intervalo de probabilidade de 95% de confiança. Tal modelo foi gerado a partir dos dados apresentados na Tabela 5.3.

$$D = 3,6163 + 2,7896 MDI + 0,2459 Q + 0,4399 MDI.Q - 0,2639 MDI.S - 0,4366 Q.S \quad (3)$$

O coeficiente de correlação R^2 ajustado para o modelo apresentado pela Equação 3 foi de 0,897, o que demonstra uma regressão satisfatória, o que é ilustrada pela Figura 5.5, onde se visualiza uma boa correlação entre os valores preditos pelo modelo e os valores observados, pois se observa uma disposição relativamente ordenada dos pontos em torno da reta representativa.

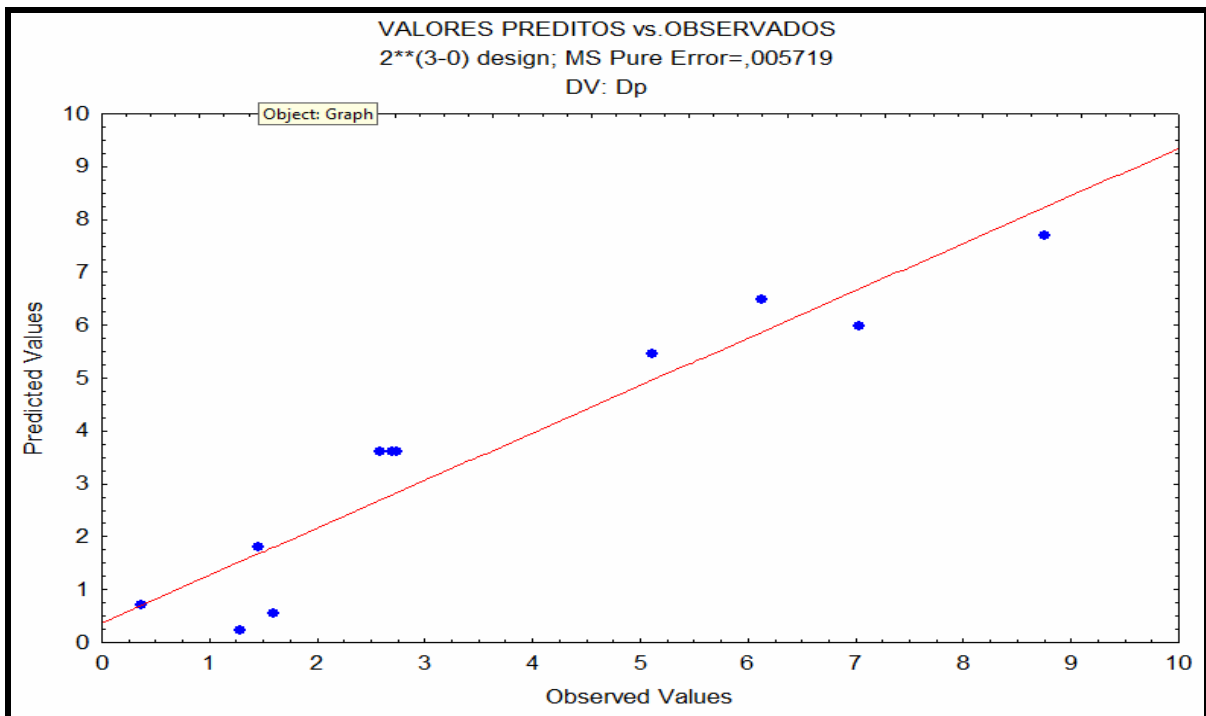


Figura 5.5. Relação entre os valores preditos pelo tratamento matemático e os valores observados.

As Figuras 5.6 e 5.7 apresentam os gráficos dos resíduos, onde também fica evidente a validade do modelo e a significância da regressão. Observa-se uma boa distribuição dos pontos em torno do ponto zero, onde também é possível perceber que o modelo deixou poucos resíduos, pois de acordo com Barros Neto; Scarminio; Bruns, (2001), tão mais significativo será o modelo quanto menor o resíduo a ele associado.

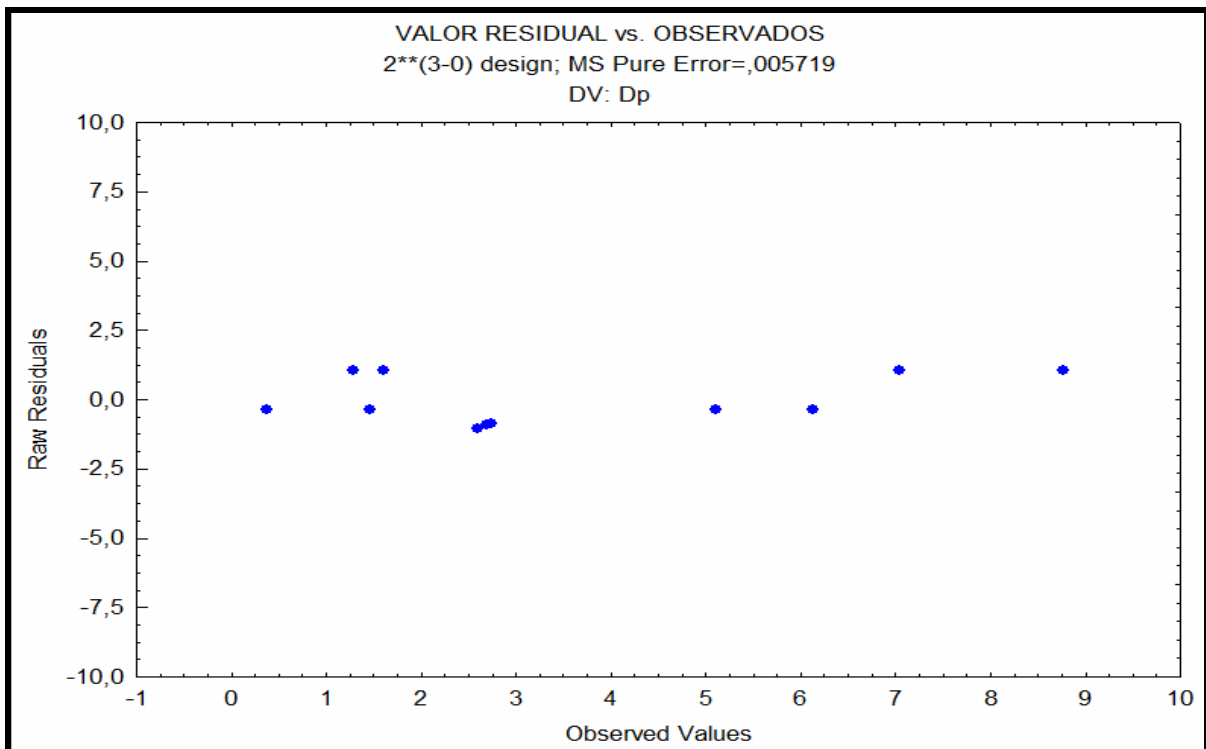


Figura 5.6. Valor residual versus valores observados.

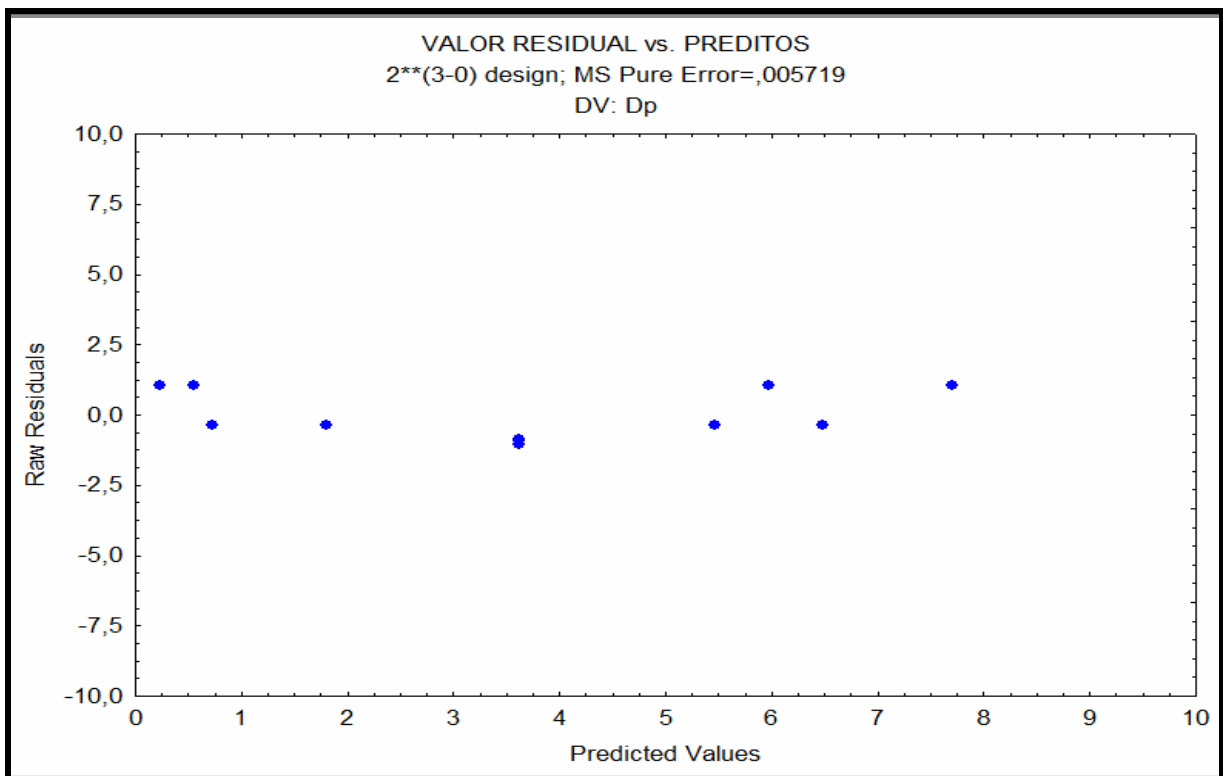


Figura 5.7. Valor residual versus valores preditos.

Na Figura 5.8 são mostradas as superfícies de respostas em função das variáveis do processo: Concentração de MDI, de quitosana e de solvente em relação à fase aquosa. Observa-se que a superfície de resposta na Figura 5.8 (a) que representa a interação entre MDI e Solvente apresenta uma inclinação bastante pronunciada em direção ao seu ponto máximo – maior diâmetro - quando há um aumento da concentração de MDI, isso ocorre também no Figura 5.8 (b) da superfície de resposta (interação MDI e Quitosana). Porém, analisando-se a Figura 5.8 (c) nota-se uma variação pequena na superfície de resposta (interação Quitosana e Solvente).

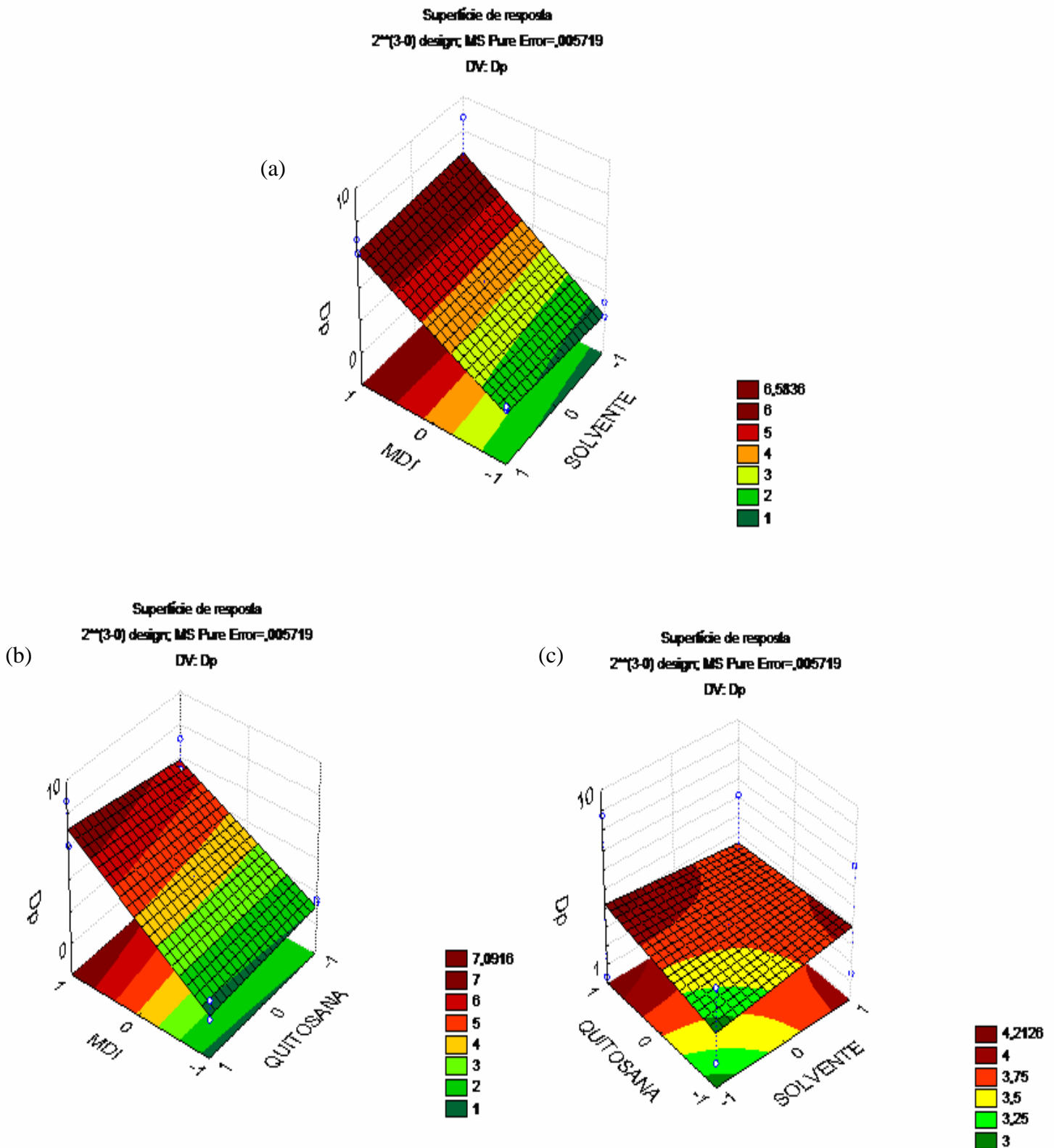


Figura 5.8. Superfície de resposta: (a) MDI vs. Solvente; (b) MDI vs. Quitosana; (c) Quitosana vs. Solvente.

A significância estatística foi determinada através da análise de variância para o modelo e é apresentada na Tabela 5.4. O valor da razão entre o F calculado e o $F_{5,5}$ (tabelado) foi maior que 1, significando que a regressão obtida é estatisticamente significativa sob o ponto de vista do teste F, porém não serve para fins preditivos de acordo Barros Neto; Scarminio; Bruns (2001), pois para tanto, seria necessário que o F calculado fosse pelo menos 10 vezes superior ao F tabelado, condição esta que não é satisfeita.

Mesmo sendo o modelo estatisticamente significativo, faz-se necessário o teste F devido á falta de ajuste para verificar se o modelo está ou não bem ajustado aos dados experimentais. Neste teste, a razão entre o F_{calc} e o $F_{3,2}$ (tabelado) deve ser menor que 1. Isto pode ser verificado na Tabela 5.4, já que o F_{calc} é bem maior que o $F_{3,2}$ (tabelado). Isto significa que o modelo está bem ajustado às respostas do planejamento fatorial, além de ser um modelo significativo sob o ponto de vista estatístico.

Tabela 5.4. Análise de variância

FONTE DE VARIACÃO	Soma Quadrática	N g.l.	Média Quadrática	F.cal. (95%)	F. tab (95%)
Regressão	66,36978863	5	13,27395773	8,651484487	5.05
Resíduos	7,671491375	5	1,534298275		
Falta de Ajuste	7,60072	3	2,533573333	443,0098502	9.55
Erro Puro	0,01144	2	0,005719		
Total	74,04128	10			

É possível então concluir que as respostas estão bem ajustadas ao modelo linear. Parte dos resíduos deixados pelo modelo se deve aos erros aleatórios, geralmente atribuídos à imprecisão dos equipamentos e medidas feitas durante os procedimentos laboratoriais. Tais resíduos podem, no entanto, também serem atribuídos à falta de ajuste do modelo, o que não é constatado pelo teste F, ou seja, o modelo não é capaz de cobrir toda faixa de variação dos fatores estudados devido aos erros aleatórios. Para um intervalo de 95% de confiança, o modelo se mostra satisfatório estatisticamente, porém é incapaz de fazer previsões dentro dos intervalos de interesse para cada fator já que se trata de um modelo empírico. Com base nos dados do planejamento experimental e verificando as superfícies de respostas, teria que ser escolhido um ensaio que

apresentasse a menor concentração de MDI; logo, escolheu-se as condições do experimento 03 para dar continuidade ao estudo.

5.3. Encapsulação da BZ-3

Após a escolha do experimento 03 do planejamento experimental, as suspensões de partículas contendo concentrações crescentes de BZ-3 foram preparadas segundo o método de polimerização interfacial combinado com emulsificação espontânea descrito no procedimento experimental (item 4.4), fixando-se as composições apresentadas nas Tabelas 5.5 e 5.6.

Tabela 5.5. Composição da suspensão de partículas contendo 6,25 mg/mL de BZ-3.

FASE AQUOSA	FASE ORGÂNICA
Água ultrapura.....80 mL	MDI..... 80 mg
Tween 80..... 136 mg	Miglyol.....2,3 mL
Quitosana 400 mg	Span 80..... 80 mg
	BZ-3.....500 mg
	Acetona.....20 mL

Tabela 5.6. Composição da suspensão de partículas contendo 12,5 mg/mL de BZ-3.

FASE AQUOSA	FASE ORGÂNICA
Água ultrapura.....80 mL	MDI..... 80 mg
Tween 80..... 136 mg	Miglyol.....4,6 mL
Quitosana 400 mg	Span 80..... 80 mg
	BZ-3.....1g
	Acetona.....20 mL

Tabela 5.7. Composição da suspensão de partículas contendo 18,75 mg/mL de BZ-3.

FASE AQUOSA	FASE ORGÂNICA
Água ultrapura.....80 mL	MDI..... 80 mg
Tween 80..... 136 mg	Miglyol.....6,9mL
Quitosana 400 mg	Span 80..... 80 mg
	BZ-3.....1,5g
	Acetona.....20 mL

Tabela 5.8. Composição da suspensão de partículas contendo 25 mg/mL de BZ-3.

FASE AQUOSA	FASE ORGÂNICA
Água ultrapura.....80 mL	MDI..... 80 mg
Tween 80..... 136 mg	Miglyol.....9,2 mL
Quitosana 400 mg	Span 80..... 80 mg
	BZ-3.....2,0 g
	Acetona.....20 mL

5.4. Análise da estabilidade física das suspensões (turbidimetria dinâmica).

As análises feitas no Turbiscan LAB® possibilitam a identificação de fenômenos de instabilidade em suspensões e emulsões. A vantagem desta técnica é a detecção desses fenômenos antes que os mesmos sejam observados por métodos convencionais (Mengual et al., 1999).

As Figuras 5.9 e 5.10 apresentam gráficos referentes à variação de “backscattering” e de transmissão das suspensões de cápsulas contendo BZ-3 nas concentrações de 6,25 e 12,5mg/mL. O manual do equipamento informa que, podem ser analisados os gráficos de variação de “backscattering” caso os valores de variação de transmissão sejam inferiores a 0,2 %. Portanto só foram analisados os gráficos de “backscattering”, pois os valores de transmissão foram inferiores a 0,2 %. Em cada

gráfico, a parte da esquerda refere-se à base da cubeta de análise e a direita ao topo da mesma. Os fenômenos de instabilidade como sedimentação, floculação, coalescência, são demonstradas na base, no topo ou no centro da cubeta, observando-se a elevação ou diminuição de “backscattering”. Ambas as formulações não apresentaram variação na transmissão e no backscattering durante a análise, indicando não haver fenômenos de instabilidade física nas amostras estudadas.

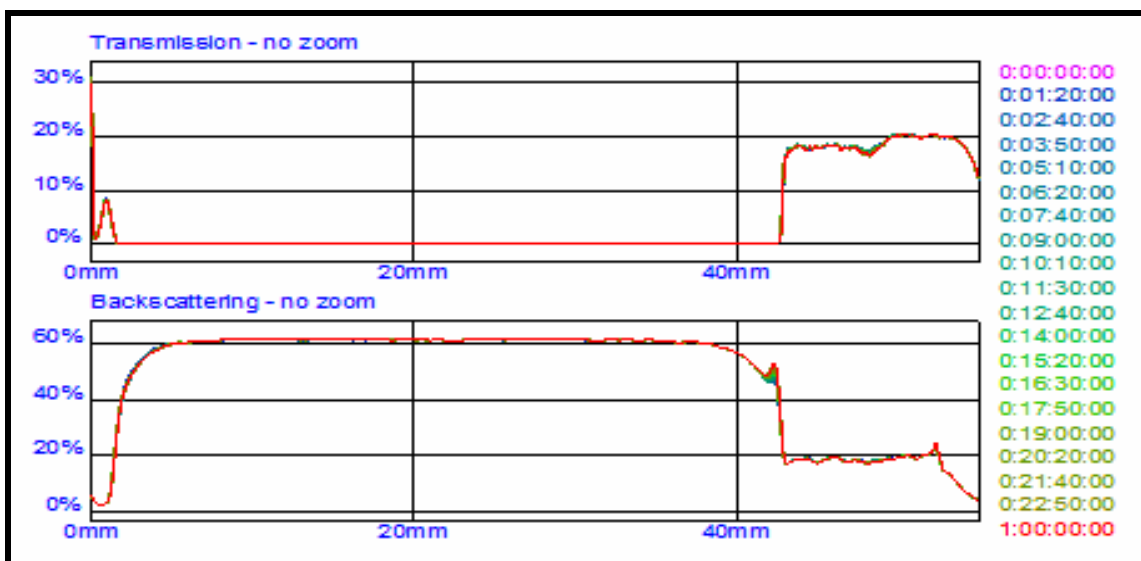


Figura 5.9. Gráficos de variação de transmissão e backscattering da formulação de 6,25mg/mL.

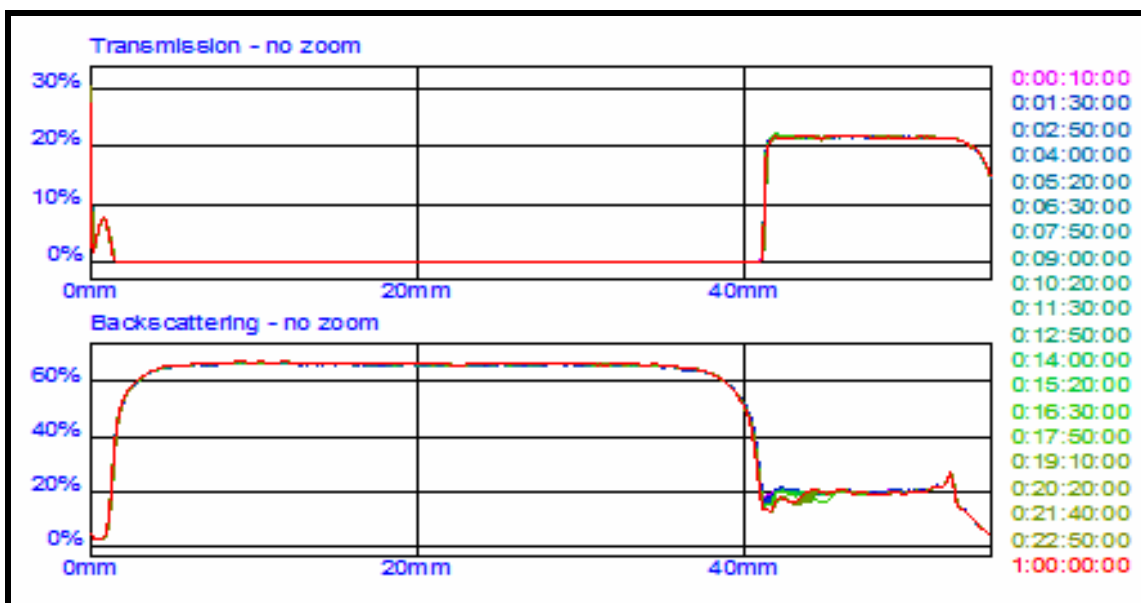


Figura 5.10. Gráficos de variação de transmissão e backscattering da formulação de 12,5mg/mL.

Durante o período de armazenamento ocorreu o aparecimento de precipitados cristalinos (BZ-3) nas suspensões de 18,75 mg/mL e 25 mg/mL. Este aparecimento de precipitados cristalinos foi atribuído à difusão da BZ-3 para a fase aquosa devido à grande quantidade de miglyol no sistema, sugerindo assim o uso de concentrações menores do ativo. Assim, este estudo de estabilidade física de suspensões por turbidimetria dinâmica só foi realizado com as formulações contendo 6,25 e 12,5 mg/mL de BZ-3.

5.5. Granulometria e índice de polidispersão

O tamanho de partícula é um importante parâmetro a ser avaliado para controlar o processo de obtenção e, particularmente, assegurar a qualidade da formulação, porque a estabilidade física de suspensões depende do tamanho de partícula e da distribuição do tamanho (Müller-Goymann, 2004). Na suspensão com concentração 6,25 mg/mL de BZ-3 obteve-se um diâmetro médio de partícula de 1,46 μ m no Beckman Coulter (Figura 5.11) e 952,5nm no Zetamaster (Figura 5.12), um índice de polidispersão superior a 1 e uma curva de distribuição de tamanho do tipo bimodal. Na suspensão estudada de concentração 12,5 mg/mL de BZ-3 obteve-se um diâmetro médio de partícula de 1,76 μ m no Beckman Coulter (Figura 5.13) e 1416,8nm no Zetamaster (Figura 5.14), um índice de polidispersão de superior a 1 e uma curva de distribuição de tamanho monomodal. Em suma, estes resultados indicam que ambas as suspensões analisadas são constituídas de partículas micro e nanométricas.

Uma primeira análise frente a dados de literatura para sistemas particulados desenvolvidos para veiculação de filtros solares químicos como a BZ-3 mostra que o diâmetro das partículas obtidas no presente trabalho são superiores aos encontrados na literatura, visto que a literatura cita partículas da ordem de 300 a 600 nm (Alvarez-Román et al., 2001; Alvarez-Román et al., 2004; Olvera-Martínez et al., 2005; Jiménez et al., 2004; Verna et al., 2003).

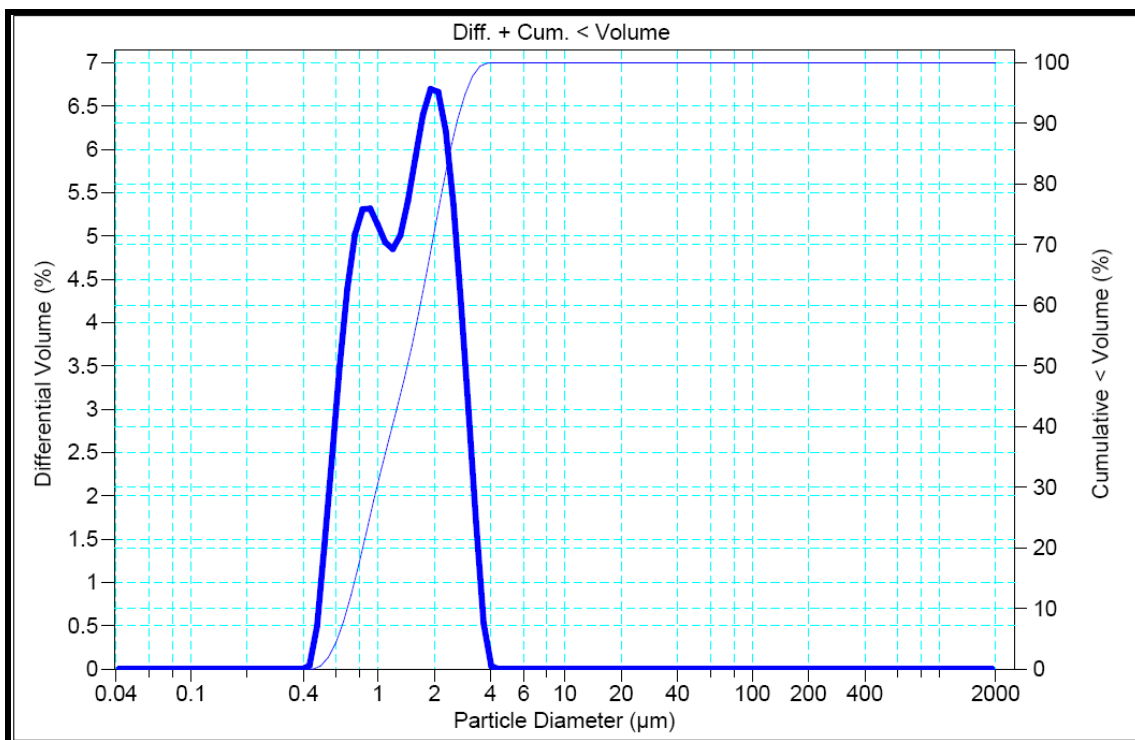


Figura 5.11. Gráfico de diâmetro de partícula COULTER® granulometer para solução de 6,25mg/mL de BZ-3.

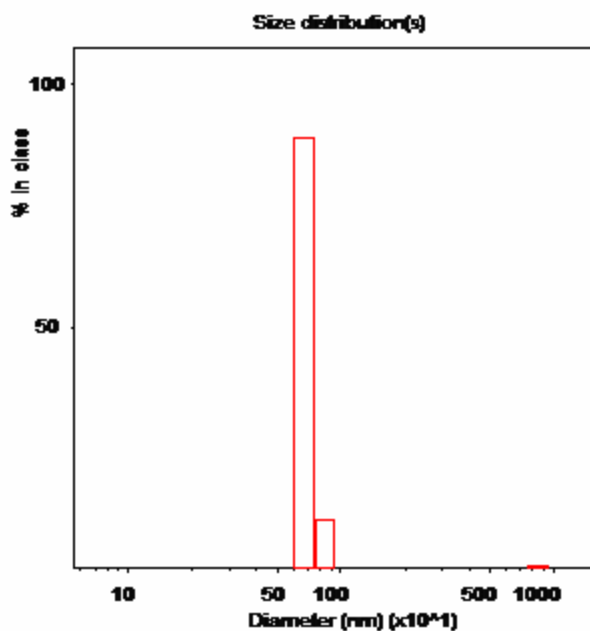


Figura 5.12. Gráfico de diâmetro de partícula Zetamaster S para solução de 6,25mg/mL de BZ-3.

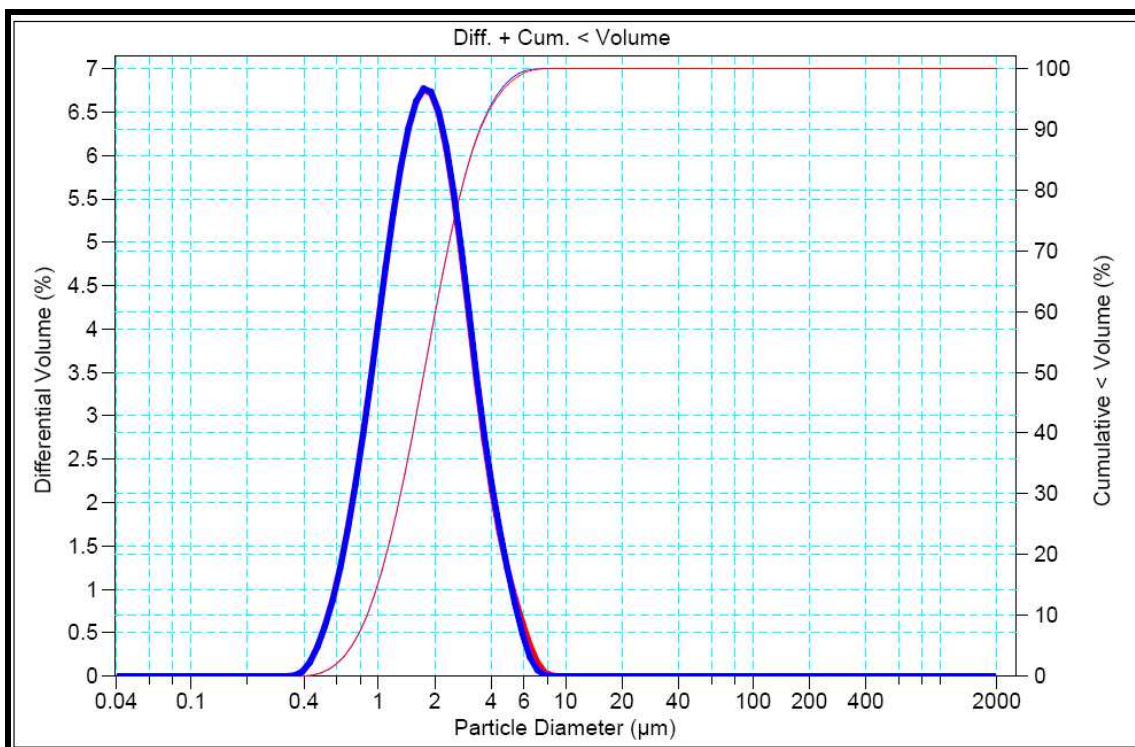


Figura 5.13. Gráfico de diâmetro de partícula COULTER® granulometer para solução de 12,5mg/mL de BZ-3.

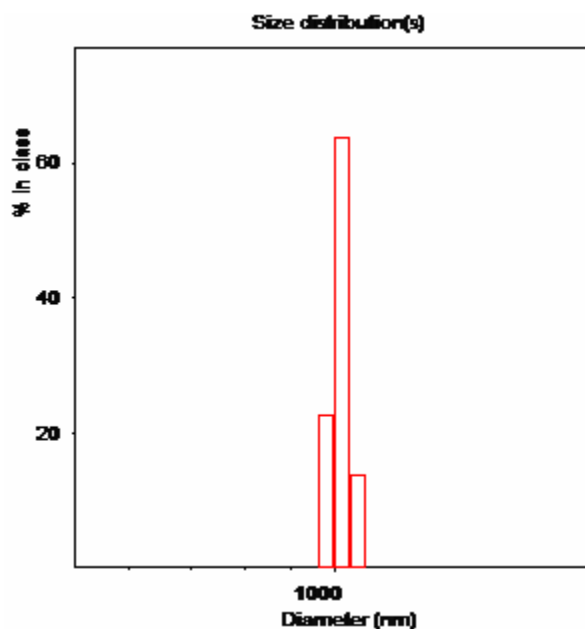


Figura 5.14. Gráfico de diâmetro de partícula Zetamaster S para solução de 12,5mg/mL de BZ-3.

5.6. Microscopia e morfologia das partículas

A microscopia óptica foi utilizada com o objetivo de verificar a existência de cristais de BZ-3 na suspensão. No entanto, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram associadas neste trabalho para uma visualização e análise mais detalhadas das partículas de quitosana/MDI obtidas das formulações contendo 6,25 e 12,5mg/ mL de BZ-3. As Figuras 5.15 (MET) e 5.16 (MEV) mostram que as partículas obtidas apresentam uma forma predominantemente esférica e ordem de grandeza de tamanho compatível com as medidas por granulometria laser, revelando a existência de duas populações, uma micrométrica e outra nanométrica. A Figura 5.17, obtida por microscopia óptica, ilustra a ruptura da parede polimérica da cápsula em um meio aquoso e o escoamento do núcleo oleoso com o ativo dissolvido.

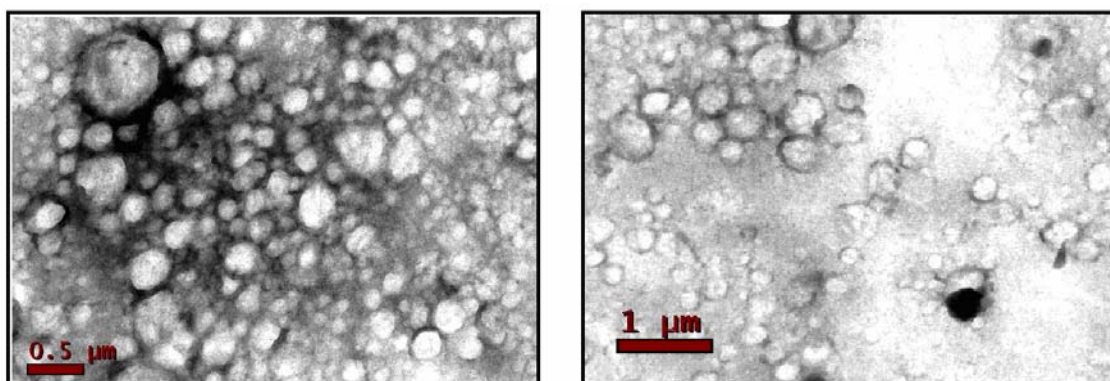


Figura 5.15. Microscopia eletrônica de transmissão das partículas de Quitosana/MDI.

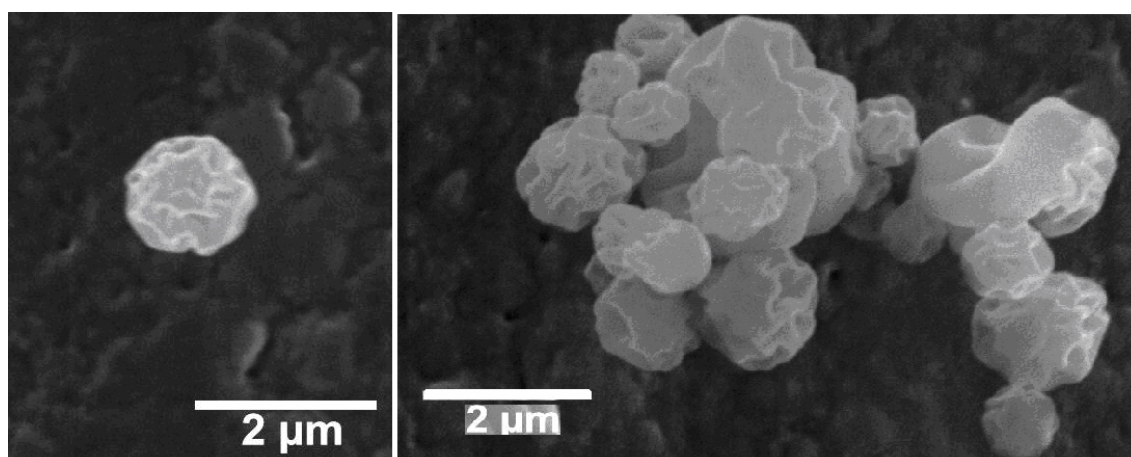


Figura 5.16. Microscopia eletrônica de varredura das partículas.



Figura 5.17. Microscopia óptica de uma cápsula.

5.7. Espectro de Absorção na Região do Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho são provocados pelos diferentes modos de interação da radiação eletromagnética com a molécula (vibração e rotação). Pode ser considerado como uma “impressão digital” do composto.

Para o acompanhamento da reação entre quitosana e MDI o seguinte procedimento foi proposto: análise por espectroscopia na região do infravermelho do produto obtido procurando-se constatar o consumo de reagente (MDI) e a formação da parede polimérica das partículas.

Para esta análise, a Figura 5.18 reúne os espectros de diferentes amostras:

1. Quitosana;
2. Mistura física de quitosana/MDI na proporção 1:1;
3. Partículas de quitosana/MDI, razão mássica quitosana:MDI de 1:2 (Branco 07);
4. Partículas de quitosana/MDI, razão mássica quitosana:MDI de 1:5 (Branco 03).

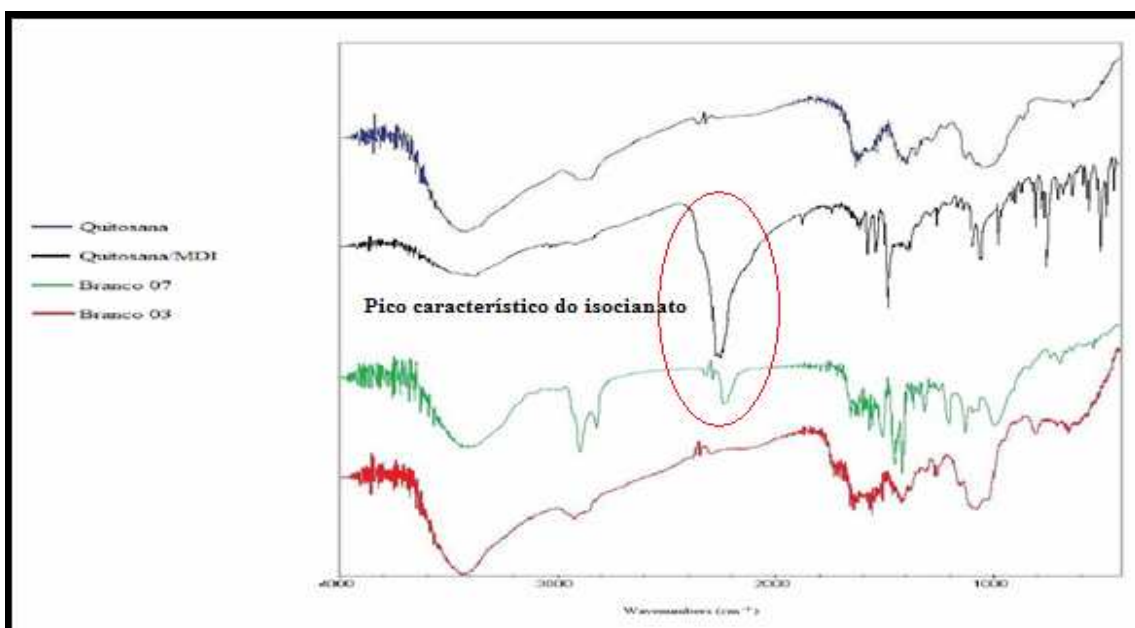


Figura 5.18. Comparação entre os FT-IR.

Como se pode observar na Figura 5.18, o pico característico do MDI é apresentado na mistura física quitosana/MDI, servindo como referência para se observar a presença de MDI residual nas formulações [banda de absorção do isocianato, $-N=C=O$ ($2.275-2.250\text{ cm}^{-1}$)].

O objetivo foi de acompanhar o consumo de MDI, em partículas produzidas com diferentes relações mássicas de quitosana e MDI. Com base nessa informação foi observada a presença de um pico de MDI não reagido no branco 07 e um pequeno pico residual no branco 03, indicando o consumo progressivo do MDI em função da formulação.

Para a reação, onde foi inserido o BZ-3 e o miglyol, as principais bandas de absorção identificadas que indicam a reação entre quitosana e MDI, são:

- Bandas de absorção das aminas primárias e secundárias da quitosana que são respectivamente, 1650 e 1570 cm^{-1} (Choudhari et al., 2007; Huang; Pal; Moon, 1999).

- Banda em torno de 1700 e 1750 cm^{-1} , referente ao grupo funcional da uréia ligada a carbonos (Choudhari et al., 2007; Kurita et al., 1993).

- Bandas em 3.500 cm^{-1} , 1.200 cm^{-1} , referentes aos estiramentos OH e C-N-amina primária que caracterizam os grupos funcionais da quitosana (Fraga et al., 2006).

A Figura 5.19 apresenta o FT-IR das cápsulas de quitosana/MDI com a adição do miglyol e da BZ-3 no sistema. As bandas de absorção dos principais grupos funcionais são apresentadas, onde se observa o consumo do MDI na reação, não apresentando o pico característico do isocianato. Essa informação sugere a ocorrência da reação entre a quitosana e o MDI, como também, a formação da parede polimérica da cápsula.

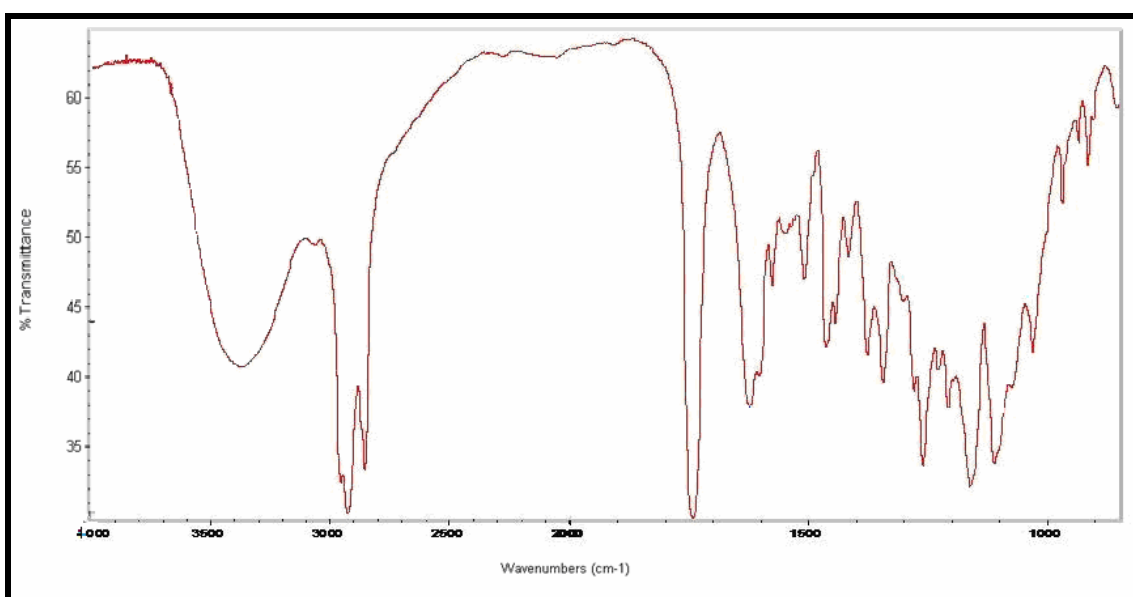


Figura 5.19. FT-IR das cápsulas de quitosana/MDI.

5.8. Análises térmicas

5.8.1. Análise Termogravimétrica (TG) e análise térmica diferencial (DTA) da quitosana.

Foi elaborado um rápido estudo de TG e DTA da quitosana de baixo peso molecular utilizada na produção das partículas. O objetivo foi determinar a faixa de estabilidade térmica da quitosana para um posterior estudo de DSC. Como se pode constatar na Figura 5.20 nas curvas de TG e DTA da quitosana, esta se apresenta estável até temperaturas de cerca de 120°C .

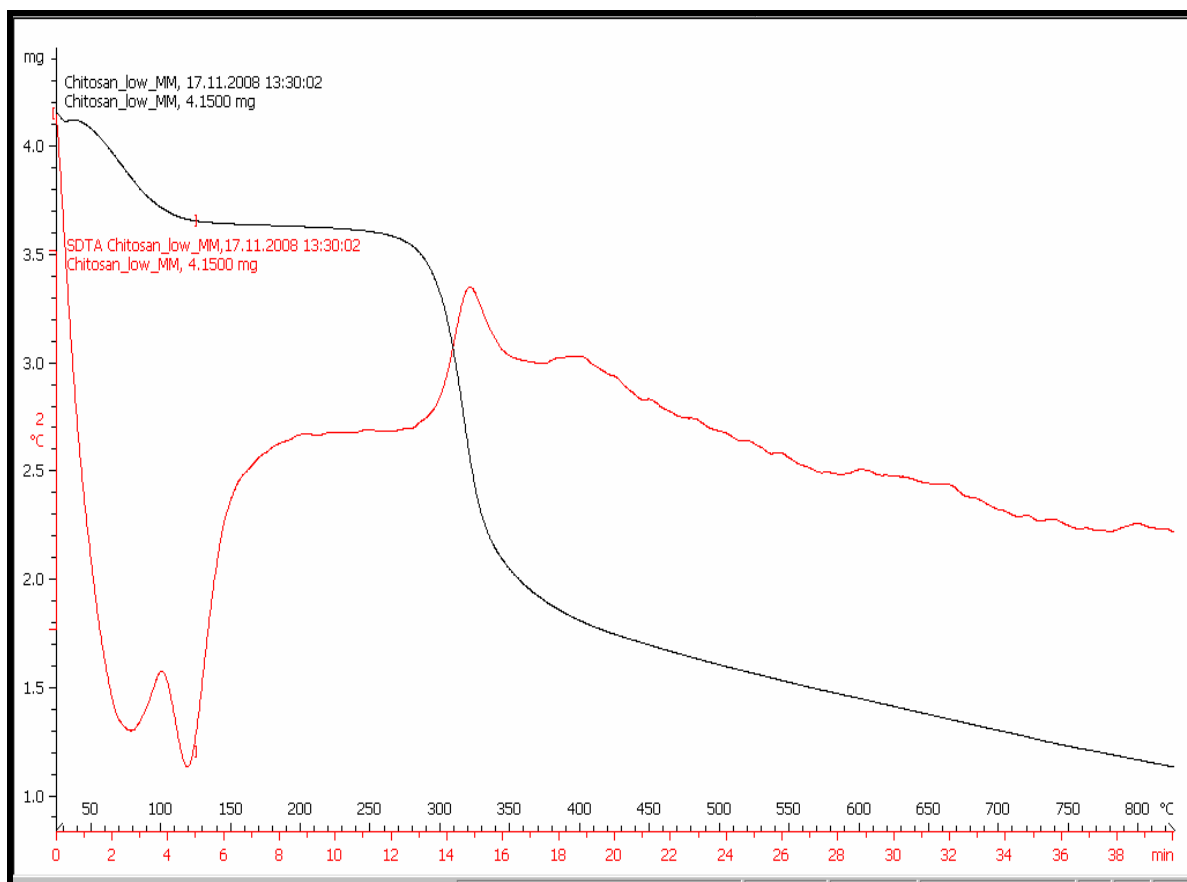


Figura 5.20. Curvas de TG e SDTA da amostra de quitosana de baixo peso molecular.

5.8.2. Análise de calorimetria diferencial de varredura - DSC

A DSC é usada para investigar as propriedades térmicas de materiais orgânicos e inorgânicos. Ela fornece informações quantitativas sobre estas mudanças térmicas incluindo as entalpias de transformação como, por exemplo, de fusão. A Figura 5.21 mostra as curvas de DSC das partículas, onde se observou eventos endotérmicos que não caracterizam as transições térmicas observadas com os materiais puros (quitosana, BZ-3). Pode-se inferir, a partir destes dados experimentais, que o método de encapsulação pela técnica de policondensação interfacial combinada com emulsificação instantânea parece ser eficiente na encapsulação da BZ-3 em partículas de quitosana/MDI, nas duas diferentes concentrações analisadas deste ativo (6,25 e 12,5mg/ml).

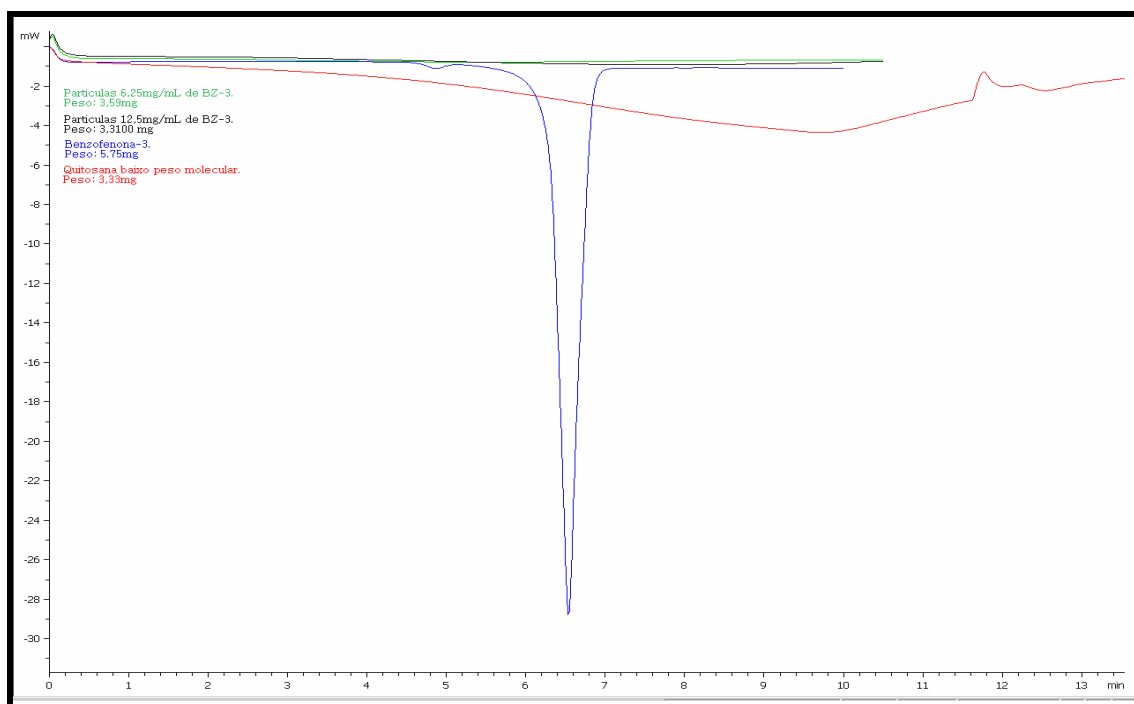


Figura 5.21. Curvas DSC das partículas contendo 6,25 e 12,5 mg/mL de BZ-3, da quitosana e da BZ-3 pura.

5.9. Eficiência de encapsulação

A quantificação nas partículas com 6,25 e 12,5 mg/mL de BZ-3 foi realizado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo metodologia descrita por Sarveiya e colaboradores (2004), modificada. A curva de calibração e as cromatografias das referentes formulações são encontradas no Anexo 1. Teores elevados de BZ-3 foram detectados nas partículas, comprovando a excelente capacidade de encapsulação destes novos sistemas quitosana/MDI com núcleo de miglyol (> 99%), como mostra a Tabela 5.9.

Tabela 5.9. Porcentagem de BZ-3 Encapsulada.

FORMULAÇÃO	% DE BZ-3 ENCAPSULADA \pm DP**
6,25mg/mL	99,4 \pm 3
12,5mg/mL	99,5 \pm 3

** - média e desvio padrão de uma triplicata de medidas

5.10. Potencial Zeta

A Figura 5.22 mostra que as partículas têm carga superficial positiva, e os resultados foram determinados através da média de quinze repetições. Onde se obteve: + 47.4 mV para a amostra de 12,5 5 mg/mL de BZ-3 e + 61 mV para a amostra de 6,25 mg/mL de BZ-3.

As cargas positivas das partículas interagem com tecidos negativamente carregados, tais como pele e cabelo. Essa capacidade bioadesiva das partículas é um aspecto importante para o seu uso em cosméticos.

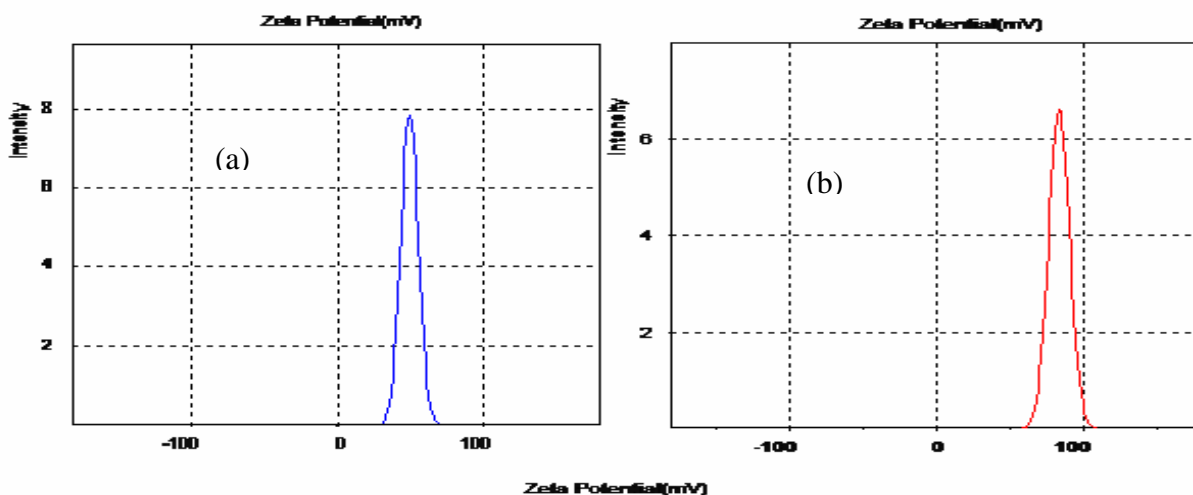


Figura 5.22. Potencial zeta das partículas: (a) 12mg/mL; (b) 6,25mg/mL.

5.11. Determinação do pH

O pH das suspensões de partículas de quitosana/MDI contendo BZ-3 foi determinado em potenciômetro calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas suspensões coloidais. O pH das soluções manteve-se inalterado após a preparação e durante o período de estudo (nove meses), onde apresenta a ordem de 5,6 - 5,7.

5.12. Liberação controlada

Nano e micropartículas poliméricas têm sido estudadas como sistemas de liberação controlada de substâncias ativas. A liberação da BZ-3 dos sistemas aqui desenvolvidos pode ocorrer por difusão pelos poros da matriz, por degradação do polímero ou por uma combinação dos dois mecanismos. Neste trabalho, estudou-se a liberação da BZ-3 dos sistemas desenvolvidos por dois diferentes métodos “*in vitro*”, um livre de membrana (Neubert & Wohlrab, 1990) e outro com a presença da membrana de diálise e uso de etanol como meio receptor (Dittgen, 1998; Venkatraman & Gale, 1998; Dall’Agnol et al., 2006).

5.12.1. Estudo livre de membrana

Como já apresentado anteriormente, o princípio do método é a difusão do ativo do meio em que se encontra (disperso em fase aquosa) para um meio lipofílico de sua afinidade. O objetivo do emprego deste método foi de desenvolver formas comparativas do comportamento dos sistemas com relação à capacidade de liberar o ativo, depois de encapsulá-lo. O estudo difusivo foi realizado durante 24h de contato com o meio lipofílico (miglyol). Os resultados obtidos, expressos na forma de porcentagem de BZ-3 presente no meio lipofílico em função do tempo de contato entre as 2 fases aquosa e oleosa, são apresentados na Figura 5.23.

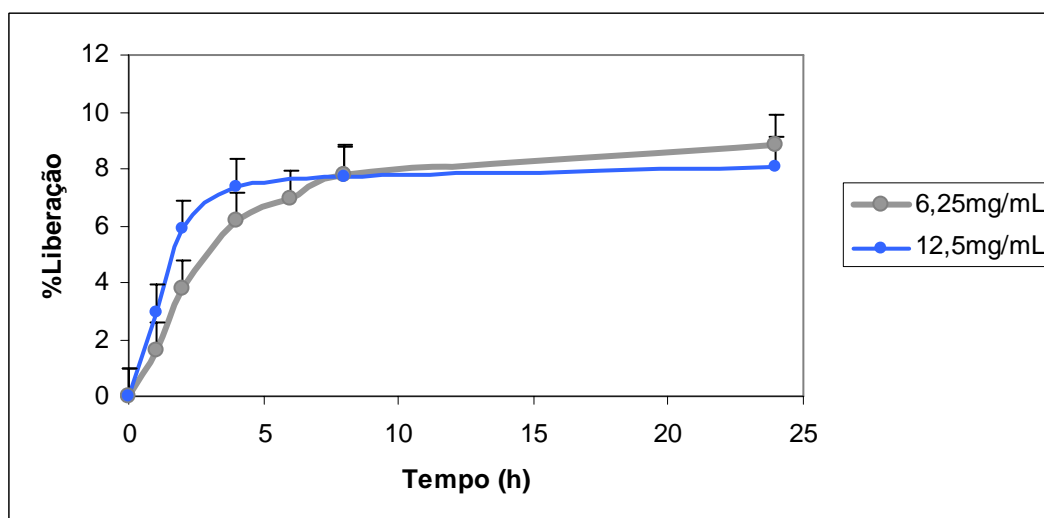


Figura 5.23. Perfis cinéticos de liberação de Bz3 de formulações de partículas quitosana/MDI:
a) 6,25 mg/mL; b) 12,5 mg/mL livre de membrana.

Ambas as curvas apresentam duas fases do processo de liberação, ocorrendo a velocidades diferentes: uma 1ª fase rápida seguida de uma segunda fase de liberação lenta até 24h. Teores muito próximos de BZ-3 foram liberados das formulações preparadas com diferentes teores, o que sugere que a velocidade de liberação independe do teor encapsulado para a faixa estudada.

5.12.2. Estudo de liberação com membrana de diálise

As amostras foram preparadas de acordo com a metodologia descrita no Capítulo 4. A Figura 5.24 apresenta a curva de liberação de BZ-3 da formulação contendo 6,25 e 12,5 mg/ml de BZ-3.

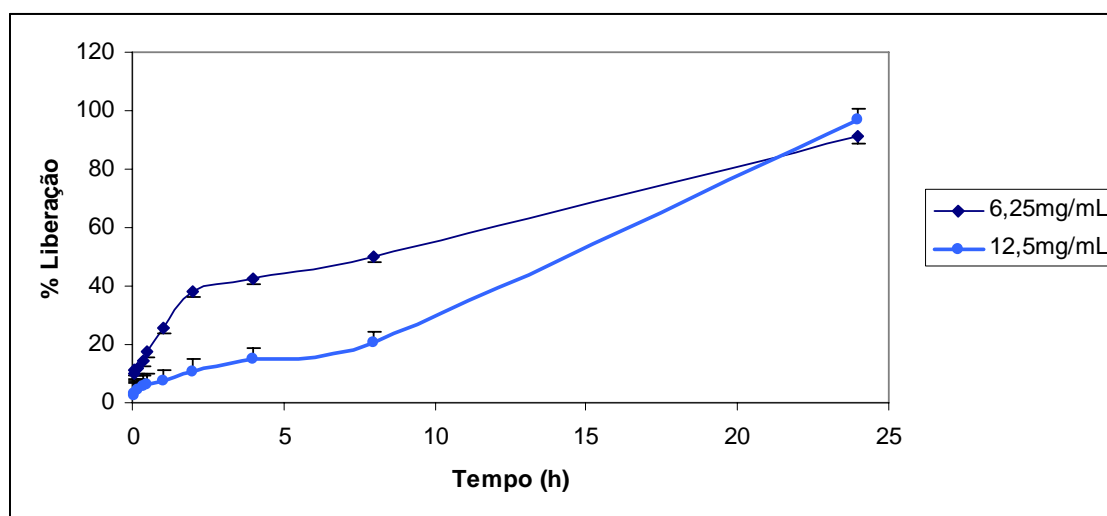


Figura 5.24. Curva de liberação das formulações 6,25 e 12,5 mg/mL em etanol.

A formulação de menor teor de BZ-3 (6,25 mg/mL) apresenta um “burst” de cerca de 40% de liberação do ativo nas primeiras 2 horas em contato com o meio receptor. Este comportamento pode ser devido a fatores como a presença de cristais próximos da superfície, facilmente extraídos das partículas pelo etanol. No entanto, comparando-se com a curva obtida com a formulação contendo maior teor de BZ-3

(12,5 mg/mL), nota-se uma grande diferença de comportamento : - neste segundo caso, o “burst” é inferior a 10% no mesmo período de tempo, no entanto, a curva é caracterizada por uma velocidade praticamente constante ao longo das 24 horas. Nanopartículas já descritas na literatura (Alvarez-Román et al, 2001) apresentam este segundo comportamento, ou seja, velocidade constante de liberação e pequeno “burst”, comportamento atribuído a fatores como hidrofobicidade e cristalinidade elevadas do ativo, que restringem sua difusão para o meio receptor. A inexistência de uma fase burst pronunciada mostra que a BZ-3 encontra-se totalmente encapsulada e não adsorvida à superfície externa das cápsulas.

Ao término das 24 h do estudo, ambas as formulações liberaram cerca de 92% do ativo encapsulado. Algumas considerações sobre estes resultados: as condições de liberação como agitação e quantidade de partículas/volume de solvente não foram exaustivamente estudados, porém, foram utilizadas condições que garantissem a não saturação do meio receptor. Assim sendo, a escolha das condições de liberação bem como do solvente foi baseada no estudo de solubilidade do material encapsulado no solvente de liberação. No entanto, o meio receptor não foi destinado a imitar as condições da pele, sendo adequado para estudos comparativos in vitro de perfis cinéticos de liberação de partículas obtidas de condições diferentes de processo e /ou formulação.

CAPÍTULO 6

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO

Discussão geral e conclusão

A originalidade do trabalho se dá com relação à proposta de um novo sistema de cápsulas constituído de um núcleo oleoso capaz de reter ativos hidrofóbicos e um envoltório polimérico formado por um complexo quitosana-MDI.

Um estudo de condições de processo e composição (como teor de reagentes para a formação da membrana, teor de ativo encapsulado) comprovou a formação destas cápsulas com tamanho na faixa micro (< 2 microns)-submicrométrica (> 900 nm), representativo de uma larga polidispersidade. Pode-se verificar que tais partículas apresentam carga positiva de superfície (> + 40mV) e estabilidade física em suspensão aquosa onde foram analisadas logo após a preparação por 24 horas à temperatura de 40°C e são capazes de encapsular um elevado teor de BZ-3 (> 99%).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, verifica-se que a técnica de policondensação interfacial combinada com emulsificação espontânea empregada é eficiente na formação das cápsulas de quitosana/MDI. A formação da cápsula foi confirmada pelas análises de FTIR, DSC, MET e MEV. Um parâmetro importante neste estudo foi a concentração do MDI, tendo-se verificado através de um planejamento experimental que esta é a variável que mais influenciou o diâmetro da partícula dentro do sistema, nas condições estudadas.

Os resultados obtidos com concentrações de 6,25mg/mL e de 12,5 mg/mL de BZ-3 indicaram a presença de um sistema monomodal e bimodal, respectivamente, com elevado índice de polidispersão. A elevada polidispersidade indicada pela técnica de espalhamento de luz foi confirmada pelas técnicas MEV e MET. As técnicas de MEV e MET foram fundamentais na caracterização da morfologia das partículas contendo BZ-3. Foi possível verificar que as partículas apresentam um formato predominantemente esférico, com uma aparente rugosidade da parede polimérica.

O pH das suspensões de partículas geradas (entre 5 e 6) permaneceu inalterado ao longo do estudo. Estas partículas possuíam carga superficial

positiva (potencial zeta), indício de que estas podem interagir com tecidos negativamente carregados (pele). Os resultados de liberação controlada demonstraram que as formulações são capazes de controlar a liberação da BZ-3 ao longo de 24h.

A avaliação do conjunto dos resultados obtidos demonstra que estas duas formulações de micro e nanocápsulas poliméricas contendo BZ-3 em seu núcleo oleoso são sistemas promissores para o uso em filtros solares

SUGESTÕES DE CONTINUIDADE

O trabalho aqui realizado abre uma nova frente de investigação referente a sistemas de liberação controlada a base de quitosana. Demonstrou-se a viabilidade de geração de cápsulas com núcleo oleoso e parede. No entanto, estes sistemas demandam uma série adicional de testes de avaliação que não foram aqui realizados e que se sugere para uma continuidade do desenvolvimento destes sistemas:

1. Para as formulações já desenvolvidas:

- estabilidade do ativo (BZ-3 é conhecida por ser fotodegradável. É preciso saber se esta formulação protege o ativo da degradação pela luz);

- testes de liberação *in vitro* com outros meios e utilização da célula de difusão de Franz;

- utilização de ultrassom e do Ultra Turrax para promover uma diminuição da gota (fase orgânica), antes do início da formação da parede polimérica;

- testes de Fator de Proteção Solar (FPS) “*in vitro*” e “*in vivo*” das suspensões das partículas.

2. Continuidade ao desenvolvimento destas partículas, aprofundando o estudo de processo e otimização da formulação e da cinética de formação da membrana polimérica visando posterior controle de suas características.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA - BRASIL). Resolução-RDC no 237, de 22 de agosto de 2002. Regulamento técnico sobre protetores solares em cosméticos. Disponível em: [<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=18298&word=>](http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=18298&word=>). Acesso em 18 set. de 2008.

ALVAREZ-ROMÁN, R. et al., *Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 191-195, 2001.

ALVAREZ-ROMÁN, R. et al., *Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles*. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 53-62, 2004.

ALVES, M. P. et al., *Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215-220, 2007.

ANDERSON, J. M.; SHIVE, M. S. *Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres*. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, p. 5-24, 1997.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V. (Ed.) *Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos*. 6. Ed. São Paulo: Premier, 2000. 568p.

BENITA, S. *Microencapsulation – Methods and Industrial Applications*, New York: Marcel Dekker Inc, V.73, p. 1-640, 1996.

BENITA, S.; LEVY, M.Y. *Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization*. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 82, p. 1069-1079, 1993.

BENOIT, M. A. *Advances in Production Technology*, In: BENITA, S. New York: Marcel Dekker Inc, v. 73, p. 35-72, 1996.

BARROS NETO, B; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2001.

BOUCHEMAL, K. et al., *Microencapsulation of Dehydroepiandrosterone (DHEA) with poly(ortho esters) polymers by interfacial polycondensation*. **Journal of Microencapsulation**. v. 20, p. 635-651 , 2002.

BOUCHEMAL, K. et al., *Synthesis and characterization of polyurethane and poly(ether urethane) nanocapsules using a new technique of interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification*. **International Journal Pharmaceutics** v.269, p.89-100, 2004 (a).

BOUCHEMAL, K. et al., *Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280 (1-2), p. 241-251, 2004 (b).

BOUCHEMAL, K. et al., *Simultaneous emulsification and interfacial polycondensation for the preparation of colloidal suspensions of nanocapsules*. **Materials Science and Engineering**, v. 26, p. 472 – 480, 2006.

CAMPANA, S. P.; DESBRIÈRES, J. *Chitin, Chitosan and Derivatives*. **Natural Polymers and Agrofibers Composites**; (E. Frollini; A. Leão; L.H.C. Mattoso eds.), USP; UNESP; EMBRAPA. P.41-71, 2000.

CHANG, A.C., GRANATO, T.C., Page, A.L. *A methodology for establishing phytotoxicity criteria for Cr, Cu, Ni, and Zn in agricultural land application of municipal sewage sludges*. **J. Environ. Qual.**, v. 21, p. 521–536, 1992.

CHENG X.Y., LIANG J.X., LI Q.G., *Construction of RNA-containing virus-like nanoparticles expression vector with cysteine residues on surface and fluorescent decoration*, **Yi Chuang Xue Bao**, v. 32, p. 874–878, 2005.

CHISVERT, A.; SALVADOR, A. *Determination of water-soluble UV-filters in sunscreen sprays by liquid chromatography*. **J. Chromatogr.**, v.977, p. 277 – 280, 2002.

CHOU DHARI S. K. et al., *Development of novel blocked diisocyanate crosslinked chitosan membranes for pervaporation separation of water–isopropanol mixtures*, **Journal of Membrane Science**, v. 302, p. 197–206, 2007.

CLEGG, D.W.; COLLYER A. A. -"Irradiation Effects on Polymers", Elsevier Applied Science, London, 1991.

COLLINS, P.; FERGUSON, J. *Photoallergic contact dermatitis to oxybenzone*. **Br. J. Dermatol.** v. 131, p. 124-29, 1994.

COUVRER, P. et al., *Nanocapsules technology: a review*. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, n.2, p. 99-134, 2002.

COUVRER, P. *Acute renal toxicity of doxorubicin (adriamycin)-loaded cyanoacrylate nanoparticles*, **Pharmaceutical Research**, v. 12 (1), p. 85-87, 1995.

CROSS, S.E. et al., *Probing the effect a vehicles on topical delivery: Understanding the Basic Relationship Between Solvent and Solute Penetratrion Using Silicone Membranes*. **Phamarceutical Reshearch**, V. 18, n 7, p. 99-1005, 2001.

DALL'AGNOL et al., *Microesferas de blendas poliméricas biodegradáveis: comparação dos perfis de liberação dos pesticidas malation e cipermetrina*. In:SBPC 58, 2006, Florianópolis. Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC

DAOUD-MAHAMMED, S.; COUVREUR, P.; GREF, R. *Novel selfassembling nanogels: Stability and Iyophilidation studies*. **International Journal Pharmaceutics**, v.332, p. 185-191, 2007.

DINGLER, A. et al., *Gohlas. Solid lipid nanoparticles (SLN) tm/ Lipopearls™ - a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products*. **Journal Microencapsulation**, v.16, n.6, p. 751-767, 1999.

DINUNZIO, J.E.; GADDE, R.R, *Determination of sunscreen compounds in topical sunscreen products*. **Journal Chromatography.**, v. 519, p. 117 – 124. 1990.

DIT TGEN, M. *Transdermale therapeutische systeme*. **Med. Monatsschr. Pharm.** v. 21 p. 365–377, 1998.

DURÁN, N.; MARCATO, P. D.; TEIXEIRA, Z. *Nanotecnologia e Nanobiotecnologia: Conceitos Básicos*. Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, Brasil, 2007.

EPIC, Disponível em: <<http://www.epic4health.com/tween80isits.html>>. Acesso em 17/11/2008.

FILHO, N. A.; OLIVEIRA, A. G. *Sistemas de micro/nanoencapsulação de fármacos*. **INFARMA**, Brasília, v. 9, 18-21, 1999.

FISHBINE, G. *The investor's guide to nanotechnology & micromachines*. New York: John Wiley & Sons, 2002.

FLOR, J.; DAVOLOS, M.R.; CORREA, M.A. *Protetores Solares*. **Química Nova**. V. 30, n.1, p. 153-158, 2007.

FLOYD, A. G. *Top ten considerations in the development of parenteral emulsions*, **Pharmaceutical Science Technology**, v.2, p. 134-143, 1999.

FRAGA, A. F. et al., *Ensaio mecânico de membranas de quitosana recobertas com hidroxiapatita: efeito da adição de hidróxido de sódio*, 17º CBECIMat, 2006, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

FRANZ T.J., *Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data*, **Invest. Dermatol.**, v. 64, p.190–195, 1975.

FRÈRE, Y., DANICHER, L., GRAMAIN, P. *Preparation of polyurethane microcapsules by interfacial polycondensation*. **Eur. Polym. J.** v. 34, p. 193–199, 1998.

FRONZA, T., CAMPOS, A.; TEIXEIRA, A, H, . *Nanoemulsões como Sistemas de Liberação para Fármacos Oftálmicos*. **Acta Farmaceutca Bonarense**, v.23, n.4, p. 258-266, 2004.

FRONZA, T.; GUTERRES, S. S.; POLHLMANN, A. R; TEIXEIRA, H. **Nanocosméticos: Em direção ao estabelecimento de marcos regulatórios**, 1 ed. Porto Alegre: Gráfica da UFRGS, 2007

GAGLIARDI, L.; CAVAZZUTTI, G.; MONTANARELLA, L. et al. *Determination of sunscreens agents in cosmetic product by reversed-phase high-performance liquid chromatography, part II.* **J. Chromatogr.**, v. 464, p. 428 – 433. 1989.

GALEMBECK, F. *Polímeros e nanotecnologia.* **Polímeros - Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 3, p. 166-172, 2003.

GIBBS, B. F. et al., *Encapsulation in the food industry: a review.* **Internation Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.50, p. 213-224, 1999.

GOOSEN, M. E. A – “*Applications of chitin and chitosan*”, Technomic Publishing Company, Lancaster , 1996.

GUIMARÃES, L.F.L., COLLINS, C.H. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. *Introdução a métodos cromatográficos.* São Paulo : Unicamp, 1997. p. 183-195.

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

HAINES, P.J. *Thermal methods of analysis: principles, applications and problems.* London: Blackie Academic & Professional, 1995. 286p.

HAYDEN, C.G.J. et al. *Systemic absorption of sunscreen after topical administration.* **Lancet**. v. 350, p. 863-864, 1997.

HUANG R.Y.M., PAL R., MOON G.Y., *Crosslinked chitosan composite membrane for the pervaporation dehydration of alcohol mixtures and enhancement of structural stability of chitosan/polysulfone composite membranes,* **Journal of Membrane Science**, v. 160, p. 17, 1999.

IKEDA, K.; SUZUKI, S.; WATANABE, Y. *Determination of sunscreens agents in cosmetic product by reversed-phase high-performance liquid chromatography.* **J. Chromatogr.**, v. 482, p. 240 – 245, 1989.

INFARMA nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso, 2005. Disponível em: <www.cff.org.br/revistas/47/infnanocapsulas.pdf>. Acesso em setembro de 2008.

INOVABRASIL desafios dos nanomateriais 22/08/2007. Disponível em: <<http://inovabrasil.blogspot.com/2007/08/desafios-dos-nanomateriais.html>>. Acesso em agosto de 2008.

JABBARI, E., KHAKPOUR, M., *Morphology of and release behavior from porous polyurethane microspheres*. **Biomaterials**, v. 21, p. 2073–2079, 2000.

JANSSEN R.Q. F., *Polymer Encapsulation of Titanium Dioxide*, Ph. D. dissertation, Eindhoven University of Technology, 1995.

JIANG, Y et al., *Application of chitosan nanoparticles dispersion system in skin burn*. *Institute of Medical Bioengineering*, **Zhongguo Linchuang Kangfu**, v. 10, p. 64-66, 2006.

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

JIN, J.; SONG, M.; HOURSTON D.J, *Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties*, **Biomacromolecules**, v. 5, p.162 , 2004.

KESSLER, R.J. *Lipid emulsions applied to drug delivery*. **Lipid Technology Newsletter**, v. 7, n. 3, p. 59-63, 2001.

KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H.W. *Photoprotection*. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 52, p. 937-958, 2005.

KURITA, K. et al., *Preparation and biodegradability of chitin derivatives having mercapto groups*, **Carbohydr. Polym.**, v. 20, p. 239, 1993.

LASIC, D. *Liposomes: from physics to applications*. Amsterdam, Elsevier, 1993;

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

LEGRAND, P. et al., *Polymeric nanocapsules a drug delivery systems a review*. **STP. Pharma Science**, v. 9, p. 411-418, 1999.

LEMARCHAND, C. et al., *Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Tubiscan*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, p. 77-82, 2003.

LEVY, M.Y.; BENITA, S. *Design and characterization of submicronized o/w emulsion of diazepam for parenteral use*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 54, p. 103-112, 1989.

LI, Q. *Applications and Properties of Chitosan*. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 7, p. 370-397, 1992.

LIMA, K. M., RODRIGUES-JÚNIOR, J. M. *Poly-DL-lactide-co-glycolide microspheres as a controlled release antigen delivery system*. **Braz. J. Med. Bio. Res.**, v. 2, p. 171-180, 1999.

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

MAGDASSI, S. *Delivery Systems in Cosmetics*. **Colloids Surface** v.123-124, p.671-679, 1997.

MAIA, J.L.; SANTANA, H.A.; RÉ, M.I., *The effect of some processing conditions on the characteristics of biodegradable microspheres obtained by an emulsion solvent evaporation process*. **Braz. J. Chem. Eng.** V. 21, p. 1-12, 2004.

MALAIYA, A., VYAS, S.P., *Preparation and characterization of indomethacin magnetic nanoparticles*. **J. Microencapsulat.** v. 5, p. 243-253, 1988.

MAPRIC, Tween80, disponível em: < http://www.mapric.com.br/anexosboletim544_21052008_113145.pdf>. Acesso em dezembro de 2008.

MARTINDALE, *The complete drug reference*. 32 ed. London: Pharmaceutical Press, p. 1486-1487, 1999.

MATOS, J.R.; MACHADO, L.D.B. *Análise térmica – termogravimetria*. In: CANEVAROLO JUNIOR., S.V., (Ed.). *Técnicas de caracterização de polímeros*. São Paulo: Artliber, 2004. p.209-228.

MENGUAL, O. et al., *Characterization of instability of concentrated dispersion by a new optical analyzer: the TURBISCAN MA 1000*. **Colloids and Surfaces A**, v. 152, p. 111-113, 1999.

MONTASSER, I. et al., *Procede de préparation de particules colloïdales sous forme de nanocapsules*. World Patent. WO0168235, 2001.

MORARU, C. I., PANCHAPAKESAN, C. P., HUANG, Q. *Nanotechnology: A New Frontier in Food Science*. **Food technology**, v.57, Dec., n.12, 2003;

MOURA M. R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H.C. *Preparation of chitosan nanoparticles using methacrylic acid*. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 321, p. 477–483, 2008.

MÜLLER-GOYMAN, C.C. *Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and a nanoparticles for topical administration*. **European Journal of Pharmaceuticals Biopharmaceuticals**, v. 58, p. 343-346, 2004.

NACHT, S. *Encapsulation and other topical delivery systems*. **Cosmetics Toiletries**. v.110, p.25-30, 1995.

NANOBIOTECNOLOGIA, espaço ciência viva, Disponível em: < <http://www.cienciaviva.org.br/arquivo/cdebate/012nano/nanobio.html>>. Acesso em: 10 de novembro de 2008.

NATURA, Nanotecnologia em cosméticos, disponível em: <http://www.usp.br/prp/nanotecnologia/index_arquivos/secundarias/eventos_rede/apresentacoes/natura.pdf>

Acesso em dezembro de 2008.

NEDOROST, S.T. *Facial erythema as a result of benzophenone allergy*. **J. Am. Acad. Dermatol.** v. 49, p. 259-261, 2003.

NEUBERT R., WOHLRAB W., *In vitro methods for the biopharmaceutical evaluation of topical formulations*, **Acta Pharm. Technol**, v. 36, p. 197–206, 1990.

NICOLAU, D. E. et al., *Nanotechnology at the crossroads: the hard or the soft way*. **Microelectronics Journal**, v.31, p. 611-616, 2000.

NIWA, T. et al., *Preparation of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with L lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior*. **Journal Controlled Release**, v. 25: p. 89-98, 1993.

OKEREKE, C.S. et al. *Safety evaluation of benzophenone-3 after dermal administration in rats*. **Toxicol. Lett.** v. 80, p. 61-67, 1995.

OLIVEIRA, F.F et al., *Estudo exploratório do comportamento térmico e caracterização físico química e analítica de amostras de óleo de pinho*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISE TÉRMICA E CALORIMETRIA, 5., Poços de Caldas, 2006. Livro de resumos. Poços de Caldas: ABRATEC, 2006. p.94.

OLIVEIRA, F.F.; PAOLA, M.V.R.; MATOS, J.R. *Análise térmica aplicada aos produtos cosméticos*. **Cosmet. Toiletries, Carol Stream**, v.16, n.3, p.52-54, 2004.

OLVERA-MATÍNEZ, B. et al., *Preparation of polymeric nanocapsules containing octyl methoxycinnamate by the emulsification-diffusion technique: penetration across the stratum corneum*. **Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 94, n.7, p. 1552-1559, 2005.

OXITENO, Span 80, disponível em: <<http://www.oxiteno.com.br/aplicacoes/mercados/doc/documento.asp?produtoMarca=151501723121732044622111670893&idioma=PO&r=.pdf>> . Acesso em dezembro de 2008.

PAESE, K. *Desenvolvimento tecnológico, estudo da fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea in vitro da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos*. 2008, 213 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Programa De Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PÉREZ GONZÁLES, M.L.L et al., *Estudo termoanalítico de filtro solares*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISE TÉRMICA E CALORIMETRIA, 4., Congresso Pan Americano de Análise Térmica e Calorimétrica, 2., Alfenas, 2004. Livro de resumos. Alfenas: ABRATEC, 2004. p.35.

PERIOLI, L. et al., *Use of anionic clays for photoprotection and sunscreen photostability: hydrocalcites and phenylbenzimidazole sulfonic acid*. **J. Phys. Chem. Solids**, Amsterdam, v.20, p.1079- 1083, 2006.

PICOS, D. R.; CARRIL, M. G.; MENA, D. F. *Microesferas biodegradables de liberación controlada para administración parenteral*. **Rev. Cubana Farm.**, v.34, n.1, 2000.

POLIURETANOS, isocianatos, disponível em: <<http://www.poliuretanos.com.br/Cap1/131Isocianatos.htm>>. Acesso em dezembro de 2008.

POLYMAR 2007, Propriedades importantes da quitosana, disponível em: <www.polymer.com.br/produtos/lv_quitosana/cap12.pdf>. Acesso em dezembro de 2008.

POLYMAR 2008, o uso da quitosana em cosméticos, disponível em: <www.polymer.com.br/materiaprima/arquivos/quitosana_comestico.pdf>. Acesso em dezembro de 2008

POUTON, C.W. *Formulation of self-emulsifying drug delivery systems*. **Advanced drug delivery reviews**, v. 25, p.47-58, 1997.

RASTOGI, S.C.; JENSEN, G.H. *Identification of UV filters in sunscreen products by high-performance liquid chromatography – diode-array detection*. **J. Chromatogr.**, v. 828, p. 311 – 316, 1998.

RÉ, M. I. *Microencapsulação em busca de produtos inteligentes*. **Ciência Hoje**, v.27, p. 24-29, 2000.

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

RIETH, M. *Nano-engineering in science and technology: an introduction to the world of nano-desing. Series on the Foundations of Natural Science and Technology*, World Scientific, v. 6, 2003.

ROBERTS, G. A. F. - "*Chitin Chemistry*", The Macmillan Press, London (1992).

ROCCO, M, C. *Reviews of national programs in nanoparticle and: nanoparticle and nanotechnology research in the USA*. **Journal of Aerosol Science**, v. 29, p. 749-766, 1995.

ROCCO, M. C.; BAINBRIDGE, W. S. *Societal implications of nanoscience and nanotechnology*. NSET Workshop Report, National Science Foundation, 2001.

ROCCO, M. C.; WILLIAMS, R.S. Alivisatos P. **Nanotechnology research directions: Vision for Nanotechnology R&D in the Next Decade**, NSTC/CT/IWGN Workshop Report, 1999. Disponível em: <<http://itri.loyola.edu/nano/IWGN.research.directoins/>> . Acesso em outubro de 2008.

SALVADOR, A.; DE LA OSSA, M.D.; CHISVERT, A. *Determination of butyl methoxydibenzoylmethane, benzophenona-3, octyl dimethyl PABA and octyl methoxycinnamate in lipsticks*. **Int. J. Cosmetic Science**, v. 25, p. 97 – 102. 2003.

SANT'ANNA, J. P. **Minúsculas Partículas, grandes negócios**. Disponível em <<http://www.quimica.com.br/qd443/nanotecnologia1.html>> Acesso em abril de 2007.

SANTORO, M.I.R.M. et al., *Stability analysis of emulsions containing UV and IR filters*. **Cosmet. Toiletries, Carol Stream**, v.115, n.12, p.55-62, 2000.

SANTOS, J.E.; SOARES, J.P.; DOCKAL, E. *Caracterização de quitosana comerciais de diferentes origens*. **Polím.: Ciênc. Tecnol.**, São Carlos, v.13, n.4, p.242-249, 2003.

SANTOSH K. et al., *Development of novel blocked diisocyanate crosslinked chitosan membranes for pervaporation separation of water–isopropanol mixtures*, **Journal of Membrane Science**, v. 302, p. 197–206, 2007.

SARVEIYA, V.; RISK, S.; BENSON, H.A.E. *Liquid chromatographic assay for common sunscreen agents: application to in vivo assessment of skin penetration and systemic absorption in human volunteers*. **J. Chromatogr.**, 803, p. 225-231, 2004.

SASOL Reaching New Frontiers, disponível em: <http://abstracts.aapspharmaceutica.com/ExpoAAPS07/Data/EC/Event/Exhibitors/263/cb63fb76-28f4-4948-a6d0-ae249dae9c30.pdf>>. Acesso em 01/12/2008

SCALIA, S. *Determination of sunscreen agents in cosmetic products by supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography*. **J. Chromatogr.**, v. 870, p. 199-205, 2000.

SCALIA, S.; VILLANI, S.; CASOLARI, A. *Inclusion complexation of the sunscreen agent 2-ethylhexyl-pdimethylaminobenzoate with hidroxypropyl-âcyclodextrin: effect on photostability*. **J. Pharm. Pharmacol.**, Wallingford, v.51, n.12, p.1367-1374, 1999.

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

SCHLUMPF, M. et al. *Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters – an update*. **Toxicology**. v. 205, p. 113-122, 2004.

SEEMAN, N.C. *DNA nanotechnology*. **Materials Today**, p.24-29, 2003.

SHAATH, N.A. *Sunscreens Development, Evaluation, and Regulatory Aspects*. New York: Marcel Dekker, p. 589-600, 1997.

SHIM, J. et al., *Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles*. **Journal of Controlled Release**, v. 97, p. 477-484, 2004.

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

SILVA, M.A.S.; NACCO, R.; MATOS, J.R. *Determinação da estabilidade de emulsões pelo uso de análise térmica*. In: SEMINÁRIO DA PÓS-GRADUAÇÃO DA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA USP, 9., São Paulo, 1994. Resumos. São Paulo: FCF/ USP, 1994. p.46.

SKOOG, D.A.; LEARY, J.J. *Principles of instrumental analysis*. 4th ed., Philadelphia: Saunders College, 1992.

SMYRNIOTAKIS, C.G.; ARCHONTAKI, H.A. *Development and validation of a non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of four chemical UV filters in care formulations*. **J. Chromatogr.**, v. 1031, n. 1/2, p. 319-324, 2003.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R. *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices*. **Journal Controlled Release**, v. 1, n.70, p. 1- 20, 2001.

SPARKS, R. E. *Microencapsulation*. In “*Encyclopedia of Chemical Technology*” ed. Kirk-Othemer. #rd ed., v. 15, p. 470. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1981.

SUZUKI, T. et al. *Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens*. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 203, n. 1, p. 9-17, 2005.

SZEJTLI, J. *Cyclodextrin Technology*. **Dordrecht, Kluwer Academic Publishers**, 1988.

SZNITOWSKA, et al., *Submicron emulsion as drug carriers: Studies on destabilization potential of various drugs*. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 12, p. 175-179, 2001.

TAMAMI, B.; KOOHMAREH, G. A. *Synthesis and characterization of polyureas derived from 4-aryl-2,6-bis(4-isocyanatophenyl)pyridines*. **Designed Monomers and Polymers**, Vol. 10, No. 3, p. 221–233, 2007.

THARANATHAN R.N. & PRASHANTH K.V. H. *Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potentialdan overview*. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 117- 131, 2007.

UMBACH, V. *Kosmetik: Entwicklung, Herstellung u. Anwendung Kosmestischer Mittel*. **Stuttgart: Thieme Verlag**, 1995.

URBACH, F. *The historical aspects of sunscreens*. **J. Photochem. Photobiol.**, v. 64, p. 99 – 104, 2001.

VANQUERP, V., RODRIGUEZ, C., COIFFARD, C. *High-performance liquid chromatographic method for the comparison of the photostability of five sunscreen agents*. **J. Chromatogr.**, n. 832, p. 273 –277, 1999.

VENKATRAMAN, S.; GALE, R. *Skin adhesives and skin adhesion* . **Transdermal drug delivery systems and Biomaterials** v.19, p. 1119–1136, 1998.

VERNA et al., *Particle size of liposomes influnces dermal delivery of substances into skin*. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 258, p. 141-151, 2003.

WANG, J. J. et al., *Submicron lipid emulsion as a drug delivery system for nalbuphine and its prodrugs*, **Journal of Controlled Release**, v. 115, n. 2, p.140-149, 2006.

WEISS, V. *Avaliação Tecnológica de Suspensões e Nebulizados de Nanocápsulas e Nanoesferas contendo Indometacina*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2001.

WEISS-ANGELI, V., *Desenvolvimento e caracterização de formulações fotoprotetoras contendo nanocápsulas*. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2007.

WELSS, T.; BASKETTER, D. A.; SCHRÖDER, K. R. *In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models*. **Toxicol. in Vitro**. v.18, p. 231-243, 2004.

WENDLANDT, W.W. Thermal analysis. 3.ed. New York: John Wiley & Sons, 1986. p.1. (Chemical analysis, v.19).

WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H. *Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration*. **Journal Controlled Release**, v. 81, p. 225-233, 2002.

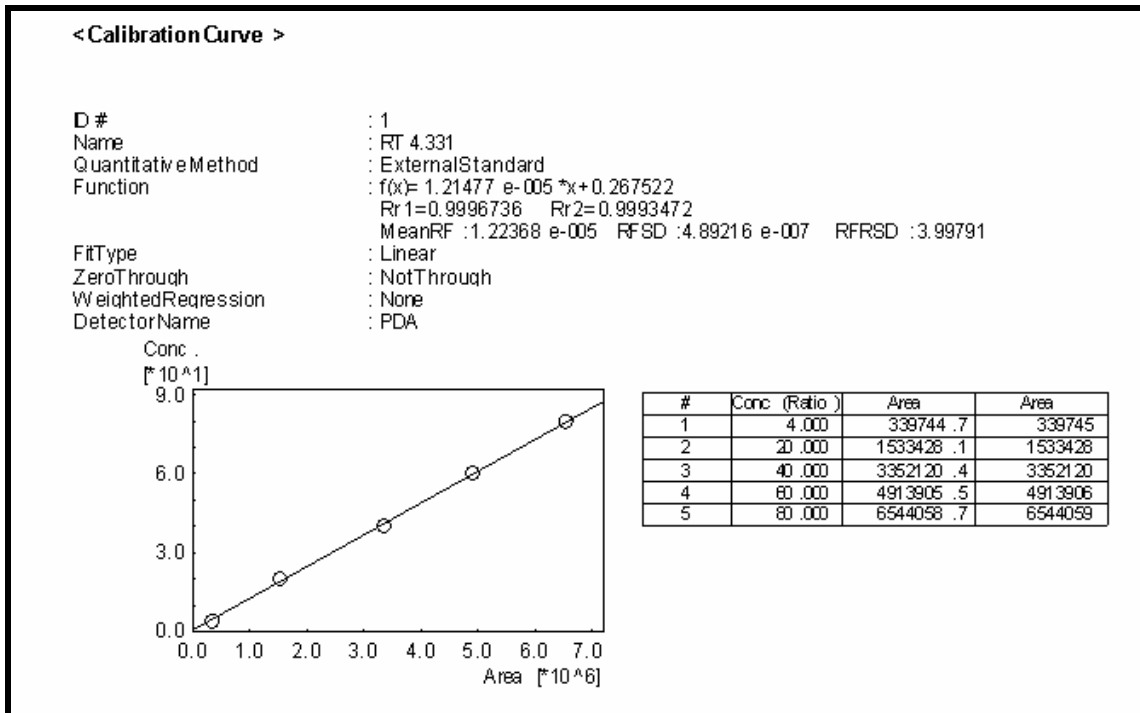
WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H. *Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN)*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, p. 65-68, 2003.

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

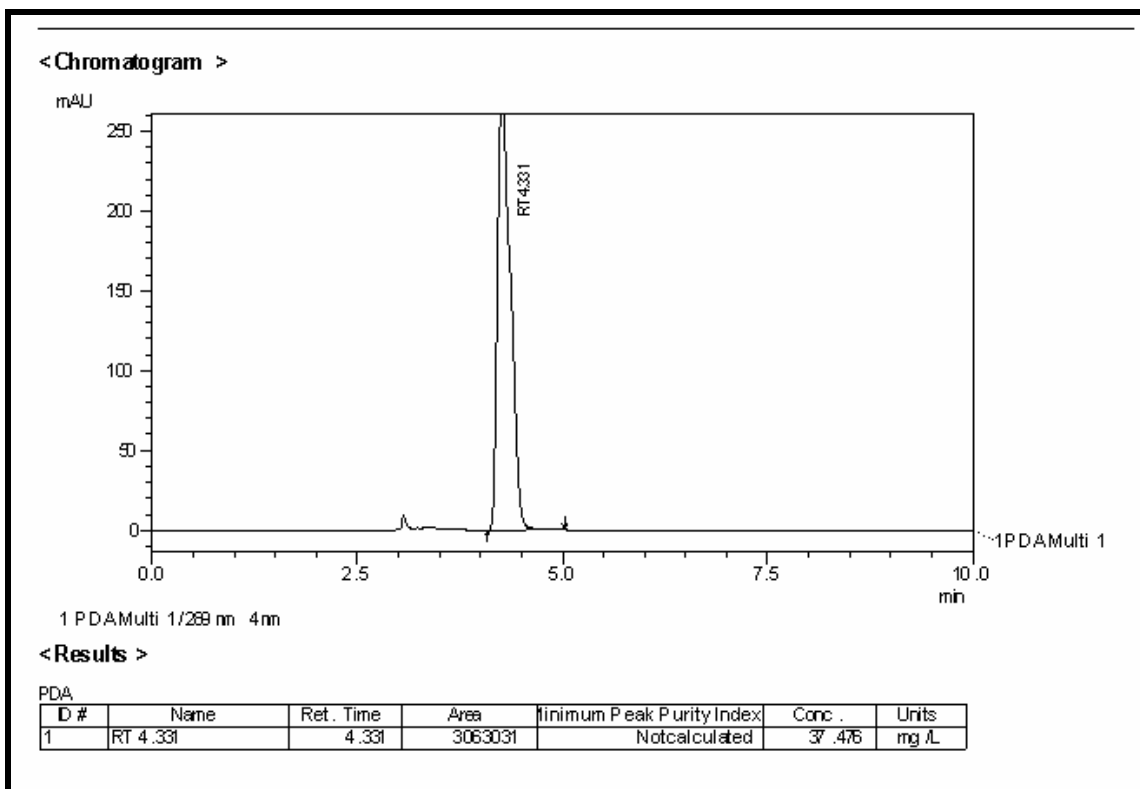
YU, W., et al., *A novel approach to the preparation of injectable emulsions by spontaneous emulsification process*. **Internatonal Journal of Pharmaceutics**, v. 89 , p. 39–146, 1993.

ANEXOS

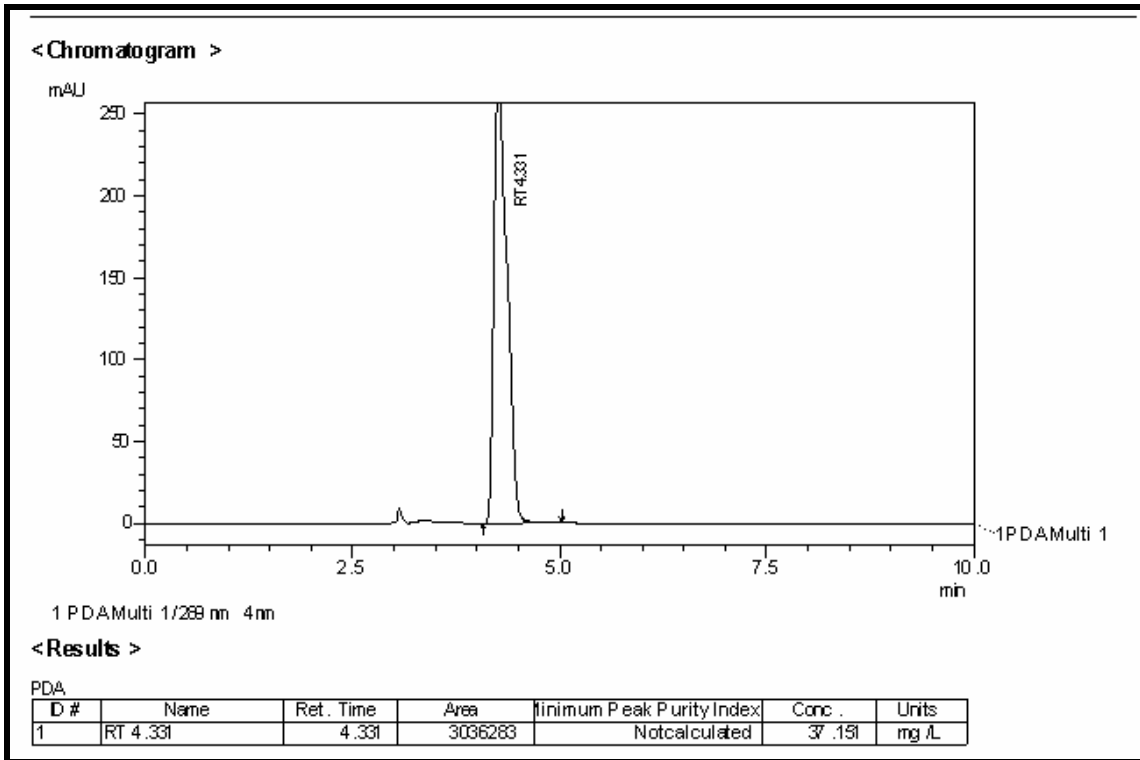
Anexo 1.



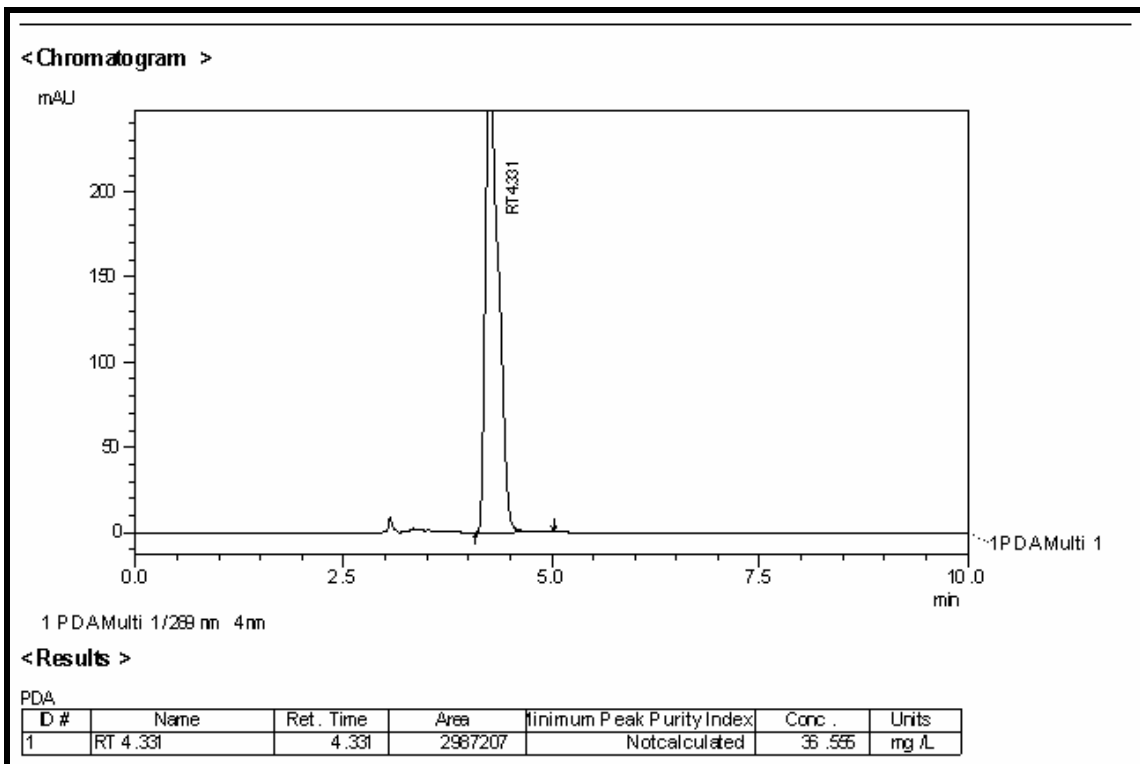
Curva de calibração para estudo de quantificação da BZ-3 encapsulada.



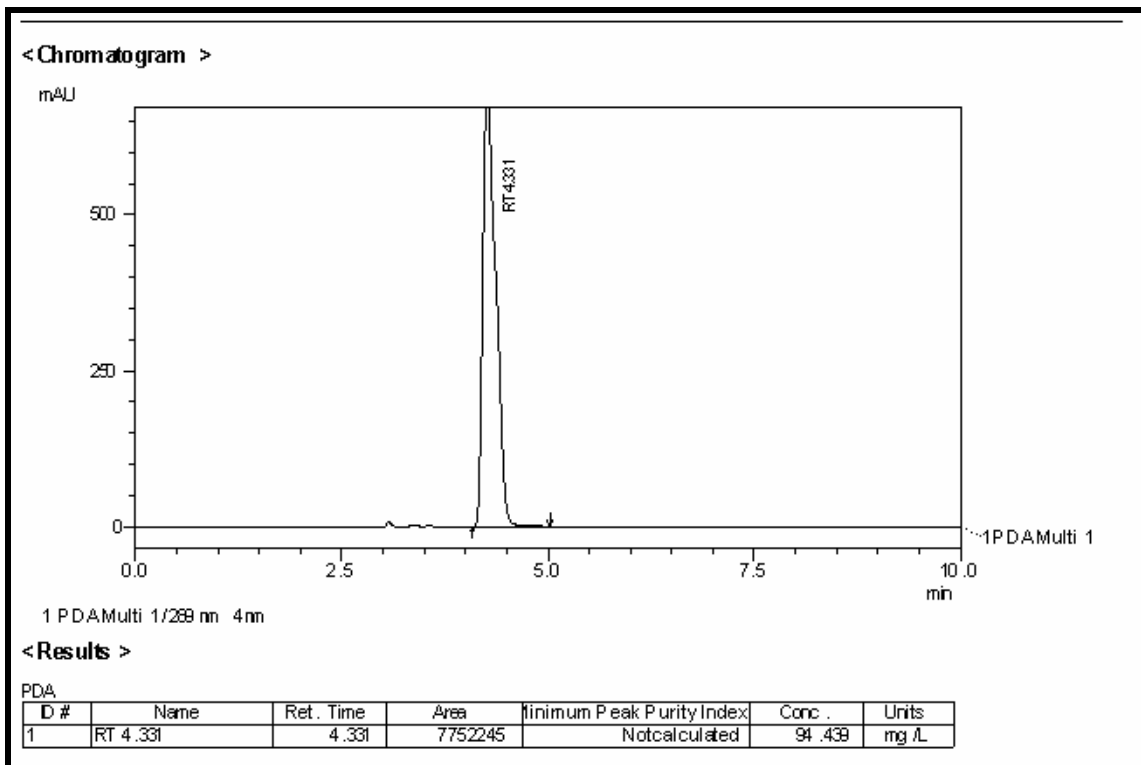
CLAE 1ª triplicata da formulação contendo 6,25 mg/mL de BZ-3.



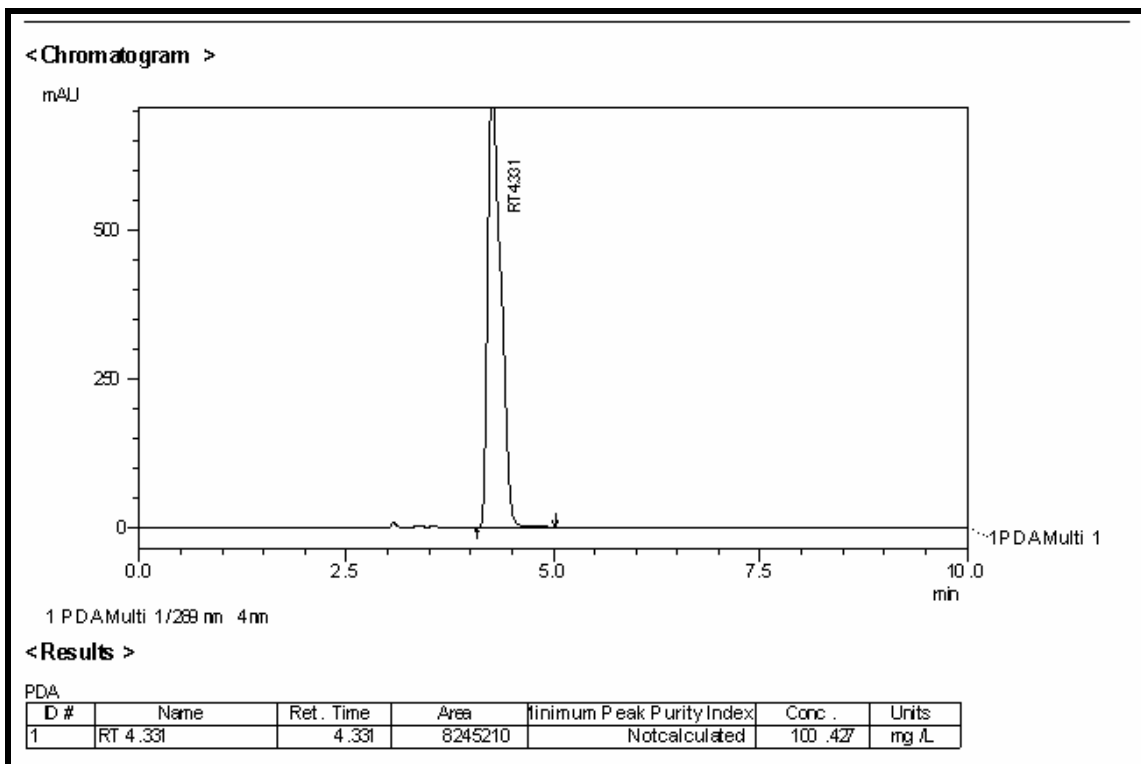
CLAE 2º triplicata da formulação contendo 6,25 mg/mL de BZ-3.



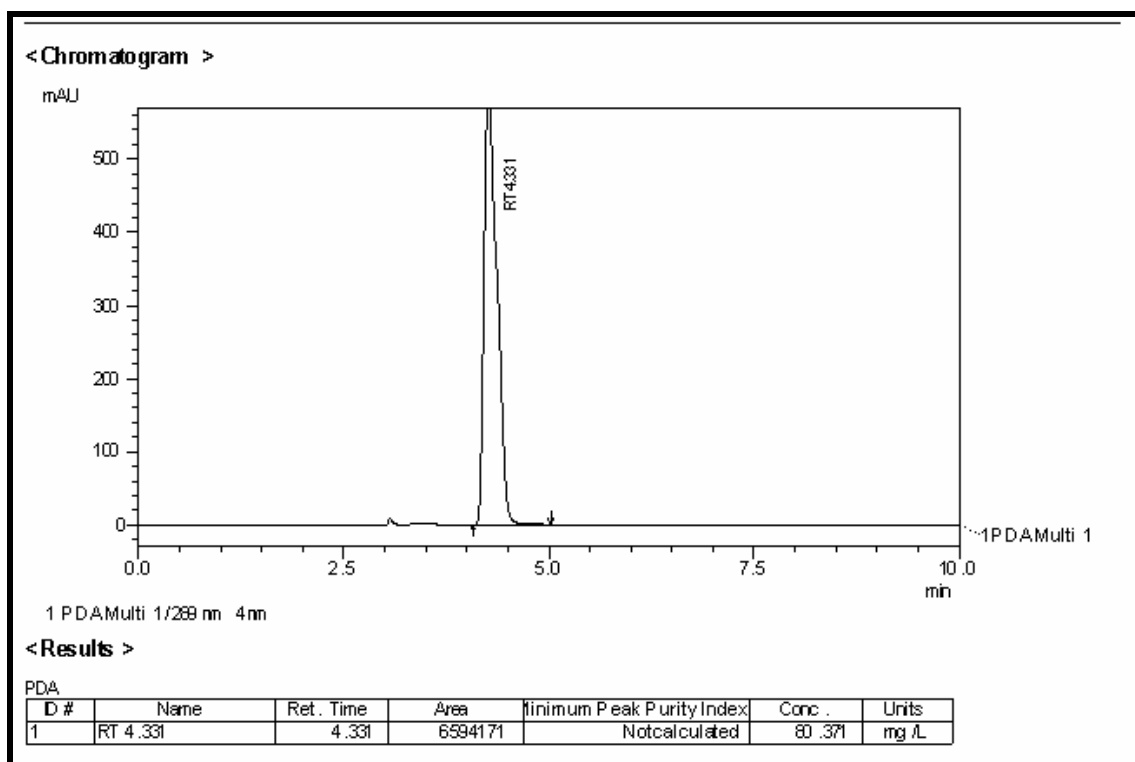
CLAE 3º triplicata da formulação contendo 6,25 mg/mL de BZ-3.



CLAE 1° triplicata da formulação contendo 12,5 mg/mL de BZ-3.

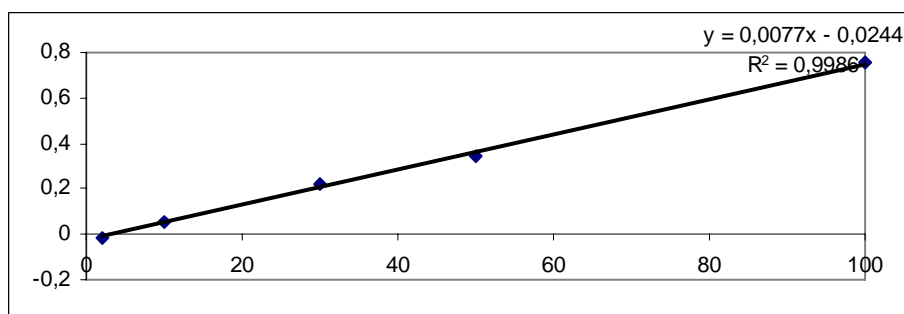


CLAE 2° triplicata da formulação contendo 12,5 mg/mL de BZ-3.



CLAE 3º triplicata da formulação contendo 12,5 mg/mL de BZ-3.

Anexo 2



Curva de Calibração para o estudo de liberação livre de membrana.

Tempo(h)	Y	X	% liberação.
1	0,36698	50,82857	1,626514
2	0,88934	118,6675	3,797361
4	1,45366	191,9558	6,142587
8	1,85736	244,3844	7,820301
24	2,10952	277,1325	8,868239

Tabela de valores da liberação livre de membrana da formulação 6,25mg/mL

Tempo (h)	Y	X	% liberação.
1	0,6846	92,07792	2,946493506
2	1,38896	183,5532	5,873703896
4	1,7441	229,6753	7,34961039
8	1,84004	242,1351	7,748322078
24	1,92398	253,0364	8,097163636

Tabela de valores da liberação livre de membrana da formulação 12,5mg/mL