

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

Propriedades físico-químicas de nanocápsulas contendo um antioxidante e um filtro solar químico co-encapsulados

SAMUEL LUIZ DE MARCO

PORTO ALEGRE, 2009



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

Propriedades físico-químicas de nanocápsulas contendo um antioxidante e um filtro solar químico co-encapsulados

Dissertação apresentada por **Samuel Luiz de Marco** para a obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Porto Alegre, 2009

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 07.12.2009, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Fabiano Severo Rodembusch  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Scheila Rezende Schaffazick  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Valquíria Linck Bassani  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

M321p Marco, Samuel Luiz de  
Propriedades físico-químicas de nanocápsulas contendo um antioxidante e um filtro solar químico co-encapsulados / Samuel Luiz de Marco. – Porto Alegre: UFRGS, 2009. – xxii, 92 p. : il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Nanocápsulas. 2. Quercetina. 3. Metoxicinamato de octila. 4. Tensoativos. 5. Espalhamento de luz. 6. Análise térmica. I. Pohlmann, Adriana Raffin. II. Título.

CDU: 615.4

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

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório K204 do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UFRGS e no Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da UFRGS, na cidade de Porto Alegre, com financiamento da Rede de Nanocosméticos, CNPq/MCT e FINEP. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.



*Nunca se vence uma guerra lutando sozinho  
Cê sabe que a gente precisa entrar em contato  
Com toda essa força contida e que vive guardada  
O eco de suas palavras não repercutem em nada*

*É sempre mais fácil achar que a culpa é do outro  
Evita o aperto de mão de um possível aliado, é...  
Convence as paredes do quarto, e dorme tranquilo  
Sabendo no fundo do peito que não era nada daquilo*

*Coragem, coragem, se o que você quer é aquilo que pensa e faz  
Coragem, coragem, eu sei que você pode mais*



Aos meus pais Wilson e Marisa.



## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais, por terem ensinado a viver a vida com dignidade.

À Prof. Adriana Pohlmann por ter me acolhido em seu laboratório, pela orientação, paciência, oportunidades e pela confiança depositada ao longo destes 2 anos.

À Prof. Sílvia Guterres pelo apoio e pelas contribuições no decorrer deste trabalho.

À Prof. Nádyá Silveira e seus alunos, em especial à Yasmine e Maria pelo auxílio nos experimentos de espalhamento de luz estático

À UFRGS e ao PPGCF pela estrutura oferecida.

Aos funcionários do Instituto de Química que colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho em especial ao Júlio pelos ensaios de análise térmica, ao Raul e ao Régis.

À CAPES, órgão financiador da bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho e à Rede de Nanocosméticos CNPq/MCT pelo apoio financeiro recebido.

Aos meus colegas do laboratório K204: Cati, Lu, Cris, Lila, Bruna, Márcia, Edu, Manoel, Dago, Lê Cruz e Tainá pela amizade e auxílios prestados.

À todos os meus colegas do laboratório 405, em especial: Moa, Rê Contri, Lê Colomé, Denise, Gregory, Rê Raffin, Alessandro, Karina, Flávia, Clarissa, Cândi, Eve, Taís, Crisinha, Ângelo, Ana Luiza, Kelly, Irene, Thati, Ludmila, Fran J., Franceline, Cássia, Stela, Gabriela, Carol, Guilherme e Simone.

À Fernanda Poletto pelas inúmeras vezes que me auxiliou durante todo o trabalho, pelas discussões científicas, pelo carinho, paciência e amizade.

Ao Dani, Deco, Dedão, Matheus e Cassius por terem me recebido em Porto Alegre.

À Multilab, em especial meus colegas do setor de Assuntos Regulatórios, pelo incentivo e pelas liberações para que esta dissertação pudesse ser enfim concluída.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química do metoxicinamato de octila .....	15
<b>Figura 2.</b> Estrutura química da quercetina .....	16
<b>Figura 3.</b> Princípio do experimento de espalhamento de luz .....	22
<b>Figura 4.</b> Fundamentos da medida do TurbiscanLab <sup>®</sup> .....	24
<b>Figura 5.</b> Varredura UV-VIS de soluções metanólicas de quercetina e OMC .....	55
<b>Figura 6.</b> Perfil de Backscattering das formulações de NC .....	59
<b>Figura 7.</b> Histograma do Backscattering das formulações de NC .....	60
<b>Figura 8.</b> Histograma do $I^*$ ( $\mu\text{m}$ ) das formulações de NC .....	61
<b>Figura 9.</b> Curvas de TGA para as formulações de NC .....	63
<b>Figura 10.</b> Perfis de TGA e curva da primeira derivada da TGA (DTG) .....	64
<b>Figura 11.</b> Termogramas de DSC das MP e formulações de NC .....	66
<b>Figura 12.</b> Fotografias de microscopia óptica das suspensões de NC .....	70
<b>Figura 13.</b> Variação da concentração de quercetina na formulação NE A .....	72
<b>Figura 14.</b> Variação da concentração de quercetina na formulação NE C .....	74



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Formulações de nanocápsulas .....	38
<b>Tabela 2.</b> Composição das formulações NC TGCC A e NC TGCC B1 .....	46
<b>Tabela 3.</b> Composição das formulações NC TGCC C e NC TGCC B2 .....	46
<b>Tabela 4.</b> Composição quali/quantitativas das formulações NE A .....	47
<b>Tabela 5.</b> Composição quali/quantitativas das formulações NE C .....	48
<b>Tabela 6.</b> Características físico-químicas das formulações de NC .....	53
<b>Tabela 7.</b> Resultados de TGA para as formulações de nanocápsulas .....	64
<b>Tabela 8.</b> Parâmetros térmicos das NC e matérias-primas .....	68
<b>Tabela 9.</b> Doseamento de quercetina para NE A .....	72
<b>Tabela 10.</b> Doseamento de quercetina para NE C .....	73



## LISTA DE ABREVIATURAS

BS – *backscattering*

DLS – *dynamic light scattering* (espalhamento de luz dinâmico)

DPR – desvio padrão relativo

DSC – *differential scanning calorimetry* (calorimetria exploratória diferencial)

DTG – primeira derivada da curva termogravimétrica

ERO – espécies reativas de oxigênio

MCO – metoxicinamato de octila

NC – nanocápsulas

NCI – nanocápsulas de MCO com sistema tensioativo Epikuron 170<sup>®</sup>

NCII – nanocápsulas de MCO com sistema tensioativo Span 60<sup>®</sup> e Tween 80

NCI-QUE – nanocápsulas de MCO e quercetina com sistema tensioativo Epikuron 170<sup>®</sup>

NCII-QUE – nanocápsulas de MCO e quercetina com sistema tensioativo Span 60<sup>®</sup> e Tween 80

NC TGCC A – nanocápsulas de triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico saturado com quercetina (200 µL de óleo)

NC TGCC B1 – nanocápsulas de triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (200 µL de óleo)

NC TGCC B2 – nanocápsulas de triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico

NC TGCC C – nanocápsulas de triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico saturado com quercetina

NE A – nanoemulsão A

NE C – nanoemulsão B

NIEHS – *National Institute of Environmental Health Sciences*

PCL – poli-ε-caprolactona

PCS – *photon correlation spectroscopy* (espectroscopia de correlação de fótons)

PDI – *polydispersity indices* (índice de polidispersão)

PEG – polietilenoglicol

PLA – poli(ácido láctico)

PLGA – copolímero dos ácidos láctico e glicólico

TGA – termogravimetria

TGCC – triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico

UV – ultravioleta

## RESUMO

Nanocápsulas poliméricas (NC) foram descritas como uma nova geração de veículos para bloqueadores solares. Um estudo anterior demonstrou que a presença de monoestearato de sorbitano (MS) e polissorbato 80 (P80), ao invés de fosfatidilcolina em suspensões de nanocápsulas, conferiu uma maior fotoestabilidade à quercetina (QUE) e ao metoxicinamato de octila (OMC) co-encapsulados em função do espalhamento de luz de nanocápsulas, que agem como filtro solar físico. Neste trabalho, foram investigadas as bases físico-químicas dessas descobertas. Para alcançar o objetivo, o número de partículas por volume (N) foi determinado por turbidimetria e propriedades de espalhamento de luz das NC. Análise térmica e microscopia óptica também foram realizadas. Formulações de NC contendo QUE e OMC foram preparadas pelo método de deposição interfacial da poli- $\epsilon$ -caprolactona, utilizando dois diferentes sistemas de tensoativos: Epikuron 170<sup>®</sup> (fosfatidilcolina) ou MS e P80. As NC apresentaram adequados diâmetros, índices de polidispersão, potencial zeta e pH. Formulações preparadas com QUE não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ) para o N (partículas.cm<sup>-3</sup>), curiosamente o valor de N para as partículas preparadas com MS e P80 foi menor do que as partículas preparadas com fosfatidilcolina ( $P < 0,05$ ), demonstrando que o espalhamento de luz não foi consequência de um N maior. Através de espalhamento de luz estático (Razão de Rayleigh) e espalhamento múltiplo de luz (TurbiscanLab<sup>®</sup>) foi verificado que a fotoestabilidade da QUE e do OMC foi relacionada a um maior espalhamento de luz das suspensões devido à natureza de seus componentes. A análise térmica demonstrou que os tensoativos e a QUE não interagem com a porção cristalina do PCL e que o MS e o P80 propiciaram melhor estabilidade química, do que as NC que continham Epikuron 170<sup>®</sup>. Análise microscópica mostrou nanocristais de QUE nas formulações explicando a influência das QUE nas análises espectroscópicas. Concluindo, NC preparadas com MS e P80 são mais eficazes em espalhar à luz do que aquelas preparadas com fosfatidilcolina.

**Palavras-chave:** nanocápsulas poliméricas, quercetina, metoxicinamato de octila, tensoativos, espalhamento de luz, análise térmica.



## ABSTRACT

Polymeric nanocapsules (NC) have been described as a new generation of carriers for UV blockers. A previous study demonstrated that the presence of the stabilizers sorbitan monostearate (SM) and polysorbate 80 (P80) instead of phosphatidylcholine in nanocapsule suspensions caused a better photostability of co-encapsulated quercetin (QUE) and octyl methoxycinnamate (OMC) because of the light scattering of nanocapsules, which, act as physical sunscreen. In this work, was investigated the physicochemical basis of those findings. To reach the objective, the number of particles per volume ( $N$ ) was determined by turbidimetry and the light scattering properties of the NC. Thermal analyses and optical microscopy were also performed. NC formulations containing OMC and QUE were prepared by interfacial deposition of poly( $\epsilon$ -caprolactone) using two different surfactant systems: Epikuron 170<sup>®</sup> (phosphatidylcholine) or SM and P80. The NC presented adequate mean diameters polydispersity indexes, zeta potential and pH. Formulations prepared with QUE showed similar ( $p > 0.05$ )  $N$  values ( $\text{particles}\cdot\text{cm}^{-3}$ ), interestingly the  $N$  value for particles prepared with SM and P80 was smaller than particles the prepared with phosphatidylcholine ( $p < 0.05$ ), demonstrating that the light scattering was not a consequence of a higher  $N$  in the suspension. Through static light scattering (Rayleigh Ratio) and multiple light scattering (TurbiscanLab<sup>®</sup>) was found that the photostability of QUE and OMC was related to a higher light scattering of suspensions due to the nature of its components. Thermal analysis demonstrated that the surfactants and QUE did not interact with the crystalline portion of PCL and that SM and P80 provided better chemical stability for the NC containing QUE than Epikuron 170<sup>®</sup>. Microscopy analysis showed QUE nanocrystals in the formulations explaining the influence of QUE in the spectroscopic analyses. In conclusion, NC prepared with SM and P80 are more effective in scatter the light than those prepared with phosphatidylcholine.

**Keywords:** polymeric nanocapsules, quercetin, octylmethoxycinnamate, surfactants, light scattering, thermal analysis.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	7
2.1 OBJETIVO GERAL .....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	9
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	11
3.1 SISTEMAS NANOPARTICULADOS .....	13
3.2 FOTOPROTEÇÃO.....	14
3.3 SISTEMAS NANOPARTICULADOS E FOTOPROTEÇÃO.....	16
3.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE SISTEMAS NANOPARTICULADOS.....	18
3.4.1 <i>Determinação do diâmetro das partículas por espalhamento de luz dinâmico (DLS)</i> .....	18
3.4.2 <i>Potencial zeta</i> .....	19
3.4.3 <i>Medidas de pH</i> .....	20
3.4.4 <i>Determinação do número de partículas por volume</i> .....	21
3.4.5 <i>Espalhamento múltiplo de luz</i> .....	23
3.4.6 <i>Análise térmica</i> .....	25
3.4.6.1 <i>Termogravimetria</i> .....	26
3.4.6.2 <i>Calorimetria exploratória diferencial</i> .....	27
3.4.7 <i>Cristais em sistemas nanoparticulados</i> .....	30
<b>4. MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	33
4.1. MATERIAIS .....	35
4.1.1 <i>Matérias-primas</i> .....	35
4.1.3 <i>Solventes e outros materiais</i> .....	36
4.2 MÉTODOS .....	37
4.2.1 <i>Preparação das formulações</i> .....	37
4.2.2 <i>Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas</i> .....	38
4.2.2.1 <i>Determinação de pH</i> .....	38
4.2.2.2 <i>Determinação do diâmetro de partícula e índice de polidispersão</i> .....	38

4.2.2.3 Potencial zeta.....	39
4.2.3 <i>Determinação do número de partículas por volume</i> .....	39
4.2.4 <i>Razão de Rayleigh para a intensidade média de luz espalhada no espalhamento de luz estático (Silveira e col., 1996)</i> .....	41
4.2.4.1 Índice de refração .....	42
4.2.5 <i>Análises de espalhamento múltiplo de luz</i> .....	42
4.2.6 <i>Análise térmica</i> .....	43
4.2.6.1 Termogravimetria (TGA) .....	43
4.2.6.2 Calorimetria exploratória diferencial .....	44
4.2.7 <i>Microscopia óptica</i> .....	45
4.2.8 <i>Quantificação da quercetina</i> .....	45
4.2.9 <i>Preparação das nanopartículas por homogeneização à alta-pressão</i> .....	47
4.2.10 <i>Análise Estatística</i> .....	49
4.2.11 <i>Descarte de resíduos</i> .....	49
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS .....	53
5.2 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE PARTÍCULAS POR VOLUME .....	54
5.3 RAZÃO DE RAYLEIGH PARA A INTENSIDADE MÉDIA DE LUZ ESPALHADA NO ESPALHAMENTO DE LUZ ESTÁTICO .....	56
5.4 ANÁLISES DE RETROESPALHAMENTO DE LUZ.....	58
5.5 ANÁLISE TÉRMICA .....	62
5.5.1 <i>Termogravimetria (TGA)</i> .....	62
5.5.2 <i>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i> .....	65
5.6 MICROSCOPIA ÓPTICA .....	69
5.7 DOSEAMENTO DA QUERCETINA .....	71
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>75</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>79</b>

## 1. INTRODUÇÃO

---



Nas últimas décadas, a incidência de câncer de pele tem aumentado significativamente pelo mundo todo, passando a ser considerada importante fator de preocupação de saúde pública (*American Cancer Society*, 2007; Ibrahim e Brown, 2008). Mesmo crescendo significativamente a incidência de câncer de pele poderia ser menor, uma vez que este é um dos tipos de câncer mais facilmente evitáveis (*American Cancer Society*, 2007). Órgãos públicos como o *National Institute of Environmental Health Sciences* (NIEHS), têm procurado desenvolver ações para aumentar a proteção solar das populações. Entre elas destacam-se medidas para despertar a consciência em medidas como a redução da exposição solar e de formas comportamentais, que visem bloquear a penetração da radiação ultra violeta (UV), como a utilização de roupas e a exposição à sombra. Em papel de destaque nas campanhas de conscientização está a utilização de protetores solares pela população (Eide e Weinstock, 2006).

Baseado na capacidade de proteção frente à radiação UVB nas plantas, o uso de flavonóides na busca de efeitos antioxidantes vem sendo estudado (Harbone e Williams, 2000). A quercetina é um flavonóide que demonstrou potencial atividade antioxidante na redução dos efeitos induzidos pelas radiações UVB quando utilizada topicamente através de emulsões (Casagrande e colaboradores, 2006).

Nas últimas décadas, iniciou-se uma busca por estratégias que buscassem maior proteção contra as radiações solares, através do uso de filtros solares químicos e físicos, substâncias capazes de absorver ou refletir a radiação, respectivamente.

Administração tópica de nanocarreadores contendo filtros solares químicos pode ser vantajosa em comparação com aos produtos convencionais em função do

aumento da afinidade do filtro solar com o extrato córneo e da elevada capacidade de carrear substâncias extremamente lipofílicas (Wissing e Muller, 2002; Guterres e col., 2007).

A estabilidade físico-química é um fator fundamental no âmbito de formulações farmacêuticas, em especial de sistemas mais recentes como os nanoestruturados, visto que quanto maior a estabilidade, maior o potencial de aplicabilidade no mercado (Magenheim e Benita, 1991).

Nanopartículas poliméricas têm sido extensamente investigadas como carreadores, graças às suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade. (Schaffazick e col., 2003). Recentemente, foi proposta uma abordagem inédita de co-encapsulamento de um antioxidante (quercetina) e de um filtro solar químico (metoxicinamato de octitla) que se mostrou bastante adequada para a estabilidade química simultânea dos dois componentes frente à radiação UVA. Neste trabalho, a comparação entre formulações de nanocápsulas poliméricas preparadas com o tensoativo Span 60<sup>®</sup> ou Epikuron 170<sup>®</sup> mostrou que as formulações preparadas com o primeiro estabilizaram melhor o sistema. Tanto a ação antioxidante, quanto a absorção da radiação foram determinantes para a estabilidade dos sistemas. Além disso, a propriedade de espalhamento de luz das nanopartículas influenciou significativamente os resultados (Weiss-Angeli e col., 2008).

Levando em consideração estudos de organização molecular realizados por Cruz e colaboradores (2006) o Span 60<sup>®</sup> estaria dissolvido no núcleo oleoso (triacilglicerol) enquanto o Epikuron 170<sup>®</sup> estaria na interface partículas/água. Desta

forma a maior estabilidade estaria relacionada com a densidade das partículas nas suspensões.

Portanto, diante do exposto, entende-se como relevante, a fim de aprofundar o conhecimento dos mecanismos de estabilidade físico-química dos sistemas nanoestruturados, verificar se a maior estabilidade da quercetina e do metoxicinamato de octila em formulações de nanocápsulas, observada previamente, (Weiss-Angeli e col., 2008), é decorrente de uma maior densidade de partículas em suspensão ou é devida a natureza do material que reflete a luz.



## **2. OBJETIVOS**

---



## **2.1 Objetivo geral**

Determinar se a maior estabilidade da quercetina e do metoxicinamato de octila em formulações de nanocápsulas observada previamente, é decorrente de uma maior densidade de partículas em suspensão ou é devida à natureza do material que reflete a luz.

## **2.2 Objetivos específicos**

- Preparar formulações de nanocápsulas (NC) pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado;
- Determinar a distribuição de tamanho de partículas, índice de polidispersão através de espalhamento de luz dinâmico, potencial zeta por eletroforese e pH por potenciometria;
- Determinar o número de partículas por volume nas suspensões através de turbidimetria, para verificar se a estabilidade química das formulações está relacionada com a densidade de partículas;
- Determinar a intensidade de luz espalhada das suspensões por espalhamento de luz estático e por espalhamento de luz múltiplo para verificar se a estabilidade química das formulações está relacionada com a natureza química do material espalhante;
- Determinar o comportamento térmico das formulações e de suas matérias-primas por análise termogravimétrica e calorimetria exploratória diferencial para estabelecer um modelo de arquitetura supramolecular dos sistemas;
- Aumentar a concentração de quercetina em sistema lipídico disperso.



### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---



### 3.1 Sistemas nanoparticulados

A concentração do fármaco no sítio de ação é fator determinante para a resposta terapêutica. Por estar relacionada com as características físico-químicas das substâncias, a distribuição das moléculas ativas no organismo requer, em geral, uma quantidade elevada de substâncias ativas para alcançar a ação terapêutica desejada. Contudo, este excesso de fármaco presente nas formulações convencionais faz com que freqüentemente diversos órgãos e tecidos saudáveis fiquem susceptíveis aos eventos adversos causados pelas substâncias ativas. (Couvreur e col., 2002).

A associação de fármacos a sistemas carreadores de fármacos são uma alternativa para direcionar os fármacos ao sítio de ação. Dentre os sistemas carreadores, destacam-se os sistemas micro e nanoparticulados. Enquanto os primeiros apresentam diâmetros superiores a 1  $\mu\text{m}$ , os demais apresentam diâmetros na ordem de nanômetros (Couvreur e col., 2002). Nanopartículas geralmente apresentam tamanhos na ordem de 10 a 1000 nm, onde o fármaco encontra-se dissolvido, encapsulado ou aderido à matriz polimérica dependendo do método de preparação (Soppimath e col., 2001).

Dentre os métodos de preparo de sistemas nanoparticulados poliméricos destacam-se os métodos de polimerização *in situ* como a polimerização em emulsão (Couvreur e col., 1982) e a polimerização interfacial (Al Khouri e col., 1986), os métodos que utilizam polímeros pré-formados como emulsificação-difusão (Leroux e col., 1995; Quintanar-Guerrero e col., 1996), a nanoprecipitação e a deposição interfacial de polímero (Fessi e col., 1989). Para a preparação de nanopartículas lipídicas a homogeneização por alta pressão é a técnica mais adequada (Souto e col., 2004).

Considerando os polímeros utilizados na preparação dos sistemas nanoestruturados, a escolha de polímeros com características de biodegradabilidade e biocompatibilidade é fator decisivo na formulação de carreadores de fármacos (Soppimath e col., 2001). Dentre as nanopartículas poliméricas, as nanocápsulas, cuja

estabilidade é mantida por tensoativos, podem ser classificadas como vesículas submicrométricas que apresentam média de distribuição de diâmetros entre 100 e 1000 nm, sendo compostas por um núcleo oleoso e uma fina parede polimérica (Couvreux e col., 2002; Schaffazick e col., 2003; Jäger e col., 2007).

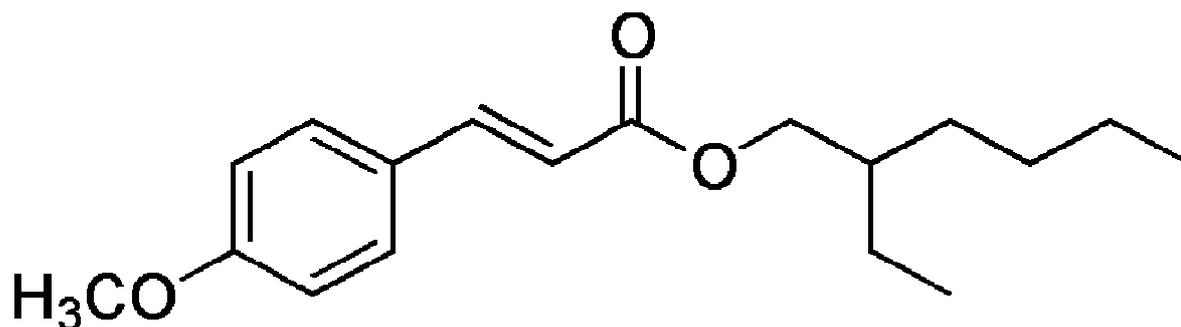
### **3.2 Fotoproteção**

Os agentes fotoprotetores podem ser classificados de acordo com o seu mecanismo de ação, em bloqueadores físicos ou filtros solares químicos. Os filtros físicos, representados principalmente pelo dióxido de titânio e óxido de zinco, atuam refletindo e espalhando a luz emitida a partir de diferentes comprimentos de onda, numa faixa que compreende desde uma parte da região do infravermelho até a região do ultravioleta (Palm e O'Donoghue, 2007).

Os filtros químicos, por sua vez, possuem um mecanismo de ação completamente diferente. Em geral, este grupo é composto por substâncias aromáticas conjugadas que são capazes de absorver a radiação UV. Estes agentes dividem-se de acordo com o tipo de radiação UV absorvida (Palm e O'Donoghue, 2007).

Entre as diferentes classes de filtros químicos encontra-se o metoxicinamato de octila (MCO), pertencente à classe dos cinamatos. Possui ação de absorção frente às radiações UVB, com um espectro de ação que compreende a faixa de comprimento de onda de 270-328 nm (Palm e O'Donoghue, 2007). O MCO é amplamente utilizado em diversas formulações cosméticas como protetor solar em função do elevado coeficiente de extinção molar, que possibilita sua incorporação em diferentes solventes (Pattanaargson e Limphong, 2001). Poucas reações de fotosensibilização na pele induzidas pelo MCO foram relatadas, porém a instabilidade frente à luz ocasiona uma redução na capacidade de absorção da radiação UV do filtro químico MCO (Schauder e Ippen, 1997; Tarras-Wahlberg e col., 1999; Pattanaargson e Limphong, 2001).

A estrutura química do MCO é apresentada na Figura 1.



**Figura 1.** Estrutura química do metoxicinamato de octila.

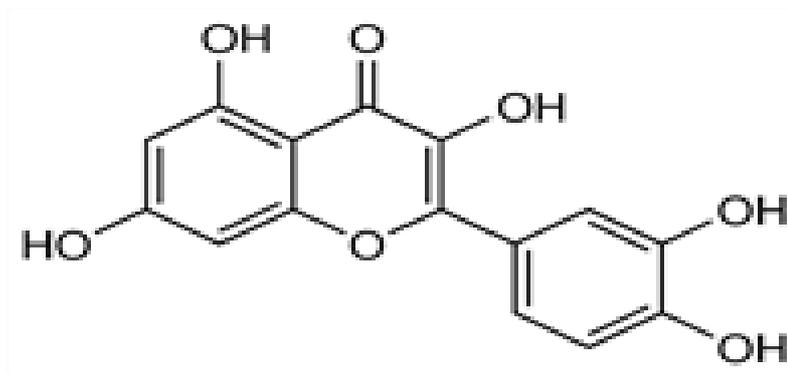
Os radicais livres são definidos como moléculas ou átomos que possuem um elétron desemparelhado na última camada, ocupando um único orbital atômico ou molecular. Os radicais livres podem ser positiva e negativamente carregados ou neutros (Halliwell e Gutteridge, 2000). Os radicais livres resultam de eventos como a fissão homolítica de ligações ou reações de transferência de elétrons. Geralmente, se formam pela absorção da radiação, (ultravioleta ou visível), por reações do tipo redox (de transferência de elétrons, não-enzimáticas e reações catalisadas por metais) ou ainda por processos de catálise enzimática (Slater, 1984). Entre os radicais livres encontram-se as espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO e demais radicais livres podem ser gerados por fontes exógenas como a radiação, o fumo, o estresse e alguns medicamentos. No organismo por sua vez, as ERO são produzidas durante os processos de fagocitose e durante metabolismo celular fisiológico (Halliwell e Gutteridge, 1986; Diaz e col., 1998).

Uma vez que apresenta função de barreira contra agressores do meio externo, a pele torna-se um órgão alvo potencial para a ação dos radicais livres, uma vez que a exposição aos agressores, como a radiação UV, é considerável. Embora o organismo possua mecanismos que diminuam a ação das espécies reativas de oxigênio, oriundas dos radicais livres, esta capacidade é limitada. Por tanto, medidas que visem auxiliar o sistema de defesa antioxidante cutâneo podem reduzir ou evitar o dano causado pelas espécies reativas de oxigênio (Saija e col., 1998).

O uso de flavonóides, maior grupo de metabólitos secundários dos vegetais, para obtenção de efeitos antioxidantes vem sendo avaliado. A ação de proteção frente

à radiação UV, nos vegetais, estaria relacionada com a capacidade dos flavonóides de absorverem luz na região do visível nos seus tecidos (Harbone e Williams, 2000).

Por possuir uma capacidade antiradicalar relacionada às propriedades de bloquear radicais livres, inibir a peroxidação lipídica e quelar íons, a quercetina é um dos compostos polifenólicos mais estudados (Bonina e col., 1996; Fórmica e Regelson, 1995; Inal e Kaharaman, 2000). A quercetina é um flavonóide com potencial aplicação tópica na busca pela redução dos efeitos antioxidantes induzidos pelas radiações UVB (Casagrande e col., 2006). A estrutura química da quercetina é apresentada na Figura 2.



**Figura 2.** Estrutura química da quercetina.

### 3.3 Sistemas nanoparticulados e fotoproteção

Os sistemas carreadores nanoparticulados têm sido muito estudados em relação à aplicação cutânea, em função da modulação da difusão transepidermal, inclusive podendo alterar a farmacocinética e a biodistribuição através da pele (Cecv e col., 2004).

Nanocápsulas poliméricas têm sido descritas como uma nova geração de carreadores de protetores solares (Jiménez e col., 2004A). O crescente interesse na utilização deste tipo de carreador em aplicações tópicas se dá pelas diversas vantagens apresentadas pela nanoencapsulação, entre elas destaca-se a estabilização química dos ativos proporcionada pela incorporação destes nas vesículas (Alvarez-Román e col., 2001), a habilidade das nanocápsulas em carrear substâncias lipofílicas (Guterres e

col., 2007), o íntimo contato entre as partículas e a camada do extrato córneo, em função do reduzido tamanho de partícula destes carreadores (Alvarez-Román e col., 2004; Alves e col., 2007) e a capacidade das nanocápsulas espalharem a luz, atuando como filtros solares físicos (Paese e col., 2009).

Um estudo desenvolvido por Alvarez-Román e col., 2004 enfatiza o uso de formulações contendo filtros solares na forma de sistemas nanoparticulados, como uma alternativa para a veiculação de fármacos através da pele. Neste estudo, a incorporação de nanocápsulas poliméricas de poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) contendo metoxicinamato de octila (MCO) em formulações semi-sólidas (géis) apresentou maior efetividade na proteção contra o eritema induzido pela radiação UV do que formulações contendo MCO dispersos nas bases semi-sólidas. O maior efeito protetor alcançado pelos sistemas nanoparticulados se deu graças à capacidade de formação de um filme de nanocápsulas na superfície da pele.

Recentemente, a co-encapsulação de um filtro solar químico (MCO) e de um flavonóide com propriedades antioxidantes (quercetina) em nanocápsulas foi proposta com o objetivo de aproveitar as vantagens do antioxidante de absorver fótons e seqüestrar radicais livres para aumentar a fotoestabilidade do sistema frente à radiação UVA. A fotodegradação tanto do antioxidante como do filtro solar químico foram retardadas, quando comparadas com as soluções dos mesmos. Além disso, a co-encapsulação da quercetina e do MCO promoveu um efeito sinérgico e uma melhor fotoestabilidade do que a encapsulação isolada destes constituintes (Weiss-Angeli e col., 2008).

### **3.4 Caracterização físico-química de sistemas nanoparticulados**

#### **3.4.1 Determinação do diâmetro das partículas por espalhamento de luz dinâmico (DLS)**

A distribuição do tamanho das partículas está entre as técnicas mais importantes e frequentemente realizadas na etapa de caracterização físico-química de sistemas nanoparticulados (Magenheim e Benita, 1991). Uma das técnicas mais comumente empregada para determinar o tamanho das nanopartículas é o espalhamento de luz dinâmico, também conhecida como espectroscopia de correlação de fótons (PCS), onde o diâmetro das partículas é determinado pelo movimento difusivo destas em solução (Guinebretiére e col., 2002; Bootz e col., 2003). Esta técnica é baseada na interação da partícula com o feixe de luz incidente. A intensidade de luz espalhada detectada num ângulo fixo fornece informações de tamanho, distribuição de tamanho e índice de polidispersão (PDI) das amostras. Como o modelo de cálculo considera as partículas como esferas, a presença de poeira ou agregados nas amostras faz com que o tamanho determinado seja maior do que o verdadeiro (Irache e col., 1993; Poletto e col., 2008). A determinação do perfil de distribuição do tamanho de partícula é uma propriedade utilizada no controle de qualidade, uma vez que a estabilidade física das suspensões está relacionada com o tamanho e a distribuição (Muller-Goymann, 2004).

Alguns parâmetros como a quantidade de solvente orgânico empregado podem influenciar na formulação. Em 2004B Jiménez e colaboradores evidenciaram que o diâmetro das nanopartículas preparadas através da técnica de deposição interfacial da PCL diminuiu com o aumento da quantidade de solvente orgânico. Com uma menor quantidade de acetona a solução formada apresentava maior viscosidade e concentração do polímero o que, segundo os autores, dificulta a formação de gotículas diminutas de óleo no seu interior durante a difusão do solvente no não-solvente. Outro parâmetro que influencia no tamanho das partículas é a composição do sistema

tensoativo das suspensões, de acordo com Jiménez e colaboradores 2004B, nanocápsulas com Montanox 80<sup>®</sup> apresentaram diâmetro de 2 a 3 vezes menor que as preparadas pelo sistema contendo Tween<sup>®</sup> 85 e Sinperonic<sup>®</sup> PE/F68.

### 3.4.2 Potencial zeta

Outra medida muito aplicada na caracterização físico-química de sistemas nanoparticulados é a determinação do potencial zeta. Técnicas de eletroforese são aplicadas para a medida desta propriedade, que fornece indicativos da estabilidade dos sistemas nanodispersos, já que sistemas com elevados valores de potencial zeta (em módulo) conferem maior repulsão eletrostática às partículas o que diminui a possibilidade de agregação, em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes (Schaffazick e col., 2003).

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, que é governado pelas mudanças na interface com o meio dispersante. Tais mudanças podem ser decorrentes da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou pela adsorção de moléculas iônicas presentes no meio aquoso dispersante. Por este motivo, o potencial zeta pode ser uma ferramenta útil na elucidação do mecanismo de associação de fármacos às nanopartículas (Couvreur e col., 2002; Schaffazick e col., 2003). Abordagens realizadas por Chasteigner e colaboradores (1995) verificaram que a adição do fármaco itraconazol a sistemas nanoestruturados (nanoesferas) de poli( $\epsilon$ -caprolactona) reduziu o potencial de superfície negativo do sistema, o que segundo os autores se deu em função da adsorção de parte do fármaco na superfície das nanoesferas por meio de interações hidrofóbicas. De acordo com Alonso e colaboradores (1991), adições crescentes de sulfato de amicacina levaram à redução (em módulo) do potencial zeta de nanopartículas (nanoesferas) de poli(cianoacrilato de butlia), ao passo que a taxa de associação do fármaco aumentou, segundo os autores o

fato observado ocorreu em função de uma interação eletrostática entre fármaco e polímero.

Os valores de potencial zeta variam de acordo com a composição quali/quantitativa de seus constituintes. Os tensoativos e o polímero são componentes que causam as maiores variações nos valores de potencial zeta. De Campos e colaboradores (2003) verificaram valores de potencial zeta positivo na faixa de 36 a 38 mV para nanopartículas contendo ciclosporina A, utilizando o polímero de origem natural (animal) quitosana. A utilização de polímeros como os poliésteres: poli( $\epsilon$ -caprolactona) e poli(ácido láctico) (PLA), fornecem um potencial zeta negativo à interface (Schaffazick e col, 2003). Um estudo desenvolvido por Mosqueira e colaboradores em 2001 avaliou as variações de potencial zeta em nanocápsulas decorrentes das variações na composição das partículas, levando em consideração diferentes polímeros com distintas extensões da cadeia polimérica, conteúdo de agente de superfície polietilenoglicol (PEG) e na quantidade de tensoativo (lecitina de soja – Epikuron 170®). De acordo com os autores, as formulações com altas concentrações de tensoativo apresentaram valores de potencial zeta negativos elevados, independentemente do tipo e extensão das cadeias poliméricas e conteúdo de agente interfacial empregados.

### **3.4.3 Medidas de pH**

A avaliação do pH das suspensões de nanocápsulas é um parâmetro importante na caracterização físico-química destes sistemas. Segundo Guterres e colaboradores (1995), alterações nos valores de pH podem estar associadas à degradação do polímero ou de outros componentes da formulação. Um estudo realizado por Müller, em 1999, verificou o decréscimo dos valores de pH em nanoesferas contendo diclofenaco preparadas com poli( $\epsilon$ -caprolactona) após 60 e 120 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Conforme os autores relataram, tal redução do valor do pH

esteve relacionada à degradação polimérica durante o período de armazenamento. Segundo Mallin e colaboradores (1996), a hidrólise da PCL é um processo lento e que tem como passo limitante o inchamento do polímero. Testes de inchamento de filmes de PCL, realizados em tampão fosfato pH 7,4 ou água, em diferentes temperaturas (25 e 37° C), demonstraram que os filmes de PCL não sofrem inchamento durante um período de 60 dias.

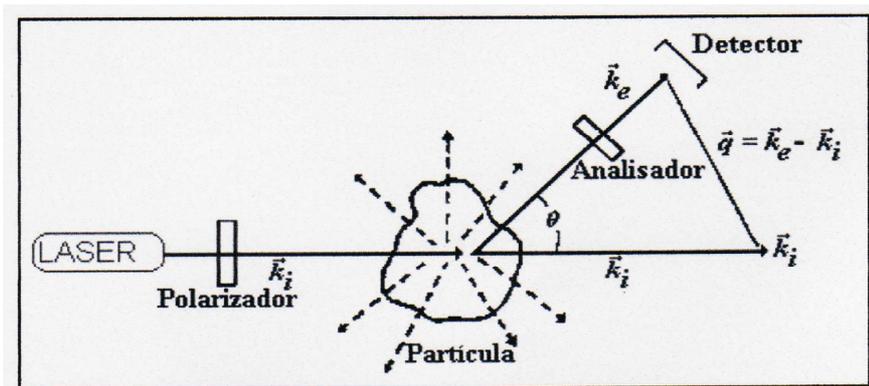
Schaffazick (2001) verificou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) nos valores de pH das formulações de nanocápsulas preparadas com PCL, contendo triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico como núcleo oleoso. Os valores iniciais de pH foram em torno de 5,0, após 105 dias de armazenamento um aumento na acidez das formulações foi verificado, sendo que o valor de pH após este período caiu para 4,0. Este fenômeno poderia estar relacionado à hidrólise do polímero poliéster como anteriormente descrito (Calvo e col., 1996).

#### **3.4.4 Determinação do número de partículas por volume**

A teoria do espalhamento de luz foi investigada primeiramente por Lord Rayleigh, em 1871, e subsequentemente no início do século XX por, Mie e Debye sendo que o grande avanço nesta área ocorreu a partir de 1940 com o surgimento dos fotomultiplicadores (Ottewill, 2002).

O espalhamento de luz abrange um conjunto de técnicas onde o evento fundamental é a interação da radiação eletromagnética com a matéria. O campo elétrico da radiação induz um momento dipolo elétrico oscilante, que gera luz espalhada em todas as direções (Pecora e Berne, 2000).

Uma representação esquemática do experimento de espalhamento de luz é apresentada a seguir na Figura 3.



**Figura 3.** Representação esquemática do experimento de espalhamento de luz (Pecora e Berne, 2000).

Zattoni e colaboradores, em 2003, propuseram um método para a análise quantitativa de sistemas dispersos de tamanho nano e micrométricos através da turbidimetria, utilizando como detector turbidimétrico um espectrofotômetro ultravioleta/visível (UV/VIS). O método é baseado fundamentalmente na propriedade da eficiência de extinção ser uma função da razão entre o diâmetro de partículas esféricas dispersas e o comprimento de onda incidente, quando o índice de refração da partícula (razão entre o índice de refração da partícula e o índice de refração do meio dispersante) é constante. Para determinar a turbidez da amostra é utilizado um detector na faixa do UV/VIS, já que a turbidez é considerada uma função do comprimento de onda incidente. O método não é válido para regiões de comprimento de onda onde o sinal de absorção de algum componente da amostra esteja presente.

Conceitualmente, a teoria de Mie pode ser aplicada para partículas com diâmetro próximo ao diâmetro do comprimento de onda da luz e que possuam um diâmetro esférico e tenham uma distribuição monodispersa. A turbidez ( $\tau$ )  $\text{cm}^{-1}$  de uma suspensão coloidal pode ser definida, de acordo com a teoria de Mie, como a redução na intensidade de um feixe de luz incidente causada pelo espalhamento de luz (Irache e col., 1993).

Diversos trabalhos na literatura retratam o uso da técnica de turbidimetria para a determinação do número de partículas. Em 1980, Zollars utilizou este método para a determinação do número de partículas de látex. Mais recentemente, Jäger e colaboradores (2009) determinaram o número de partículas de formulações de nanopartículas poliméricas. Nanocápsulas contendo PCL, preparadas pelo método de

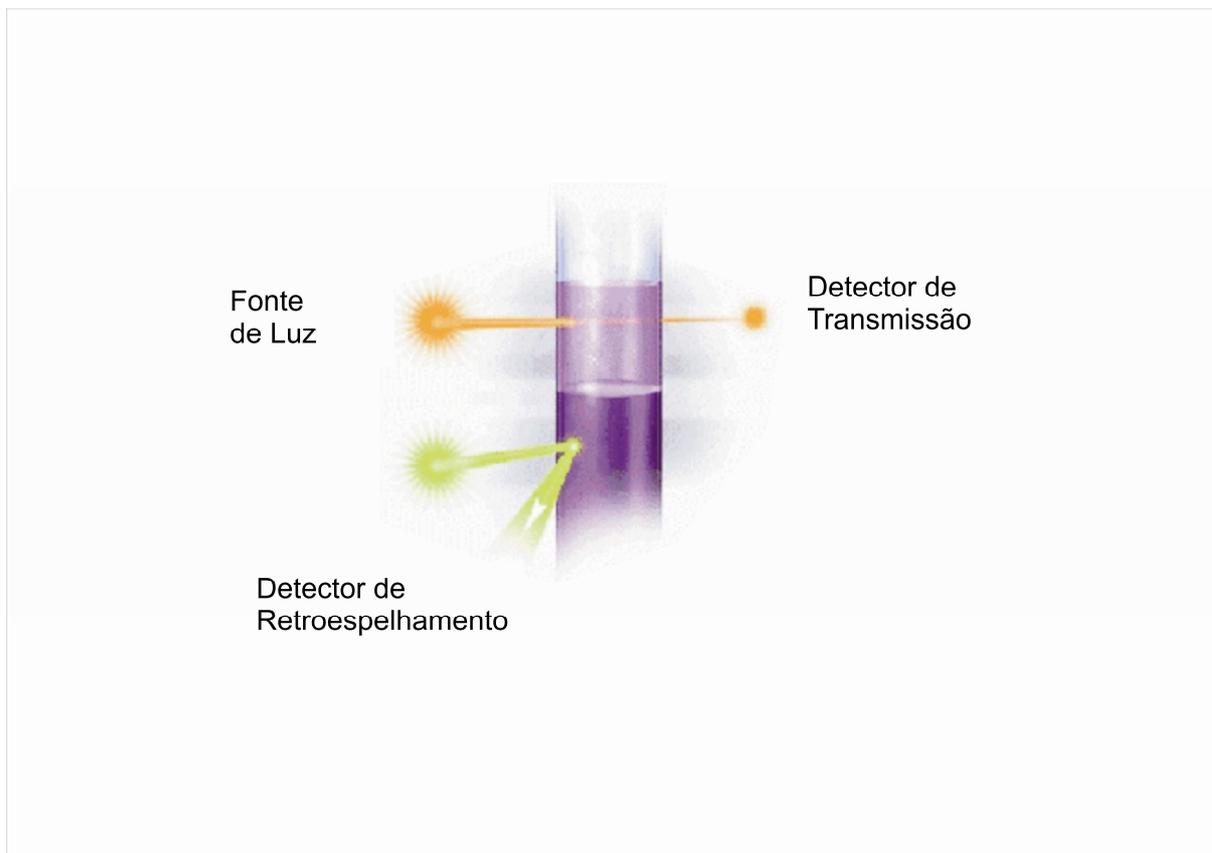
deposição interfacial de polímero pré-formado (Fessi e col., 1989), apresentaram valores entre 2 a  $10 \times 10^{12}$  partículas.mL<sup>-1</sup> de acordo com variações da concentração do núcleo oleoso (triglicerídeos do ácido capríco e caprílico) e do tensoativo na fase orgânica (monoestearato de sorbitano) das nanocápsulas. O número de partículas foi maior para as partículas com maior concentração de monoestearato de sorbitano e de acordo com os autores, isso se dá pela presença que micelas livres de tensoativo na formulação, o que poderia influenciar o número de partículas na suspensão.

Uma faixa de distribuição entre  $5-6 \times 10^{12}$  partículas.cm<sup>-3</sup> foi encontrada por Poletto e colaboradores (2008) através da técnica de turbidimetria, para sistemas nanoestruturados contendo diferentes concentrações de polímero (PCL).

De acordo com Irache e colaboradores (1993), a técnica de turbidimetria é um método barato, rápido e que utiliza uma reduzida quantidade de amostra para estimar o número de partículas presentes em uma suspensão coloidal. Cabe salientar que o número de partículas determinado pela técnica de turbidimetria apresenta uma variação de 5 a 10%, no que diz respeito aos parâmetros de exatidão e precisão (Oda e col., 1980).

### **3.4.5 Espalhamento múltiplo de luz**

De acordo com o fabricante, a análise das amostras ocorre baseada no princípio de que dois sensores ópticos sincronizados detectam os fenômenos provenientes de uma fonte de luz de diodo de elétrons luminescente na região do infravermelho próximo ( $\lambda=880$  nm). Estes sensores, detector de transmissão e detector de retroespalhamento (backscattering), respectivamente, captam a luz transmitida através da amostra (sensor posicionado a 180° com relação à fonte de luz) e a luz retroespalhada pela amostra (detector posicionado a 45° em à fonte de radiação incidente). A Figura 4 é uma representação esquemática do princípio de medida da técnica.



**Figura 4.** Representação esquemática do princípio de medida do Turbiscan Lab<sup>®</sup> (Formulation<sup>®</sup>, 2004).

A técnica de análise de espalhamento múltiplo de luz, através do TurbiscanLab<sup>®</sup>, permite a obtenção dos valores de backscattering absoluto e relativo, além da medida do comprimento (caminho) percorrido pelo fóton ( $l^*$ ) que pode ser conceituada como a distância de penetração do fóton na dispersão (Formulation<sup>®</sup>, 2004).

Poletto e colaboradores (2009) utilizaram a técnica de espalhamento múltiplo de luz para caracterizar formulações de nanoesferas preparadas com diferentes velocidades de cisalhamento e concentrações de solvente orgânico. Os autores verificaram, através da determinação dos parâmetros  $l^*$  (caminho percorrido pelo fóton) e  $d$  (diâmetro médio da gota) por espalhamento múltiplo de luz, e a combinação de outras técnicas de caracterização, que com aumento da taxa de cisalhamento e da concentração do solvente o tamanho das nanopartículas foi reduzido.

O Turbiscan Lab<sup>®</sup> foi utilizado para avaliar a estabilidade de carreadores vesiculares (ethosomas<sup>®</sup> e lipossomas ultradeformáveis) contendo diferentes

proporções de ácido linolêico. Os autores verificaram que os sistemas foram mais estáveis do que os lipossomas multilamelares clássicos, evidenciando que a composição vesicular tem papel fundamental na estabilidade coloidal. O Turbiscan Lab<sup>®</sup> demonstrou-se uma ferramenta interessante para a avaliação da estabilidade de sistemas vesiculares por ser um método rápido e não invasivo (Celia e col., 2009).

Lee e colaboradores 2006 verificaram o comportamento de migração de microesferas monodispersas de poliestireno através das medidas de retroespalhamento de luz com o uso do Turbiscan Lab<sup>®</sup>, como um indicativo da uniformidade das partículas. Um comparativo entre as taxas de sedimentação das micropartículas de poliestireno, sintetizadas com um novo precursor anfótero (VA-057) frente aos iniciadores clássicos, foi traçado. As partículas preparadas com VA-057 apresentaram uma taxa de sedimentação linear desde as primeiras horas de avaliação. Já as partículas preparadas com os iniciadores clássicos apresentaram uma taxa de sedimentação maior nas primeiras horas, em função da presença de populações de tamanhos distintos, partículas maiores sedimentam mais rapidamente.

#### **3.4.6 Análise térmica**

A investigação do comportamento térmico de uma substância e/ou dos seus produtos de reação consiste no monitoramento da temperatura das amostras no decorrer do tempo, em eventos que considerem a elevação e a redução da temperatura em condições programadas (ciclos) ou na modificação da massa de uma amostra com o aumento da temperatura. Os métodos de análise térmica são ferramentas valiosas no âmbito farmacêutico no que se refere à caracterização e identificação de compostos/sistemas, determinação de pureza, polimorfismo, estabilidade e compatibilidade.

### 3.4.6.1 Termogravimetria

A termogravimetria (TGA) é uma técnica de análise térmica na qual a variação da massa (perda ou ganho) é determinada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada da temperatura em um ambiente de atmosfera controlada. As variações na massa da amostra são detectadas através de uma termobalança (Lucas e col., 2001; Canevarolo Jr., 2004).

Quando submetidos a um tratamento térmico, os polímeros podem apresentar mudanças estruturais caracterizadas por rupturas de ligações químicas. Tais modificações são evidenciadas pela redução da massa molar com o surgimento de produtos voláteis, em outras palavras, ao sofrer degradação, o material perde massa, sob forma de produtos voláteis. O sensor registra esta perda de massa, que é ilustrada através de uma curva, conhecida como termograma. Tradicionalmente, o resultado deste tipo de ensaio é representado na forma de gráfico, cuja abscissa contém os registros de temperatura (ou tempo) enquanto a ordenada o percentual de variação da massa (Lucas e col., 2001).

A utilização da TGA no âmbito da caracterização de sistemas originados de materiais poliméricos é muito grande, sendo que informações sobre a composição de substâncias e misturas, presença de água adsorvida ou de cristalização, estabilidade e decomposição das amostras podem ser obtidas (Class e col., 1999). De acordo com Bajgai e colaboradores (2008) a TGA é a melhor técnica para a caracterização de copolímeros.

Uma maneira interessante de expressar os resultados das análises de TGA foi utilizada por Yang e colaboradores (2008), onde as propriedades térmicas do polímero PLA foram avaliadas. Neste trabalho, os autores buscaram aumentar a estabilidade térmica do polímero por meio da inserção de agentes reticuladores, através da técnica de fusão de agentes reticuladores. Para avaliar as variações na estabilidade térmica, os autores utilizaram um sistema que relacionava a temperatura necessária para a degradação de um percentual fixo da amostra. Comparações entre as temperaturas das diferentes amostras foram realizadas quando a degradação da amostra atingiu 10%

( $T_{0,1}$ ), 50% ( $T_{0,5}$ ) e 90% ( $T_{0,9}$ ). Além disso, os autores avaliaram a diferença da temperatura necessária para degradar 90% ( $\Delta T_{0,9}$ ) da amostra de polímero sem a presença de agentes reticuladores em relação ao polímero na presença de diferentes agentes reticuladores.

Uma ferramenta que possibilita uma interpretação mais acurada do ensaio de TGA é a avaliação conjunta da primeira derivada da curva de TGA em função da temperatura ou do tempo. A curva termogravimétrica derivada (DTG) fornece um parâmetro muito importante que é a velocidade da variação da massa em função da temperatura ( $dm/dT$ ) ou do tempo ( $dm/dt$ ). Uma grande vantagem da utilização das curvas DTG é a determinação precisa das temperaturas nas quais se iniciam os processos de decomposição bem como a exata temperatura em que a velocidade de decomposição é máxima. Além disso, esta ferramenta auxiliar é importante na resolução de curvas de TGA complexas, discriminando estágios de decomposição pouco perceptíveis, fazendo com que as informações da curva de TGA sejam visualmente mais acessíveis (Canevarolo Jr., 2004). Bajgai e colaboradores (2008), Bertini e colaboradores, (2009) e Santos e colaboradores (2009) utilizaram as curvas de DTG para explorar melhor os dados obtidos pelas curvas de TGA tradicionais na análise de compostos poliméricos.

### **3.4.6.2 Calorimetria exploratória diferencial**

As modificações das propriedades físicas, morfológicas ou químicas de uma substância em uma determinada faixa de temperatura ocorrem com consumo de energia disponível no sistema (alterações endotérmicas) ou com liberação de energia para o meio (alterações exotérmicas). Baseado neste princípio desenvolveu-se a técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) (Clas e col. 1999).

Na técnica de DSC, é medida a diferença de fluxo de calor entre a amostra em estudo e um material de referência (padrão) inerte quando ambos são submetidos a um

programa controlado de temperatura (ciclos), registrando a quantidade de calor necessária para manter o aquecimento. Quando ocorrerem alterações na quantidade de calor fornecida ao sistema em avaliação ( $\Delta E$ ) é sinalizada uma transformação térmica na amostra em questão. Nesta técnica calorimétrica são medidas as variações de entalpia em função do tempo (Fifield e Kealy, 1995; Lucas e col., 2001).

Os experimentos de DSC são, em geral, conduzidos em modo de varredura de temperatura, podendo ser utilizada para análises qualitativas (exo ou endotermas) e quantitativas das amostras, através da integração da área do pico sob a curva no registro. Uma ampla gama de produtos pode ser caracterizada com o emprego da técnica de DSC, entre os materiais que são constantemente avaliados destacam-se os polímeros (Fifield e Kealy, 1995). Os registros da técnica de DSC são conhecidos como termogramas, onde são representados os fenômenos endo e exotérmicos. É de fundamental importância a observância da sinalização que indica o direcionamento dos eventos endo e exotérmicos, a fim de se realizar uma interpretação correta da análise.

Informações como a temperatura de fusão, temperatura *on set*, temperatura de transição vítrea, entalpia de fusão, nível de perfeição dos cristalitos e grau de cristalinidade dos polímeros são algumas das informações que podem ser obtidas com o emprego da técnica de DSC. A temperatura *on set* se caracteriza como a temperatura em que o evento térmico (exo ou endotérmico) tem início. É a temperatura onde se observa um desnível em relação à linha de base traçada. A temperatura de fusão indica a temperatura em que a amostra encontra-se completamente fundida e é o valor expresso no pico da linha do termograma nos eventos endotérmicos (Winefordner, 1993).

A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) é um importante evento térmico que permite prever o comportamento de um material em uma determinada temperatura. Na  $T_g$ , há uma maior mobilidade dos segmentos da cadeia polimérica, e o polímero passa do estado vítreo para um estado mais maleável, apesar de não ocorrer mudança estrutural. Abaixo da  $T_g$ , o polímero não possui energia suficiente para permitir o deslocamento de uma cadeia em relação à outra por mudanças conformacionais. Neste estado vítreo o polímero apresenta-se duro, rígido e quebradiço. A  $T_g$  pode ser considerada como a temperatura na qual se inicia o movimento dos segmentos da

cadeia polimérica, na qual o material passa do estado vítreo (rígido, congelado) para o estado de “plástico” (maleável). No termograma, a Tg pode ser observada como uma descontinuidade da linha da base, por vezes tão sutil que é de difícil visualização. No entanto, a transição vítrea é um evento que compreende apenas a porção amorfa do material polimérico (Canevarolo Jr., 2004). Usualmente, a Tg de um polímero é determinada no seu segundo ciclo de aquecimento, a fim de não ocorrerem interferências relativas à sua história térmica (Nuñez e col., 2005).

A área do pico de um termograma é proporcional à entalpia de fusão  $\Delta H_f$  da amostra. Os eventos endotérmicos (material absorve calor) detectados pela técnica de DSC são em geral fusões, desolvatações, transições vítreas e mais raramente decomposições. Uma reação exotérmica detectada por DSC usualmente representa um processo de reorganização molecular tal como cristalizações (Sinko, 2006).

O nível de perfeição dos cristalitos pode ser avaliado através da interpretação do formato e da extensão dos picos endotérmicos do termograma. Segundo Yuan e colaboradores (2003), a comparação entre os deslocamentos dos valores de temperatura de fusão das amostras pode ser um indicativo de alteração no nível de perfeição dos cristalitos, uma vez que maiores temperaturas são necessárias para desorganizar (fundir) uma estrutura cristalina, desta maneira quanto mais “perfeitos” forem os cristais, maior será a temperatura de fusão da amostra. Do mesmo modo, Canevarollo Jr. (2004) evidencia que a largura do pico endotérmico relaciona-se com o nível de perfeição de cristalitos e/ou com a pureza de fármacos, sendo que picos mais estreitos indicam a presença de materiais de perfeição cristalina maior ou pureza mais elevada.

O grau de cristalinidade dos polímeros pode ser obtido através das relações entre as variações de entalpia de fusão das amostras (Modesti e col., 2006; Barbanti e col., 2006). Para se obter um valor percentual do grau de cristalinidade de polímeros é necessário correlacionar os valores experimentais de entalpia de fusão com os valores teóricos de entalpia de fusão para os polímeros 100% cristalinos (Vogelsanger e col., 2003).

O emprego de técnicas de análise térmica para caracterização de sistemas nanoparticulados é frequente. Muller e colaboradores, em 2001, utilizaram a técnica de

DSC para avaliar o comportamento térmico de nanocápsulas e nanoesferas de PCL, contendo diclofenaco, preparadas pela técnica de deposição interfacial e secas por spray-drying. Foi verificado que, para as nanocápsulas, o tensoativo lipofílico Span 60<sup>®</sup> estava dissolvido no óleo (triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico) enquanto que, nas nanoesferas, este encontra-se disperso na matriz polimérica.

Teixeira e colaboradores, em 2005, utilizaram a técnica de DSC para caracterizar nanoesferas e nanocápsulas contendo xantana e 3-metoxixantana, utilizando do copolímero de ácido láctico e glicólico (PLGA). Foi verificado que ambas xantanas encontraram-se dispersas em nível molecular na nanomatriz polimérica.

Musumeci e colaboradores (2006), verificaram o estado físico do docetaxel em nanoesferas preparadas a partir de matrizes de (PLA) e PLGA. Foi evidenciado que nas nanopartículas não havia presença do fármaco no estado cristalino, ao menos no nível de superfície das partículas. Sendo assim, foi levantada a hipótese de que docetaxel pode estar disperso na fase amorfa ou semi-cristalina.

### **3.4.7 Cristais em sistemas nanoparticulados**

A determinação de cristais em suspensões de nanocápsulas poliméricas foi avaliada por Pohlmann e colaboradores em 2008. Neste estudo, foi empregada a técnica de espalhamento de luz estático, onde os valores de intensidade de luz espalhada foram normalizados através do cálculo da Razão de Rayleigh das suspensões. Os autores estabeleceram uma relação entre a intensidade de luz espalhada e a instabilidade dos sistemas. Em função do tempo de armazenamento, quando a Razão de Rayleigh diminuía, verificou-se redução na concentração de fármaco. Por outro lado, quando a Razão de Rayleigh permaneceu inalterada ou com sutis alterações, a concentração de fármaco manteve-se constante. Foi verificada a presença

de cristais nas formulações saturadas contendo indometacina, estes cristais aglomeram-se e precipitaram.

A medida da Razão de Rayleigh é a forma mais correta para se representar os valores de intensidade média de luz espalhada, porque compara as intensidades de luz espalhada da amostra frente aos valores de intensidade de luz tabelados de solventes orgânicos, como o tolueno e o benzeno (Silveira e col., 1996).

Microscópios ópticos de luz polarizada são ferramentas úteis na identificação e estudo de cristais e de polímeros que cristalizam, permitindo o estudo da forma e dimensão dos agregados cristalinos. No caso de amostras que apresentarem estruturas cristalinas na sua composição podem ter a presença destas confirmadas através de uma simples análise no microscópio óptico de luz polarizada. Geralmente as amostras são observadas com os polarizadores cruzados, ou seja, o plano de polarização das ondas que partem do polarizador faz um ângulo de 90° com o plano de polarização permitido pelo analisador, sendo assim a luz é absorvida no analisador ficando o campo de visão totalmente escuro. Esta identificação de cristais se dá graças ao fenômeno da birefringência proporcionada pela luz polarizada, que faz com que certos cristais sejam notados no campo de observação como pontos brilhantes com um contraste característico sobre o campo escuro de observação (Canevarolo Jr., 2004).

A técnica de microscopia óptica é considerada um método oficial <776> da *United States Pharmacopeia* (USP) para caracterização de matérias cristalinos (USP 32, 2009). Colwey e colaboradores (1996) utilizaram a técnica de microscopia eletrônica para determinar a presença de nanocristais em partículas de carbono, demonstrando que a técnica é adequada para a detecção de estruturas cristalinas de tamanho consideravelmente reduzido.

A grande vantagem da técnica de microscopia eletrônica em relação à técnica de microscopia óptica é a grande capacidade de resolução da primeira, esta resolução é considerada em termos de distância, onde dois objetos, que estando separados, apresentam capacidade de distinção entre um e outro. A principal diferença na capacidade de resolução das técnicas de microscopia se dá em função do tipo de radiação utilizada como fonte. Enquanto a técnica de microscopia óptica utiliza como fonte de radiação a luz visível e é capaz, em equipamentos de boa qualidade, de

distinguir duas partículas na ordem de 20 nm (200 Å), a técnica de microscopia eletrônica utiliza um feixe de elétrons de elevada capacidade energética, permitindo distinções entre partículas na faixa de 0,5 nm (5 Å) (Sinko, 2006).

## **4. MATERIAS E MÉTODOS**

---



## **4.1. Materiais**

### **4.1.1 Matérias-primas**

- Metoxicinamato de octila (Embacaps – Brasil);
- Quercetina (Henrifarma – Brasil);
- Poli(*epsilon*-caprolactona) Mw = 65 kDa (Aldrich – França);
- Monoestearato de sorbitano – Span 60<sup>®</sup> (Aldrich – França);
- Fosfatidilcolina – Epikuron 170<sup>®</sup> (Lucas-Meyer – Alemanha);
- Polissorbato 80 (Delaware – Brasil);
- Triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico – TGCC (Brasquim – Brasil).

### **4.1.2 Aparelhos e equipamentos**

- Balança analítica Scientech AS 210 Quimis (Brasil);
- Placa de agitação Multi Stirrer 15 Velp (Itália);
- Dispositivo de aquecimento e circulação de água acoplado a termostato 597 Fisatom (Brasil);
- Evaporador rotatório Büchi R-114 (Suíça);
- Bomba de vácuo SpeediVac 2 Boc Edwards (Brasil);
- Equipamento de difratometria de laser Zetasizer<sup>®</sup> - nanoZS ZEN 3600, Malvern (Reino Unido);
- Potenciômetro digital Micronal B474 (Brasil);

- Espectrofotômetro na região do UV-VIS feixe duplo Shimadzu UV-1601PC, utilizado com cubetas de quartzo de 1 cm de percurso óptico (Japão);
- Refratômetro Carl-Zeiss Abbe-type Jena (Alemanha);
- Espectrofotômetro de correlação de fótons:
  - Fonte de luz laser: íon He-Ne, 35mW,  $\lambda_0 = 632,8$  nm; Spectra-Physics (EUA) e Coherent (EUA);
  - Goniômetro: BI-200M, versão 2.0 Brookhaven Instruments (EUA);
  - Correlacionador digital: BI-9000AT Brookhaven Instruments (EUA);
  - Detector: BI9863 Brookhaven Instruments (EUA);
- TurbiscanLab, Formulation Co. (França);
- Analisador termogravimétrico TGA Q5000 TA Instruments (EUA);
- Calorímetro exploratório diferencial de compensação de fluxo de calor modelo DSC Q20 TA Instruments (EUA);
- Microscópio óptico de luz polarizada Olympus BX41TF (Japão);
- Câmera fotográfica (acoplada ao microscópio óptico de luz polarizada) Olympus PM-20 (Japão);
- Ultra-turrax T25 Basic Ika (EUA) ;
- Homoginizador à alta-pressão Panda 2K NS1001L Niro Soavi (Itália);
- Microcentrífuga 1-14 Sigma (Alemanha).

#### 4.1.3 Solventes e outros materiais

- Acetona grau PA (Nuclear – Brasil);
- Água MilliQ<sup>®</sup> (Millipore – França);
- Funil de injeção (Eppendorf – Alemanha);
- Membrana 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore – França);
- Tolueno grau PA (Nuclear – Brasil).

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Preparação das formulações

As nanocápsulas contendo o flavonóide quercetina e o filtro solar químico metoxicinamato de octila (MCO) foram preparadas de acordo com a técnica de deposição interfacial de polímeros pré-formados, descrita por Fessi e colaboradores (1989). A solução orgânica foi preparada pela dissolução de 0,80 mL de MCO, 0,250 g de poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), 0,025 g de quercetina e 0,190 g de tensoativo (fosfatidilcolina – Epikuron 170<sup>®</sup> ou monoestearato de sorbitano – Span 60<sup>®</sup>) em 67,0 mL de acetona, sob agitação magnética à temperatura de  $40 \pm 1$  °C. A fase aquosa foi preparada pela dissolução de 0,190 g de polissorbato 80 em 133,0 mL de água. Em seguida, a solução orgânica foi injetada com o auxílio de um funil na fase aquosa sob agitação magnética. A suspensão foi mantida sob agitação magnética moderada durante 10 minutos à temperatura ambiente. A suspensão foi, então, transferida para um balão âmbar para a eliminação da acetona e a concentração da formulação a um volume final de 25 mL, empregando evaporador rotatório sob pressão reduzida à temperatura de 40 °C (Weiss-Angeli e col., 2008). As formulações foram preparadas em triplicata (n = 3).

Para fins de comparação, também foram preparadas formulações omitindo-se a quercetina. As amostras foram denominadas NCI, NCII, NCI-QUE e NCII-QUE de acordo com sua composição, conforme descrito na Tabela 1.

**Tabela 1.** Formulações de nanocápsulas

Formulação	Tensoativo(s)	Quercetina (mg/mL)
NCI	Epikuron 170 <sup>®</sup>	0
NCII	Span 60 <sup>®</sup> e Polissorbato 80	0
NCI-QUE	Epikuron 170 <sup>®</sup>	1
NCII-QUE	Span 60 <sup>®</sup> e Polissorbato 80	1

#### **4.2.2 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas**

##### **4.2.2.1 Determinação de pH**

As determinações de pH foram realizadas em potenciômetro (Micronal B-474), previamente calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas suspensões não diluídas. Os resultados representam a média de três determinações de três lotes diferentes (n = 9).

##### **4.2.2.2 Determinação do diâmetro de partícula e índice de polidispersão**

As determinações de diâmetro médio das partículas, distribuição de tamanhos e índices de polidispersão (PDI) foram realizadas a 25 °C através de espalhamento de

luz dinâmico utilizando o equipamento Zetasizer<sup>®</sup> (nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern, EUA). As amostras foram diluídas 500 vezes (v:v) em água (Milli-Q<sup>®</sup>). Para evitar qualquer seleção de amostra somente o meio de diluição foi filtrado em membrana 0,45 µm (Millipore<sup>®</sup>). Três medidas de três lotes foram realizadas para cada amostra (n = 9).

#### **4.2.2.3 Potencial zeta**

As medidas de potencial zeta, obtidas pela determinação da mobilidade eletroforética, foram realizadas após a diluição de 500 vezes (v:v) das amostras em solução aquosa de NaCl 10 mM previamente filtrada em membrana 0,45 µm (Millipore<sup>®</sup>). Três medidas de três lotes foram realizadas para cada amostra (n = 9), foram realizadas no equipamento Zetasizer<sup>®</sup> (nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern, EUA).

#### **4.2.3 Determinação do número de partículas por volume**

A turbidimetria pode ser usada para estimar a densidade de partículas por unidade de volume nas suspensões coloidais (Zattoni e col., 2003; Zattoni e col., 2004; Poletto e col., 2007). As suspensões de NC foram diluídas em água MilliQ<sup>®</sup> obedecendo a lei de Lambert-Beer e analisadas no comprimento de onda de 490 nm (UV-1601PC, Shimadzu, Japão). Para a escolha desse comprimento de onda, foram previamente realizadas varreduras na faixa do UV/VIS (200-800nm) de soluções de MCO (0,05 µg/mL) e de quercetina (2,0 µg/mL) em metanol. Não houve absorção de

qualquer dos componentes acima de 470 nm, sendo então escolhido o comprimento de onda de 490 nm para a determinação da densidade de partículas em suspensão. A turbidimetria  $\tau$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) foi obtida em função da absorvância  $A$  (adimensional) (Eq. 1).

$$\tau = \frac{1}{b} \ln(10)A \quad (1)$$

onde  $b$  (cm) é caminho óptico da cubeta e  $A$  é o sinal da absorvância. Em uma amostra diluída de partículas esféricas,  $\tau$  é uma função do diâmetro de partícula,  $d$  (cm), da concentração das partículas,  $N$  (partículas. $\text{cm}^{-3}$ ), e da grandeza  $W$ , adimensional, a qual é coeficiente de extinção (Equação 2).

$$\tau = \frac{\pi}{4} d^2 N W \quad (2)$$

$W$  é uma função do tipo  $W(x, m)$ , onde  $x$  é o parâmetro de diâmetro definido como  $x = \pi d / \lambda$ , na qual  $\lambda$  (cm) é o comprimento de onda de luz incidente do meio de dispersão, e o parâmetro  $m$  é o índice de refração relativo da partícula. Há um índice de refração relativo fixo,  $W$  pode ser obtido pela relação abaixo (Equação 3).

$$W = \frac{K \cdot 2 \ln(10) \cdot \alpha \cdot d}{3} \quad (3)$$

onde,  $d$  (cm) é o diâmetro de partícula,  $\alpha$  ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) é a densidade da partícula e,  $K$  ( $\text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) é o coeficiente de extinção, que pode ser calculado utilizando-se a Equação 4.

$$W = \ln(10) \cdot K \cdot c \quad (4)$$

onde,  $c$  ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) é a concentração da amostra.

Três medidas de diferentes lotes de NC foram realizadas para cada amostra (n=3).

#### 4.2.4 Razão de Rayleigh para a intensidade média de luz espalhada no espalhamento de luz estático (Silveira e col., 1996)

A Razão de Rayleigh é a maneira mais apropriada de se considerar a intensidade média de luz espalhada por um sistema. A Razão de Rayleigh foi determinada utilizando espectrofotômetro de correlação de fótons Brookhaven Instrument (goniômetro BI200MA, correlacionador digital BI9000AT) como fonte de luz laser de He-Ne ( $\lambda = 632,8$  nm) com  $90^\circ$  de ângulo de observação do espalhamento da luz. A Razão de Rayleigh é obtida pela Equação 5:

$$R_s = \left( \frac{I_{vs}}{I_{vtol}} \right) \cdot \left( \frac{n_s}{n_{tol}} \right) \cdot R_{tol} \quad (5)$$

Onde:

$R_s$  = Razão Rayleigh

$I_{vs}$  = intensidade média de luz espalhada pela suspensão

$I_{vtol}$  = intensidade média de luz espalhada pelo tolueno (solvente de referência)

$\eta_s$  = índice de refração da suspensão

$\eta_{tol}$  = índice de refração do tolueno

Outro tratamento de dados possibilita retirar a influência que o meio solvente desempenha na intensidade de luz espalhada, restando, apenas a influência das partículas espalhantes. Este tratamento é possível graças à equação 6.

$$R_p = R_s - [(1 - \varphi)R_a] \quad (6)$$

Onde:

$R_p$  = Razão Rayleigh da partícula

$\varphi$  = fração volumétrica da entidade espalhante

$R_a$  = Razão Rayleigh da água (solvente)

Para a análise das amostras foi realizada a diluição 5000 vezes em água MilliQ<sup>®</sup>, desta forma, a fração volumétrica foi desconsiderada na resolução da

Equação 6. Esta análise foi realizada na forma de 20 replicatas de cada amostra ( $n = 20$ ).

#### 4.2.4.1 Índice de refração

Para realizar o cálculo da Razão de Rayleigh (seção 4.2.4), o índice de refração ( $\eta_s$ ) de cada suspensão de NC foi determinado à temperatura ambiente utilizando refratômetro (Carl-Zeiss, tipo Abbe). Três medidas foram realizadas para cada amostra ( $n = 3$ ), a partir do gotejamento de três gotas das suspensões de NC no prisma opaco.

#### 4.2.5 Análises de espalhamento múltiplo de luz

As formulações foram avaliadas por um Turbiscan Lab® (Formulation©, França). O sistema de detecção do Turbiscan Lab® é composto por um feixe de luz no infravermelho próximo ( $\lambda = 880\text{nm}$ ) e dois detectores: um de transmissão (T) e outro de retroespalhamento, *backscattering* (BS). O detector (T) recebe a luz que atravessa a amostra (a  $180^\circ$  do feixe incidente), enquanto o detector BS, recebe a luz espalhada e refletida pela amostra (a  $45^\circ$  do feixe de luz incidente). O sistema detector realiza uma varredura do fundo ao topo da cubeta, que contém a amostra, adquirindo dados de T e BS (Dihang e col., 2005). O princípio da medida baseia-se na variação de fração volumétrica ou diâmetro da partícula, resultando em uma variação dos sinais de T e BS. Para partículas que não absorvem luz no comprimento de luz utilizado (880 nm), a intensidade de transmissão e *backscattering* são essencialmente dependentes da concentração de partículas, diâmetro de partícula e índice de refração da mistura.

Esta técnica é vantajosa, pois possibilita que as amostras sejam analisadas sem prévia diluição (Mengual e col., 1999). As formulações (aproximadamente 20 mL) foram colocadas em uma cubeta cilíndrica de vidro transparente (25 mm de largura e 55 mm de altura). As amostras foram aclimatadas a 25 °C durante 15 minutos no equipamento, então, varridas da base da cubeta em direção ao topo por uma fonte de luz pulsante na região do infravermelho próximo (880 nm) a cada 40 µm de altura da cubeta. Uma varredura completa da amostra foi realizada a cada 1 minuto durante 5 minutos. Um modelo de fluxo de luz em função da altura da cubeta foi obtido durante o intervalo de tempo (5 minutos).

Três lotes de cada amostra foram avaliados ( $n = 3$ ). A intensidade de *backscattering* de 100% é dada pelo padrão de calibração utilizando White Teflon II.

#### **4.2.6 Análise térmica**

##### **4.2.6.1 Termogravimetria (TGA)**

Para realizar a análise termogravimétrica (TGA), as suspensões foram transferidas para balões ambar, evaporadas em evaporador rotatório até completa secura a temperatura ambiente, sempre protegidas da luz. As amostras foram mantidas em dessecador por 7 dias. As formulações foram analisadas em analisador termogravimétrico TGA Q5000 (TA Instruments). Uma quantidade inferior a 15 mg foi pesada com exatidão de 4 casas decimais e colocada em painéis de alumínio. A faixa de temperatura analisada foi de 40 a 700 °C com uma taxa de aquecimento de 20 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min). As curvas da primeira derivada da

TGA foram calculadas usando o programa TA Universal Analysis para Windows 2000/XP.

#### **4.2.6.2 Calorimetria exploratória diferencial**

Termogramas das formulações foram obtidos em calorímetro exploratório diferencial de compensação de fluxo de calor DSC Q20 (TA Instruments), calibrado com índio como padrão, após evaporação de cada suspensão em evaporador rotativo sob pressão reduzida. A evaporação em condições ambientais também foi testada, não havendo diferença para duas das amostras entre as técnicas de evaporação, sendo assim escolhida a evaporação sob pressão reduzida para todas as amostras pela economia de tempo. As amostras foram mantidas em dessecador por 7 dias.

As matérias-primas foram analisadas como recebidas, com exceção da PCL que foi previamente dissolvida em acetona, seguida de evaporação à temperatura ambiente para a obtenção de um filme seco.

Foram pesados exatamente cerca de 10 mg de cada amostra e colocados em painéis herméticos de alumínio para então serem seladas. Cada panela foi resfriada em nitrogênio líquido por 1 min previamente às varreduras de temperatura. Antes de iniciar cada varredura a panela foi ambientada a temperatura de -80 °C por 5 min. Todos os experimentos foram realizados na faixa de -80 a 100 °C com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio (50 mL/min). Os termogramas foram obtidos a partir do primeiro e do segundo ciclo de aquecimento. Os picos foram integrados utilizando o programa TA Universal Analysis para Windows 2000/XP.

#### **4.2.7 Microscopia óptica**

Para verificar a presença de cristais nas amostras, as suspensões foram analisadas em microscópio óptico de luz polarizada BX41TF (Olympus). Uma alíquota de cada formulação foi colocada sobre uma lâmina de vidro e sobre ela uma lamínula, as amostras foram analisadas num aumento de 30 vezes. Uma solução de 1 mg/mL preparada a partir da diluição da quercetina em acetona também foi analisada. As imagens foram fotografadas para análise com câmera PM-20 (Olympus) acoplada ao microscópio.

#### **4.2.8 Quantificação da quercetina**

A quercetina, presente nas amostras, foi quantificada por espectroscopia de absorção no ultravioleta no comprimento de onda de 371 nm. As formulações de NC poliméricas foram preparadas a partir da prévia saturação do óleo (mistura dos triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico – TGCC) com quercetina

A saturação do óleo ocorreu a partir da dispersão de aproximadamente 10,0 mg de quercetina em 1,0 mL de TGCC. Esta dispersão foi realizada em eppendorf que foi submetido à banho de ultrassom por 10 min, após o eppendorf permaneceu em repouso por 24 h protegido da luz, para então ser agitado em vortex durante 30 s. Após a dispersão foi submetida a centrifugação a 7000 rpm por 5 min. O sobrenadante desta dispersão foi então coletado para compor o núcleo oleoso das NC.

As formulações de NC foram preparadas da maneira idêntica às NC referidas anteriormente. A composição das NC é descrita na Tabela 2 e Tabela 3.

**Tabela 2.** Composição quali/quantitativa das formulações de NC TGCC A e TGCCB1

Constituinte	NC TGCC A	NC TGCC B1
PCL	0,100 g	0,100 g
TGCC Saturado	0,200 mL	-
TGCC	-	0,200 mL
Acetona	25 mL	25 mL
Polissorbato 80	0,120 g	0,120 g
Água Milli Q®	50 mL	50 mL

**Tabela 3.** Composição quali/quantitativa das formulações de NC TGCC C e TGCCB2

Constituinte	NC TGCC C	NC TGCC B2
PCL	0,100 g	0,100 g
TGCC Saturado	0,350 mL	-
TGCC	-	0,350 mL
Acetona	25 mL	25 mL
Polissorbato 80	0,120 g	0,120 g
Água Milli Q®	50 mL	50 mL

Uma curva de linearidade com 9 pontos foi elaborada na faixa de 1,25 – 30 µg/mL obtendo-se uma relação linear com coeficiente de correlação de 0,99905. A exatidão deste método também foi realizada, a partir da leitura de 3 réplicas de 3 concentrações (5, 10 e 20 µg/mL), obtendo-se uma média de recuperação de 100,67% com desvio padrão relativo (DPR) de 3,09.

Além de ser utilizada para determinar a exatidão, a formulação sem quercetina também foi utilizada para descontar o valor de uma possível interferência causada pelos demais constituintes presentes nas formulações. Paralelamente à quantificação das amostras contendo quercetina, o mesmo procedimento de diluição das alíquotas foi realizado utilizando NC sem quercetina (NC poliméricas).

Para as NC poliméricas alíquotas de 1,5 mL foram coletadas e diluídas em acetona para balão volumétrico âmbar de 10 mL. Aproximadamente 5 mL desta

diluição foram colocados em eppendorfs e submetidos a centrifugação por 5 min à 7000 rpm. O polímero presente nas NC precipitou, o sobrenadante foi coletado, filtrado e lido no espectrofotômetro.

Os teores obtidos são a média de 3 leituras. O método empregado demonstrou adequada linearidade e exatidão.

#### 4.2.9 Preparação das nanopartículas por homogeneização à alta-pressão

As nanopartículas foram preparadas a partir da mistura do Span 60®, com os triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (TGCC) e quercetina por volta de 60° C em banho-maria. Esta mistura foi vertida sob uma fase aquosa contendo polissorbato 80. Esta suspensão foi submetida ao Ultra-Turrax, a 8000 rpm durante 1 min. A formação das nanopartículas ocorreu após 6 ciclos de homogeneização da suspensão a 500 bar, empregando homogeneizador à alta-pressão Panda 2K NS 1001L Niro Soavi.

As nanoemulsões preparadas apresentaram a seguinte composição conforme descrito nas Tabelas 4 e 5.

**Tabela 4.** Composição quali/quantitativa das formulações de NE A

Constituinte	NE A
TGCC	20,0 mL
Quercetina	1,0g
Span 60®	5,0 g
Polissorbato 80	1,0 g
Água Milli Q® qsp	200 mL

**Tabela 5.** Composição quali/quantitativa das formulações de NE C

Constituinte	NE C
TGCC	20,0 mL
Quercetina	0,5
Span 60 <sup>®</sup>	5,0 g
Polissorbato 80	1,0 g
Água Milli Q <sup>®</sup> qsp	200 mL

Para verificar a presença de cristais na amostra de NE o doseamento foi realizado conforme descrito por Pohlmann e colaboradores 2008, onde uma parte da formulação foi armazenada em frasco âmbar que foi mantida em repouso durante o período do estudo tendo as alíquotas coletas da região central do frasco e a outra parte da formulação foi mantida em um frasco âmbar que foi agitado vigorosamente em vortex antes da coleta de cada alíquota.

Para as NE uma alíquota de 0,5 mL da formulação em repouso e da formulação em movimento foram coletados e diluídos em acetona para balão volumétrico âmbar de 10 mL (Solução I). 0,5 mL da Solução I foram coletados e novamente diluídos em acetona em balão volumétrico de 10 mL (Solução II). A Solução II foi lida no espectrofotômetro. Paralelamente, um simulado da formulação branca, contemplando todos os constituintes da nanomemulsão (NE), com exceção da quercetina, foi submetido às mesmas diluições para fins de controle.

#### **4.2.10 Análise Estatística**

Os dados foram analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) ou teste-*t* com nível de significância de 0,05%, empregando o programa Sigma Stat para Windows versão 3.5.

#### **4.2.11 Descarte de resíduos**

Todos os resíduos químicos gerados, durante a preparação e a caracterização das formulações, foram segregados, acondicionados e identificados segundo as normas do Plano de Gerenciamento de Resíduos implementado pela Resolução COSAT 01/07, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---



## 5.1 Caracterização físico-química das nanocápsulas

As formulações NCI, NCI-QUE, NCII e NCII-QUE apresentaram-se macroscopicamente homogêneas e com aspecto leitoso, típico de dispersões coloidais. A Tabela 6 relaciona as características de diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das formulações de NC.

**Tabela 6.** Características físico-químicas das formulações de NC após preparação (n=9)

Formulação	Diâmetro médio (nm)	PDI (adimensional)	pH	Potencial zeta (mV)
NCI	171 ± 3	0.10 ± 0.03	4.78 ± 0.06	-26 ± 3
NCII	221 ± 7	0.14 ± 0.02	5.85 ± 0.04	-12 ± 1
NCI-QUE	190 ± 3	0.11 ± 0.05	4.97 ± 0.01	-26 ± 3
NCII-QUE	212 ± 10	0.15 ± 0.03	5.51 ± 0.10	-11 ± 2

PDI = índice de polidispersão

A medida do diâmetro das partículas por espalhamento de luz dinâmico revelou que os valores de diâmetro médio são menores para as formulações preparadas com Epikuron 170<sup>®</sup> (NCI e NCI-QUE) e maiores para aquelas preparadas com monoestearato de sorbitano e polissorbato 80 (NCII e NCII-QUE). Todos os índices de polidispersão foram inferiores à 0,20, indicando homogeneidade na distribuição das partículas. Estes valores encontrados estão de acordo com os verificados por Weiss-Angeli e colaboradores 2008 para os mesmos sistemas.

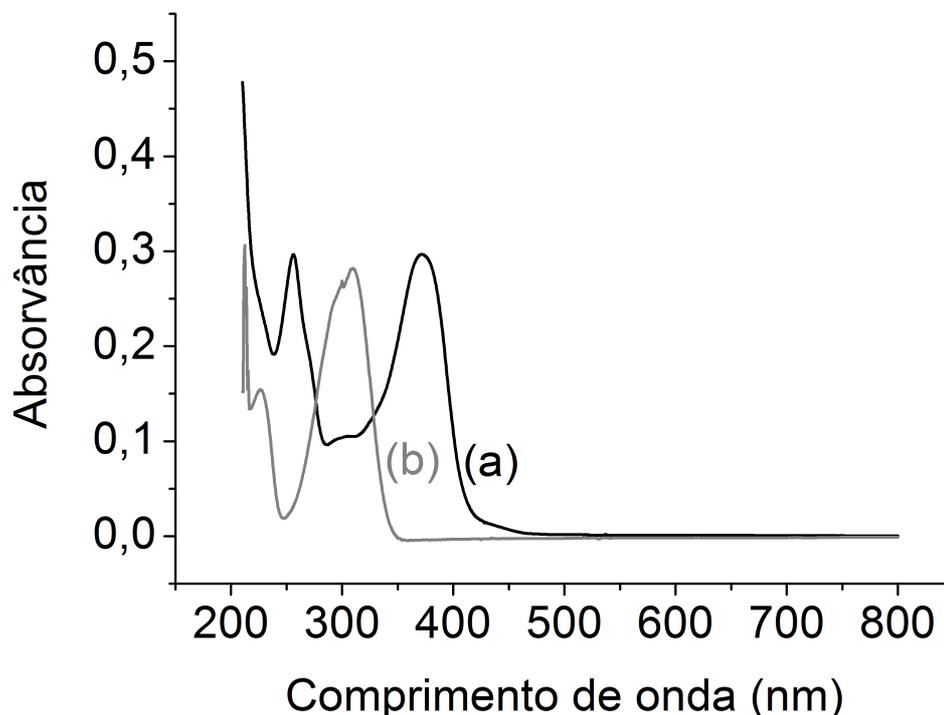
Os valores de potencial zeta para NCII e NCII-QUE foram de -12 e -11 mV, respectivamente, enquanto as formulações NCI e NCI-QUE tiveram valores de potencial zeta de -26 mV. Os valores negativos de potencial zeta estão relacionados à natureza química dos materiais na interface partícula/água. Para as formulações

contendo Span 60<sup>®</sup>, tanto a presença dos grupos carboxilatos (-COO-) presentes na cadeia principal da PCL, como o revestimento com polissorbato 80 determinaram que o potencial zeta fosse negativo. Para as formulações contendo Epikuron 170<sup>®</sup>, o potencial zeta foi ainda menor do que nas formulações contendo Span 60<sup>®</sup> em função da interface, que é revestida por fosfatidilcolina, a qual contém ácido fosfatídico na sua composição (Mosqueira e col., 2000). A quercetina não influenciou os valores de potencial zeta em ambos os casos. Os valores de potencial zeta verificados são adequados para manter o sistema sem agregação e precipitação das nanoestruturas, graças à repulsão eletrostática que as mesmas apresentam, resultante da densidade de carga da superfície.

O pH das formulações contendo Span 60<sup>®</sup> e polissorbato 80 foi próximo a 5,5 estando de acordo com Schaffazick e colaboradores (2003), uma vez que nanoestruturas preparadas a partir do método de nanoprecipitação e que utilizaram poliésteres apresentaram valores de pH em torno de 6,0. Já as formulações que utilizaram o Epikuron 170<sup>®</sup> como sistema tensoativo apresentaram um valor de pH ligeiramente inferior, em torno de 5,0 o que provavelmente se dê em função da presença do ácido fosfatídico. Os valores de pH levemente ácidos apresentados pelas NC são adequados para o uso tópico das formulações em uma eventual incorporação das mesmas em sistemas semi-sólidos (Alves e col., 2007).

## **5.2 Determinação do número de partículas por volume**

Para verificar se a estabilidade da quercetina e do metoxicinamato de octila estaria relacionada com a densidade de partículas nas formulações, o número de partículas (N) foi calculado através do experimento de turbidimetria. Soluções metanólicas contendo quercetina e metoxicinamato de octila foram varridas na região UV-VIS de acordo com a Figura 5.



**Figura 5.** Espectro UV-VIS (a) quercetina 2 µg/mL e (b) OMC 0,05 µg/mL dissolvidos em metanol.

O comprimento de onda selecionado para as formulações NCI-QUE e NCII-QUE foi 490 nm, enquanto que para as formulações NCI e NCII as leituras foram realizadas em 400 nm, pois foram os comprimentos de onda mais próximos ao diâmetro médio onde não há absorção de fótons.

Inicialmente, a turbidimetria foi determinada para as formulações NCI-QUE e NCII-QUE. A região do UV-VIS onde não ocorreu absorção dos componentes da formulação foi a escolhida para a realização da turbidimetria.

Os valores de  $N$  (partículas. $\text{cm}^{-3}$ ) para NCI-QUE e NCII-QUE foram de  $1,93 \pm 0,15$  ( $\times 10^{13}$ ) e  $1,66 \pm 0,24$  ( $\times 10^{13}$ ), respectivamente sendo que os mesmos são iguais estatisticamente ( $P > 0,05$ ). Este resultado sugere que o espalhamento de luz, responsável pela maior fotoestabilidade da formulação NCII-QUE (Weiss-Angeli e col., 2008), provavelmente não esteja relacionado com o maior número de partículas na suspensão NCII-QUE, mas pode ser uma consequência da natureza dos materiais que constituem a formulação. Desta forma, a presença de quercetina nas formulações

poderia estar influenciando na intensidade de luz espalhada. Sendo assim, para investigar se a quercetina estava influenciando o comportamento destas suspensões (NCI-QUE e NCII-QUE), o número de partículas por volume também foi verificado para NCI e NCII.

As formulações preparadas sem a quercetina (NCI e NCII) foram analisadas em 400 nm. Surpreendentemente o valor de N (partículas/cm<sup>3</sup>) foi menor para a formulação NCII [0,91±0,12 (x 10<sup>13</sup>)] do que o valor determinado para a formulação NCI [1,44±0,28 (x 10<sup>13</sup>)], havendo diferença estatística significativa (P < 0,05) entre os grupos. Estes resultados demonstram que o maior espalhamento de luz verificado para as formulações contendo Span 60<sup>®</sup> e polissorbato 80, não se dá em razão do maior número de partículas por volume da suspensão. Analisando os dados de turbidimetria, pode-se deduzir que as formulações NCI e NCI-QUE por apresentarem um diâmetro médio inferior às formulações NCII e NCII-QUE, teriam conseqüentemente um maior número de partículas por volume de suspensão.

Deste modo, a hipótese previamente formulada não é válida. Além disso, comparando os valores de NCII-QUE e NCII, a presença da quercetina influenciou o número de partículas por volume de maneira estatisticamente significativa (P < 0,05). Assim, uma nova hipótese foi levantada: a fotoestabilidade da quercetina e do MCO poderia estar relacionada a uma maior intensidade de espalhamento de luz das suspensões devido à natureza dos seus componentes.

### **5.3 Razão de Rayleigh para a intensidade média de luz espalhada no espalhamento de luz estático**

Em um trabalho prévio desenvolvido por nosso grupo (Pohlmann e col., 2008), o espalhamento de luz estático foi utilizado para obter informações sobre a intensidade

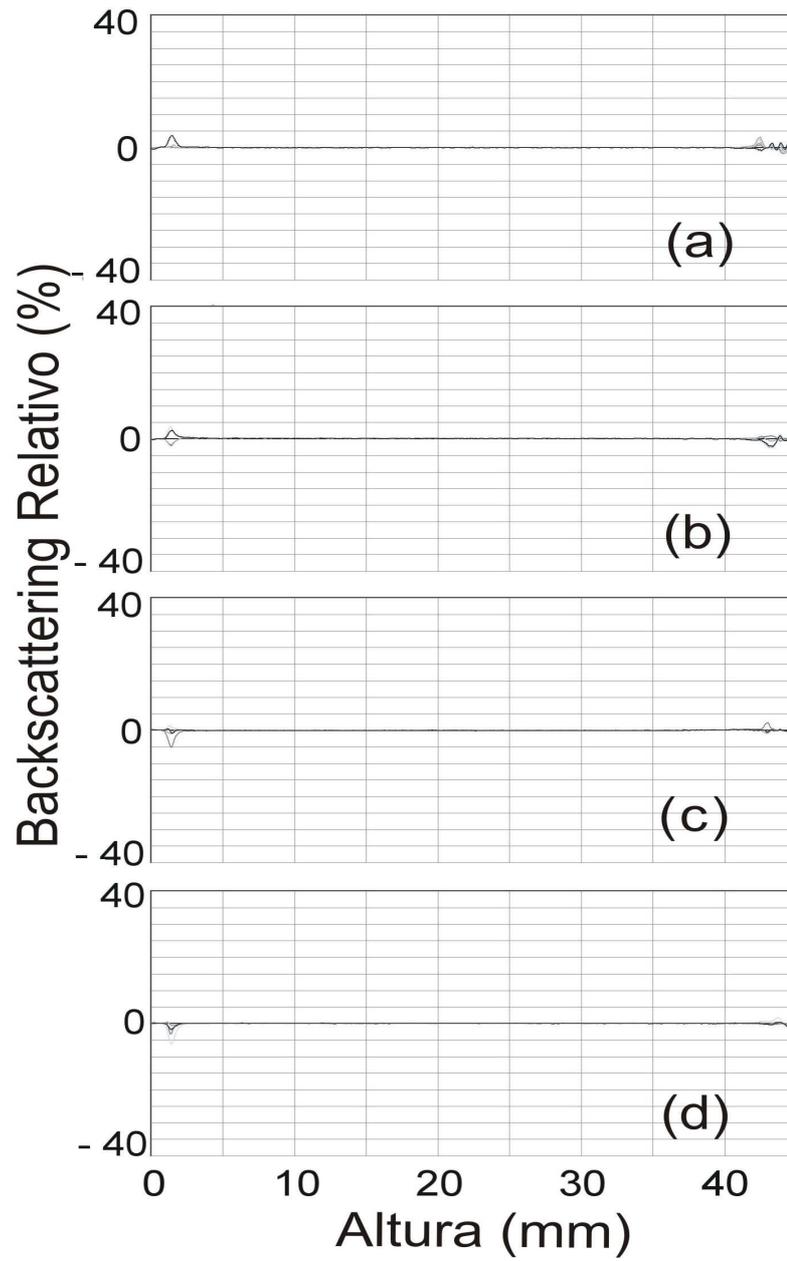
de luz espalhada de formulações de nanocápsulas através do cálculo da Razão de Rayleigh.

Para resolver a Equação 5, os índices de refração foram determinados para as formulações NCI, NCII, NCI-QUE e NCII-QUE (1,3406; 1,3406; 1,3407 e 1,3409, respectivamente), apresentando desvio padrão inferior a 0,0001 para todas as formulações. NCI e NCII apresentaram valores de Razão de Rayleigh de  $1,81 \pm 0,13$  ( $\times 10^{-5}$ ) e  $6,40 \pm 0,19$  ( $\times 10^{-5}$ ), respectivamente. Os valores foram significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) indicando maior capacidade de espalhamento das formulações contendo Span 60<sup>®</sup> e polissorbato 80 comparada com a formulação contendo Epikuron 170<sup>®</sup>. Por outro lado, as formulações contendo quercetina (NCI-QUE e NCII-QUE) apresentaram valores de Razão de Rayleigh de  $1,49 \pm 0,03$  ( $\times 10^{-4}$ ) e  $1,54 \pm 0,06$  ( $\times 10^{-4}$ ), respectivamente, que são estatisticamente iguais ( $P > 0,05$ ). As nanocápsulas efetivamente atuam como filtros solares físicos e o sistema tensoativo utilizado na formulação (Span 60<sup>®</sup> e polissorbato 80 ou Epikuron 170<sup>®</sup>) influenciou a intensidade de luz espalhada das suspensões. Desta forma, a última hipótese foi validada. Além disso, ambas as formulações preparadas com quercetina (NCI-QUE e NCII-QUE) espalharam a luz 8 vezes e 2 vezes mais que as respectivas formulações preparadas omitindo o antioxidante (NCI e NCII). No entanto, a similaridade entre os valores de Razão de Rayleigh das formulações NCI-QUE e NCII-QUE e sua magnitude comparada às formulações NCI e NCII sugerem que a quercetina esteja provavelmente na interface partícula/água e/ou estabilizada como nanocristais nas suspensões. Neste sentido, as formulações foram analisadas através de espalhamento múltiplo de luz e análise térmica.

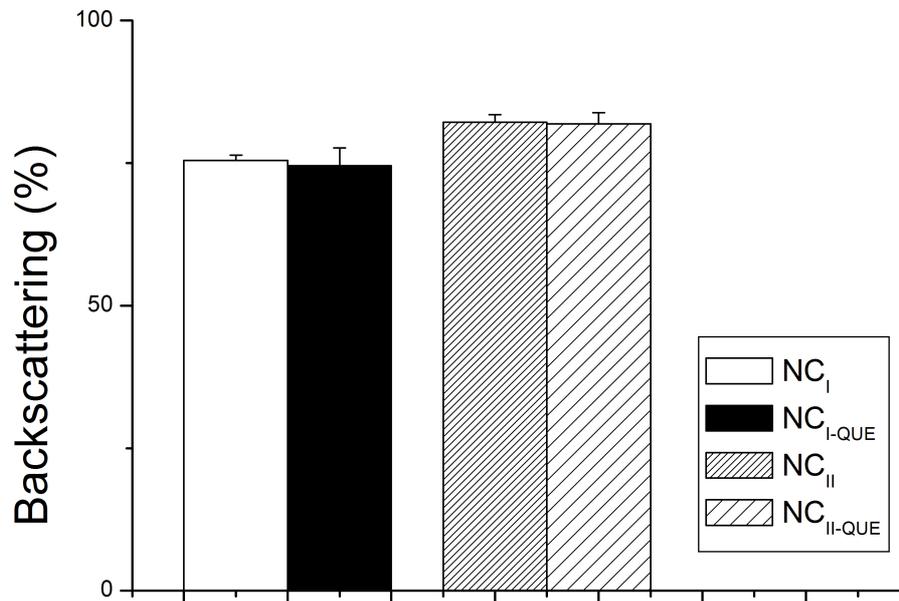
## 5.4 Análises de retroespalhamento de luz

A Razão de Rayleigh foi determinada a partir da diluição das suspensões (5000 vezes). Desta maneira, a influência dos cristais de quercetina pode ser maior, uma vez que a intensidade de luz é maior para os cristais do que para as nanocápsulas (Pohlmann e col., 2008), ou menor porque a quercetina pode se solubilizar com a diluição das suspensões em água.

Com o objetivo de verificar o comportamento das suspensões sem a necessidade de diluição, as suspensões de nanocápsulas foram analisadas através do espalhamento múltiplo de luz no equipamento TurbiscanLab<sup>®</sup>. Para todas as formulações, o sinal de transmitância (T) foi nulo da base ao topo da cubeta, durante o período do experimento. As intensidades de backscattering ( $B_s$ ) no meio da cubeta (10 – 35 mm) foram de 75% para ambas as formulações preparadas com Epikuron 170<sup>®</sup> (NCI e NCI-QUE) com desvio padrão de 1 e 2% respectivamente. Para as formulações preparadas com Span 60<sup>®</sup> e polissorbato 80 (NCII e NCII-QUE), ambos os valores de  $B_s$  foram 82%, tendo como desvio padrão 1 e 2% respectivamente. Aplicando a análise estatística verificou-se que estes valores são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Os perfis relativos à primeira medida são apresentados na Figura 6, enquanto os histogramas referentes aos valores de backscattering estão na Figura 7.



**Figura 6.** Perfil de Backscattering (0 a 5 min, relativo a primeira medida) das formulações (a) NCI; (b) NCII; (c) NCI-QUE e (d) NCII-QUE.



**Figura 7.** Backscattering (%) no t = 0 min das formulações NCI, NCII, NCI-QUE e NCII-QUE (n = 3).

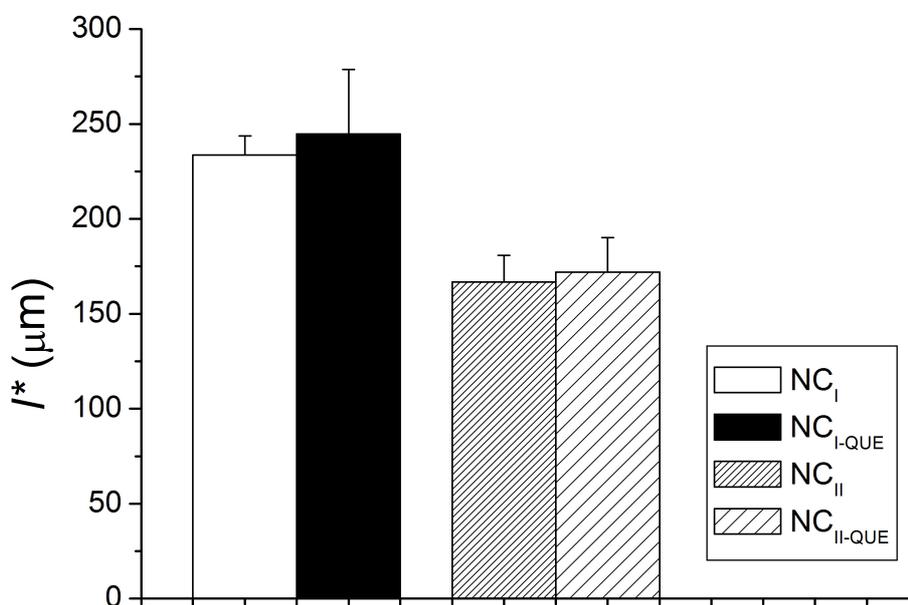
O percentual de  $B_s$  de uma amostra é proporcional a sua fração volumétrica ( $\phi$ ) e ao seu diâmetro de partícula ( $d$ ), Equação 7 e Equação 8

$$B_s \sim \frac{1}{(l^*)^{0.5}} \quad (7)$$

$$l^*(d, \phi) = \frac{2d}{[3\phi(1-g)Q_s]} \quad (8)$$

onde  $l^*(\mu\text{m})$  é o caminho percorrido pelo fóton no meio,  $Q_s$  é o coeficiente de luz espalhada (adimensional) e  $g$  (adimensional) é o fator de assimetria (Mengual e col., 1999B). Então, o sinal de  $B_s$  (t = 0 min) no meio da cubeta foi utilizado para obter o parâmetro  $l^*$ . As formulações NCI, NCII, NCI-QUE e NCII-QUE apresentaram valores de  $l^*$  de  $234 \pm 10 \mu\text{m}$ ,  $168 \pm 14 \mu\text{m}$ ,  $245 \pm 34 \mu\text{m}$  e  $172 \pm 18 \mu\text{m}$ , respectivamente conforme indicado na Figura 8. Aplicando a análise estatística verificou-se que estes valores são significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) utilizando ANOVA. Ao aplicar o teste Holm-Sidak esta diferença foi confirmada ( $P < 0,05$ ) entre as formulações preparadas com diferentes composições de tensoativos (NCI-QUE vs. NCII, NCI-QUE

vs. NCII-QUE, NCI vs. NCII e NCI vs. NCII-QUE), enquanto o mesmo teste demonstrou igualdade estatística ( $P > 0,05$ ) entre as formulações contendo ou não quercetina preparadas com a mesma composição de sistema tensoativo (NCI-QUE vs. NCI e NCII-QUE vs. NCII). A análise estatística confirmou que  $l^*$  foi dependente da composição de tensoativo nas nanocápsulas. Além disso, as formulações preparadas com Span 60<sup>®</sup> e polissorbato 80 apresentaram os valores mais altos de  $Q_s$ , demonstrando que a composição qualitativa das suspensões de nanocápsulas influencia o comportamento de espalhamento da luz.



**Figura 8.** Caminho percorrido pelo fóton  $l^*$  (μm) no  $t = 0$  min das formulações NCI, NCII, NCI-QUE e NCII-QUE ( $n = 3$ ).

Considerando todos os resultados juntos, a fotoproteção previamente observada por Weiss-Angeli e col., 2008 foi também em função da composição dos diferentes sistemas tensoativos, que influenciaram a intensidade de espalhamento de luz das suspensões. Além disso, a quercetina poderia estar atuando simultaneamente como *scavenger* (captador de radicais livres) e espalhando a luz, se uma porção molecular bem como uma porção nanocristalina estivessem simultaneamente presentes nas

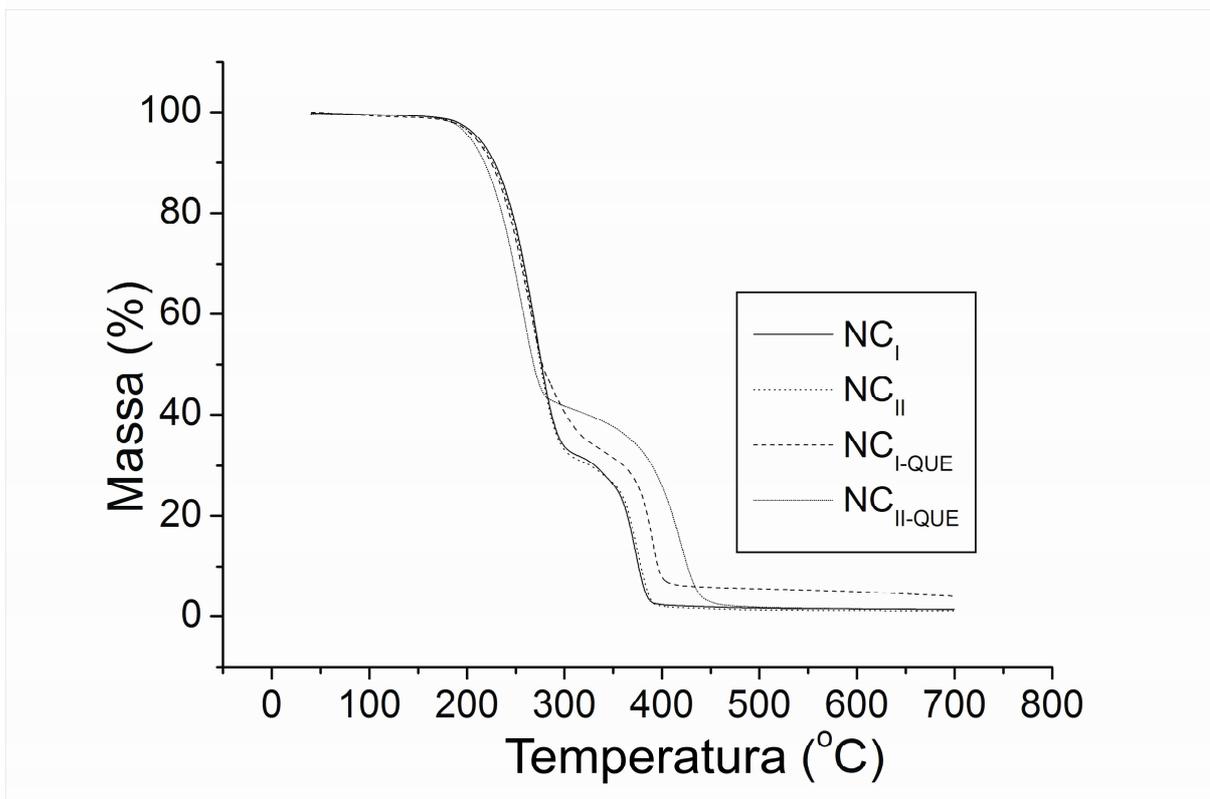
formulações. Deste modo, a análise térmica e a microscopia óptica foram realizadas para avaliar esta possibilidade.

## **5.5 Análise térmica**

### **5.5.1 Termogravimetria (TGA)**

Para verificar a capacidade da quercetina em atuar como captador de radicais, as formulações foram analisadas através de TGA. As curvas de TGA obtidas para as formulações de nanocápsulas secas, conforme descrito na seção 4.2.6.1, estão apresentadas na Figura 9.

Uma redução da massa total das nanocápsulas, correspondente a 90% das amostras, ocorreu a uma temperatura por volta de 377 °C para as formulações preparadas sem quercetina (NCI e NCII). Entretanto, para as formulações contendo quercetina (NCI-QUE e NCII-QUE), as temperaturas para que uma redução da massa total das nanocápsulas correspondente a 90% ocorreu em 396 e 427 °C, respectivamente.



**Figura 9.** Curvas de TGA para as formulações de nanocápsulas NCI, NCII, NCI-QUE e NCII-QUE.

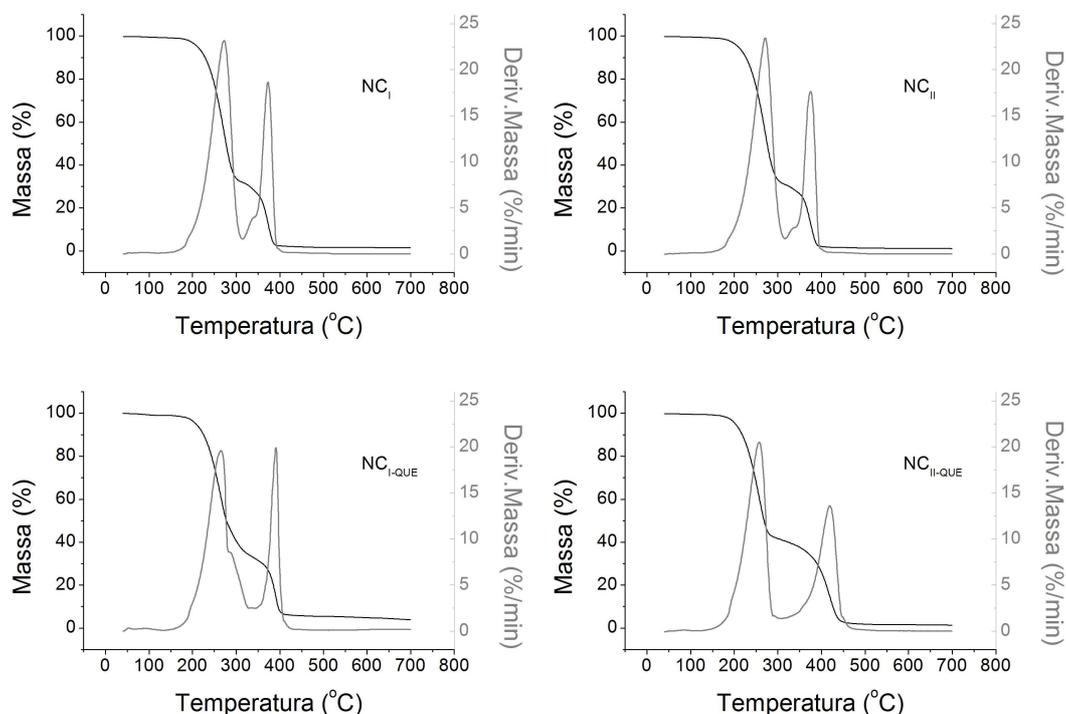
A Tabela 7 indica as temperaturas em que ocorreram 10, 50, 90% de perda de massa total. Comparando as formulações preparadas com Epikuron 170<sup>®</sup> foram necessários 20 °C a mais para reduzir 90% da massa total das nanocápsulas com quercetina (NCI-QUE) quando comparada a formulação preparada sem a presença da quercetina (NCI), enquanto que para as formulações preparadas com o sistema tensoativo Span 60<sup>®</sup> e polissorbato 80 essa diferença para reduzir 90% da massa total das nanocápsulas foi ainda maior, sendo de 49 °C a mais para a formulação com quercetina (NCII-QUE) frente a formulação preparada sem o flavonóide (NCII). Independentemente do sistema tensoativo, maior energia foi requerida para provocar a degradação química das nanocápsulas contendo quercetina comparada com aquelas preparadas sem o antioxidante.

**Tabela 7.** Resultados de TGA para as formulações de nanocápsulas

Formulação	T <sub>0.1</sub> (°C)	T <sub>0.5</sub> (°C)	T <sub>0.9</sub> (°C)	ΔT <sub>0.9</sub> (°C)
NCI	228	276	376	-
NCII	227	275	378	-
NCI-QUE	225	277	396	20
NCII-QUE	218	268	427	49

T<sub>0.1</sub> = temperatura em que ocorreu 10% de perda da massa total; T<sub>0.5</sub> = temperatura em que ocorreu 50% de perda da massa total; T<sub>0.9</sub> = temperatura em que ocorreu 90% de perda da massa total; ΔT<sub>0.9</sub> = diferença de temperatura em que ocorreu 90% de perda da massa total entre NCI-QUE e NCI; NCII-QUE e NCII.

Os perfis da primeira derivada da curva de TGA (DTG) fornecem informações mais detalhadas sobre o comportamento da troca de massa ocorrida durante o processo de oxidação. A perda de massa ocorreu em pelo menos dois estágios, conforme indica a Figura 10, que representa os perfis de TGA, enquanto a linha cinza corresponde à primeira derivada da curva de TGA (DTG).

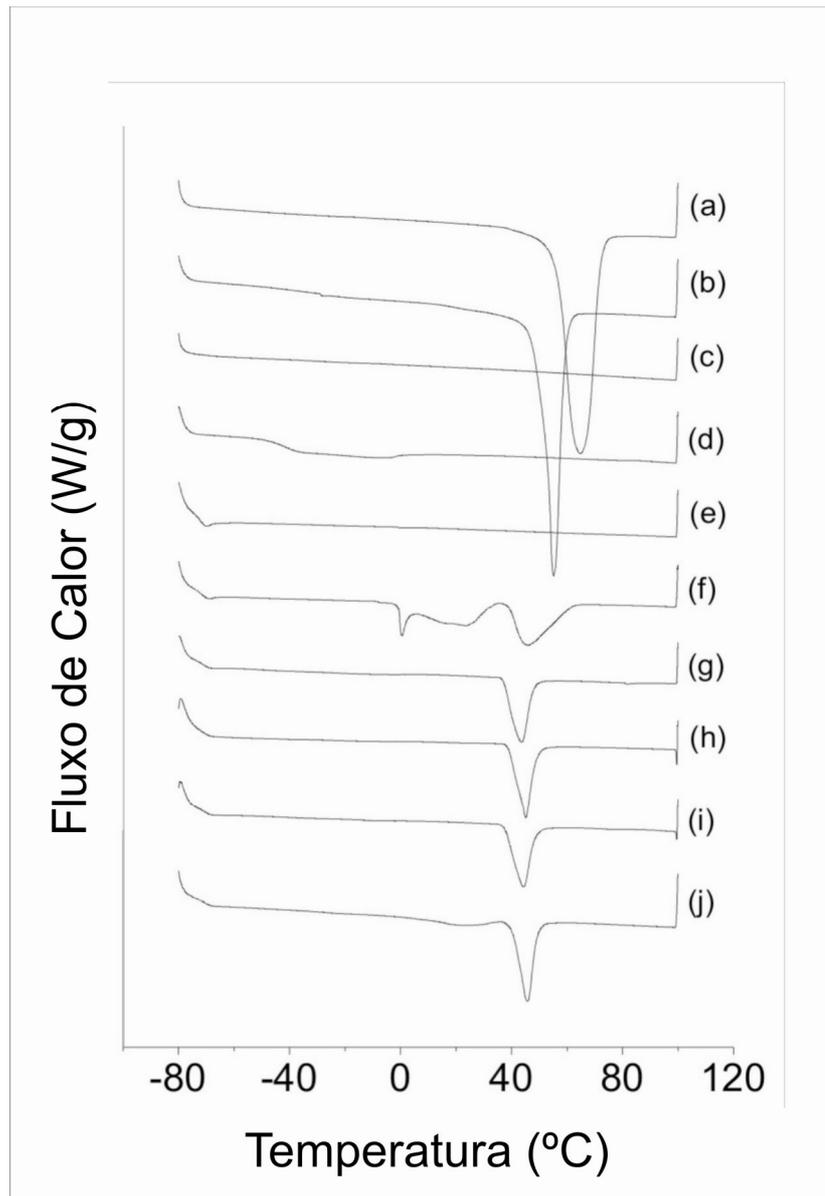
**Figura 10.** Perfis de TGA das formulações NCI, NCII, NCI-QUE e NCII-QUE, a linha cinza corresponde à primeira derivada da TGA (DTG).

No primeiro estágio, a taxa de perda máxima ocorreu por volta de 20 %/min em uma faixa de temperatura que variou de 257 a 272 °C para todas as amostras. No segundo estágio de aquecimento, as formulações NCI e NCII apresentaram a taxa de perda máxima de aproximadamente 19 %/min em 374 °C. A taxa de perda máxima (20 %/min) para NCI-QUE ocorreu em 391 °C, enquanto para NCII-QUE a taxa de perda máxima (14 %/min) se deu em 419 °C. Portanto, a magnitude do efeito protetor conferido pela quercetina foi afetada pelo tipo de sistema tensoativo empregado. A presença de Span 60<sup>®</sup> e de polissorbato 80 forneceu uma melhor estabilidade química para as nanocápsulas contendo quercetina do que o uso de Epikuron 170<sup>®</sup>.

### **5.5.2 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

O experimento de DSC foi conduzido para verificar a possibilidade da porção cristalina da PCL estar interagindo com a quercetina e se a localização da quercetina seria a interface partícula/água. As nanocápsulas secas, conforme descrito na seção 4.2.6.1, foram submetidas à análise de DSC.

Os termogramas das matérias-primas, da mistura física PCL:MCO (1:3 m/m) e das formulações NCI, NCII, NCI-QUE e NCII-QUE, apresentados na Figura 11, mostraram que, no primeiro ciclo de aquecimento, os picos endotérmicos para o filme de PCL (preparado como descrito na seção 4.2.6.2) e para o Span 60<sup>®</sup> foram 64,8 e 55,1 °C, respectivamente. Estes valores para estas matérias-primas são reduzidos para 56,9 e 53,9 °C no segundo ciclo de aquecimento. Este comportamento térmico está de acordo com o previamente verificado por Müller e colaboradores (2001). Epikuron 170<sup>®</sup>, MCO e quercetina não apresentaram nenhum evento endotérmico na faixa de temperatura analisada neste experimento (-80 a 100 °C). A quercetina funde a 310 °C (Wu e col., 2008) tornando impraticável a análise das suspensões de NC secas até esta temperatura devido a degradação das amostras, observada por volta de 200 °C, como demonstrado anteriormente pelo experimento de TGA.



**Figura 11.** Termogramas de DSC (a) PCL; (b) Span 60<sup>®</sup>, (c) QUE, (d) Epikuron 170<sup>®</sup>, (e) MCO, (f) PCL:MCO 1:3 m/m, (g) NCI, (h) NCII, (i) NCI-QUE, (j) NCII-QUE. Primeiro ciclo de aquecimento.

O primeiro ciclo de aquecimento permite avaliar a influência do processo de preparação nas propriedades térmicas das amostras (Poletto, 2006), enquanto o segundo ciclo de aquecimento apresenta as interações físico-químicas entre os materiais, desconsiderando a influência da história térmica da amostra. Todas as nanocápsulas apresentaram um pico endotérmico próximo a 45 °C no primeiro ciclo de aquecimento, que foi reduzido para aproximadamente 38 °C no segundo ciclo de aquecimento. Os valores são semelhantes aos obtidos para a dispersão de PCL:MCO (1:3 m/m) onde se observaram picos em 46 e 41 °C para o primeiro e segundo ciclo de

aquecimento, respectivamente. Desta forma, o pico endotérmico verificado nas nanocápsulas corresponde à fusão da PCL.

A entalpia de fusão pode ser definida como a quantidade de calor necessária para fundir 1 grama de um determinado material no estado sólido (Ford e Timmins, 1989). Valores elevados de entalpia de fusão sugerem maior estabilidade dos arranjos cristalinos. Sendo assim, maior energia é requerida para romper as interações intermoleculares.

Comparando os resultados verificados para a PCL na forma de filme com a PCL presente nas nanocápsulas e na dispersão em MCO, a redução da temperatura de fusão da PCL nos últimos termogramas indica que o grau de perfeição dos cristalitos da PCL foi menor nas nanocápsulas e na dispersão desta em MCO do que no filme do polímero, sugerindo que a cristalinidade da PCL foi consideravelmente reduzida em sua dispersão em MCO e nas formulações de nanocápsulas. O cálculo das entalpias de fusão ( $\Delta H_m$ ) foi realizado a partir da integração dos picos endotérmicos dos termogramas com auxílio do programa TA Universal Analysis para Windows 2000/XP. O valor de  $\Delta H_m$  da PCL no filme passou de 109 J/g para 23 e 18 J/g na dispersão em MCO e nas nanocápsulas, respectivamente, sugerindo que a cristalinidade da PCL na dispersão em MCO e nas nanocápsulas foi reduzida quando comparada à PCL na forma de filme.

Apesar da alteração na cristalinidade do polímero na dispersão PCL:MCO (1:3 m/m) estudos de inchamento de polímero no MCO realizados previamente por Weiss-Angeli e col., 2009 demonstraram que não ocorreu alteração na massa do polímero após 13 dias de avaliação, o que evidencia que o óleo não dissolveu o polímero, desta forma, a estrutura das NC foi mantida.

O grau de cristalinidade de polímeros pode ser calculado empregando a Equação (7) conforme proposto por Modesti e colaboradores (2006):

$$\chi_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^o} \cdot 100 \quad (7)$$

onde:

$\chi_c$ : grau de cristalinidade;

$\Delta H_m$ : entalpias de fusão obtidas experimentalmente;

$\Delta H_m^o$  entalpia de fusão para a PCL 100% cristalina (146 J/g) (Vogelsanger e col., 2003).

A Tabela 8 apresenta os parâmetros térmicos de temperatura de fusão, a entalpia de fusão, a temperatura *onset* (temperatura que se inicia a formação do pico) e o grau de cristalinidade das nanocápsulas e de suas matérias-primas.

**Tabela 8.** Parâmetros térmicos das nanocápsulas e matérias-primas (faixa de temperatura: -80 a 100 °C)

Amostra	Primeiro ciclo de aquecimento				Segundo ciclo de aquecimento			
	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>onset</sub> (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)	$\chi_c$ (%)	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>onset</sub> (°C)	$\Delta H_m$ (J/g)	$\chi_c$ (%)
PCL	64,8	56,3	109	75	56,9	52,8	62	42
Span 60 <sup>®</sup>	55,1	51,5	75	-	53,9	43,8	58	-
QUE*	-	-	-	-	-	-	-	-
Epikuron 170 <sup>®</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
COM	-	-	-	-	-	-	-	-
PCL:MCO (1:3 m/m)	45,9	39,1	23	16	40,8	27,8	18	12
NCI	43,5	37,1	18	12	37,0	26,1	15	10
NCII	45,1	39,9	19	13	38,6	29,1	15	10
NCI-QUE	44,2	37,6	17	12	37,8	27,0	14	10
NCII-QUE	45,7	40,4	19	13	38,7	31,0	15	10

\* O pico de fusão da quercetina não foi detectado na faixa de temperatura avaliada neste experimento.

Os valores de grau de cristalinidade verificados indicam que a presença do MCO nas nanocápsulas e na dispersão PCL:MCO (1:3 m/m) reduziu a cristalinidade

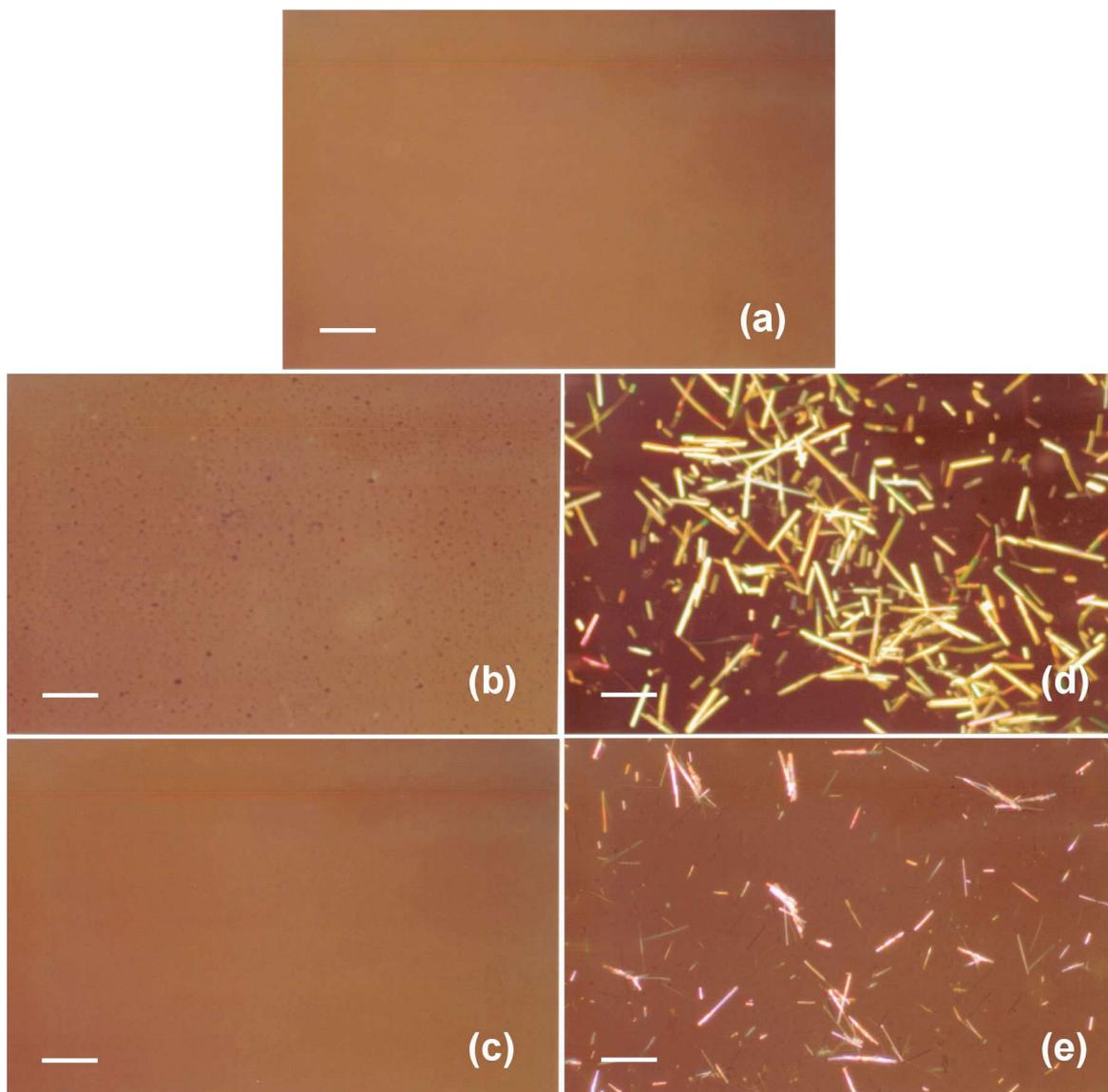
do polímero. A elevada cristalinidade verificada para o filme de PCL (75%) quando comparada a demais trabalhos na literatura (Poletto, 2006) pode ser explicada em função da utilização neste trabalho de um filme de polímero dissolvido em acetona, no lugar da PCL conforme recebida pelo fabricante, que foi a forma de avaliação da PCL pelo autor citado anteriormente.

A presença da quercetina e o tipo de sistema tensoativo não influenciaram o comportamento térmico da PCL nas nanocápsulas. Além disso, os resultados mostraram que a porção cristalina da PCL não está interagindo extensivamente com os materiais antes das amostras serem aquecidas. O resultado indica que a quercetina não está na interface partícula/água. Portanto, os dados de Razão de Rayleigh indicam a presença de nanocristais de quercetina nas formulações. A partir disso, considerando todos os dados, pode-se afirmar que os nanocristais de quercetina também são responsáveis pela estabilização do OMC como verificado por Weiss-Angeli e colaboradores (2008).

## **5.6 Microscopia óptica**

Com o objetivo de confirmar os dados levantados através da análise de DSC e da Razão de Rayleigh, foram obtidas fotografias de microscopia óptica de luz polarizada das amostras e da solução de quercetina em acetona (1 mg/mL). As imagens representadas na Figura 12 demonstram a presença de cristais nas formulações contendo quercetina (NCI-QUE e NCII-QUE). De acordo com Layre e colaboradores (2005), a formação dos cristais através do método de nanoprecipitação, ocorre quando a acetona é removida através da evaporação levando à um decréscimo na solubilidade do fármaco no meio de dispersão. O tamanho dos cristais (em torno de 50  $\mu\text{m}$ ) é maior que o tamanho verificado para nanocápsulas da formulação, isto pode ser explicado em função do atrito entre os cristais das formulações, a lâmina e a

lamínula, que serve como ponto de nucleação para o crescimento dos cristais (Mersmann e col., 2001).



**Figura 12.** Fotografias de microscopia óptica de luz polarizada das suspensões de nanocápsulas e da solução de quercetina em acetona (a) solução de QUE em acetona (1 mg/mL); (b) NCI; (c) NCII; (d) NCI-QUE; (e) NCII-QUE. Barra corresponde a 50  $\mu\text{m}$ .

## 5.7 Doseamento da quercetina

As formulações de NC foram preparadas sem a presença de MCO, o núcleo oleoso das NC foi substituído por triglicerídeos do ácido capríco e caprílico (TGCC), estas formulações teriam uma potencial atividade antioxidante. O óleo foi previamente saturado com quercetina, desta forma o doseamento realizado na região do ultravioleta (371 nm) correspondeu à concentração de quercetina nas amostras.

A concentração de quercetina quantificada na formulação NC TGCC A foi de 37,89 µg/mL. Como este valor foi considerado baixo e desta forma insatisfatório para uma possível futura aplicação terapêutica, uma formulação com uma quantidade maior de quercetina foi preparada de acordo com a Tabela 5.

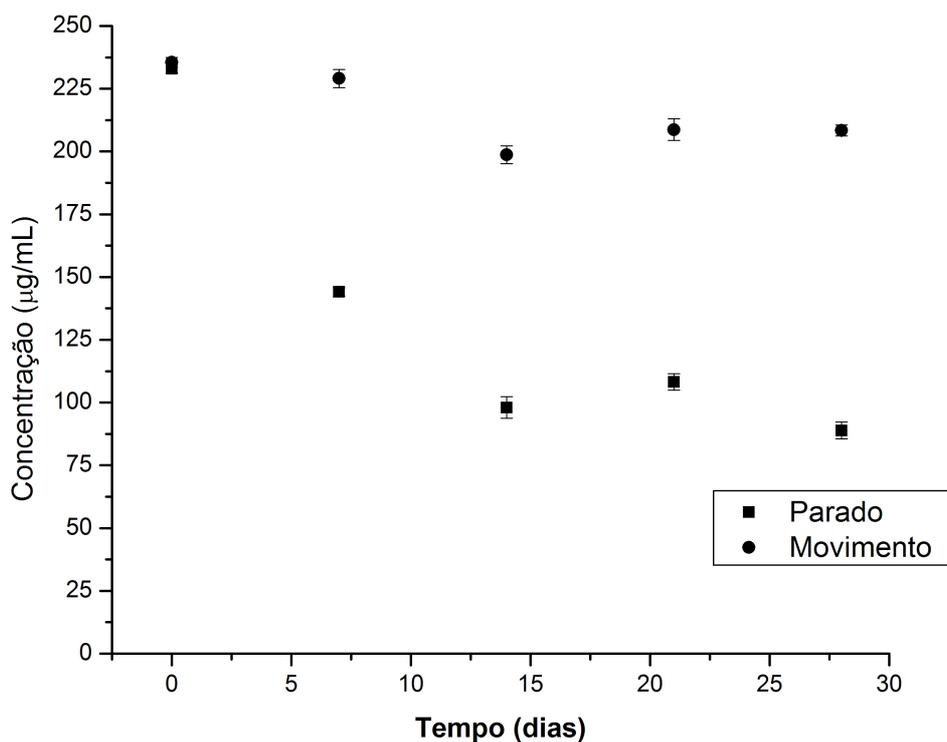
Nestas condições, a concentração obtida foi de 36,46 µg/mL para NC TGCC C. A baixa concentração de quercetina encapsulada nas formulações de NC poliméricas pode ser em função da presença de cristais nas amostras, conforme verificado pelo ensaio de microscopia ótica. Considerando esta possibilidade, uma alternativa proposta para contornar a presença de cristais nas formulações, foi a preparação de uma nova formulação elaborada a partir da técnica de homogeneização de alta pressão. A primeira formulação proposta, visando obter uma concentração de quercetina adequada para fins terapêuticos, apresentou a composição quali/quantitativa apresentada na Tabela 4.

As concentrações de quercetina foram determinadas para avaliar a presença de cristais na amostra de acordo com metodologia empregada por Pohlmann e colaboradores 2008. Este processo ocorreu através da agitação vigorosa de um dos frascos antes das diluições para a medida do teor, enquanto o outro frasco contendo a mesma formulação permaneceu imóvel durante todo o período de análise. As concentrações de quercetina na amostra NE A são listadas na Tabela 9.

**Tabela 9.** Doseamento de quercetina para NE A

Tempo (dias)	NE A Movimento ( $\mu\text{g/mL}$ )	NE A Parado ( $\mu\text{g/mL}$ )
0	$235,49 \pm 1,93$	$232,98 \pm 1,71$
7	$229,06 \pm 1,67$	$144,08 \pm 3,67$
15	$198,64 \pm 4,33$	$98,03 \pm 3,53$
21	$208,69 \pm 3,25$	$108,19 \pm 4,30$
30	$208,39 \pm 2,20$	$89,80 \pm 3,29$

A Figura 13 representa a variação na concentração de quercetina na formulação NE A.



**Figura 13.** Variação na concentração de quercetina nas NE A mantidas paradas e em movimento

Os valores de concentração de quercetina mantiveram-se relativamente constantes durante 30 dias para o frasco que foi agitado vigorosamente momentos antes da coleta para a quantificação da quercetina. Comparado com os valores de concentração encontrados para o frasco que foi mantido parado durante o período de

análise evidenciou-se que a formulação apresentou cristais, que com o decorrer do tempo sedimentaram no fundo do frasco. Ao realizar vigorosa agitação estes eram resuspendidos na formulação, que apresentava valores próximos ao tempo inicial.

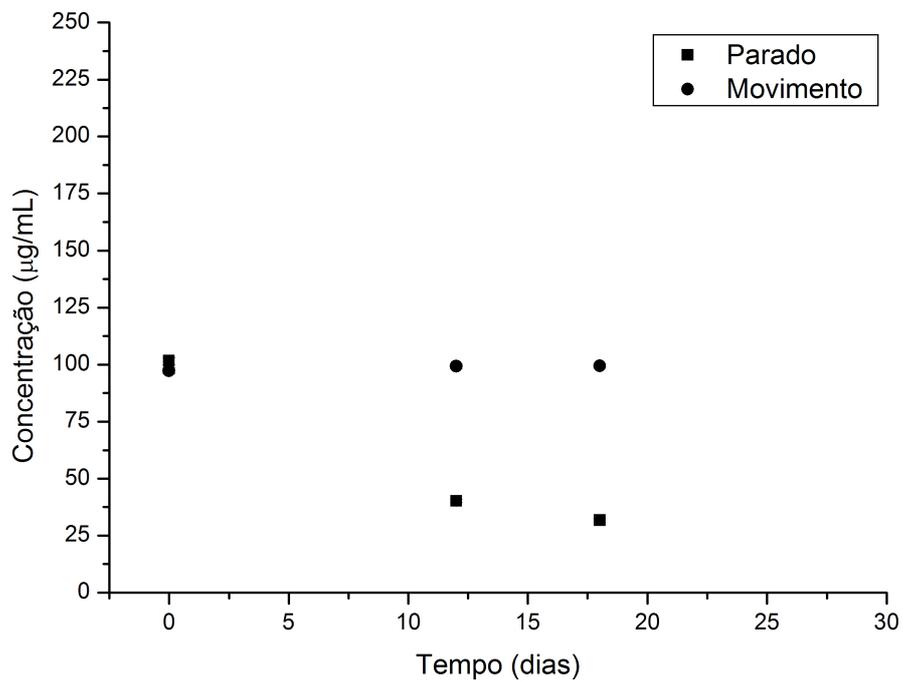
Em função da presença de cristais uma nova formulação com uma quantidade de quercetina reduzida pela metade foi proposta, obtendo-se desta forma a formulação NE B cuja composição é descrita na Tabela 8.

Os valores obtidos para o doseamento da formulação NE B são representados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Doseamento de quercetina para NE B

Tempo (dias)	NE B Movimento ( $\mu\text{g/mL}$ )	NE B Parado ( $\mu\text{g/mL}$ )
0	$97,24 \pm 1,17$	$101,67 \pm 1,49$
7	$99,26 \pm 0,92$	$40,23 \pm 0,70$
15	$94,42 \pm 0,92$	$31,80 \pm 0,86$

O estudo foi conduzido por um período menor já que a presença de cristais foi evidenciada após 15 dias do preparo das formulações. A Figura 14 representa o comportamento da quercetina na formulação NE B.



**Figura 14.** Variação na concentração de quercetina nas NE B mantidas paradas e em movimento

Novamente a presença de cristais de quercetina nas formulações nanoestruturadas foi evidenciada. Independentemente da concentração de quercetina presente nas amostras e do método de preparação empregados a presença de cristais nas formulações não foi solucionada.

## **6. CONCLUSÕES**

---



- Suspensões de nanocápsulas contendo quercetina e metoxicinamato de octila, utilizando Epikuron 170<sup>®</sup> ou Span 60<sup>®</sup> e polissorbato 80 como tensoativos, foram preparadas pelo método da deposição interfacial e demonstraram consistir em sistemas adequados em relação ao tamanho de partícula, potencial zeta e pH.
- A hipótese da fotoproteção estar relacionada à densidade de partículas em suspensão não foi confirmada, uma vez que as nanocápsulas preparadas com Span 60<sup>®</sup> e polissorbato 80 não renderam um maior número de partículas por volume.
- A eficiência de espalhamento de luz foi maior nas formulações contendo o sistema tensoativo Span 60<sup>®</sup> e polissorbato 80, conforme evidenciado através dos estudos de espalhamento de luz estático (razão de Rayleigh) e espalhamento de luz múltiplo (retroespalhamento e caminho percorrido pelo fóton).
- Os estudos de termogravimetria evidenciaram que a presença da quercetina aumentou a estabilidade térmica de todas as formulações.
- Através da calorimetria exploratória diferencial, verificou-se que a quercetina não interage com a porção cristalina do polímero, enquanto o metoxicinamato de octila reduziu a cristalinidade do polímero.
- Os melhores resultados verificados para a formulação NCII-QUE, ocorreram pelo sinergismo da proteção química fornecida pela quercetina e pela maior eficiência de espalhamento conferida pela composição dos tensoativos.

- Independentemente do sistema tensoativo empregado, as formulações apresentaram cristais de quercetina.
- A quantidade de quercetina encapsulada nas nanocápsulas poliméricas foi baixa.
- Formulações com diferentes concentrações de quercetina preparadas a partir da técnica de homogeneização a alta pressão também não apresentaram adequado teor de quercetina encapsulado. Da mesma forma os cristais de quercetina continuaram presentes em ambas as formulações preparadas por meio desta técnica.
- O sistema composto por nanocápsulas, quercetina e metoxicinamato de octila é interessante, pois mesmo com a presença de cristais, promoveu maior estabilização química do filtro solar químico e do antioxidante.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---



- Al Khouri, N.; Roblot-Treupel, L.; Fessi, H.; Devissaguet, J. P.; Puisieux, F. Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 28, p. 125-135, 1986.
- Alonso, M. J.; Losa, C.; Calvo, P.; Vila-Jato, J. L. Approaches to improve the association of amikacin sulphate to poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 68, p. 69-76, 1991.
- Alvarez-Román, R.; Barré, G.; Guy, R. H.; Fessi, H. 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.; Naik, A.; Kalia, Y. N.; Guy, R. H.; Fessi, H. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, v. 21, p. 1818-1825, 2004.
- American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures*. Atlanta: American Cancer Society, 2007.
- Alves, M.P.; Scarrone, A.L.; Santos, M.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*, v.341, p. 215 - 220, 2007.
- Bajgai, M. P.; Aryal, S.; Lee, D. R.; Park, S-J.; Kim, H. Y. Physicochemical characterization of self-assembled poly( $\epsilon$ -caprolactone) grafted dextran nanoparticles. *Colloidal Polymer Science*, v. 286, p. 517-524, 2008.
- Barbanti, S. H.; Zavaglia, C. A. C.; Duek, E. A. R. Degradação acelerada de suportes de poli( $\epsilon$ -caprolactona) e poli(D,L-Ácido Láctico-co-Ácido Glicólico) em meio alcalino. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 16, p. 141-148, 2006.

Bertini, F.; Canetti, M.; Ricci, G. Thermal behavior of syndiotactic E-1,2-poly(3-methyl-1,3-pentadiene). *European Polymer Journal*, v. 45, p. 923-931, 2009.

Bonina, F.; Lanza, M.; Montenegro, L.; Puglisi, C.; Tomaino, A.; Trombetta, D.; Castelli, F.; Saija, A. Flavonoides as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 145, p. 87-94, 1996.

Bootz, A.; Vogel, V.; Schubert, D.; Kreuter, J. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 57, p. 369-375, 2003.

Calvo, P.; Vila-Jato, J. L.; Alonso, M. J. Comparative *in vitro* evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules and nanoemulsions, as ocular drug carriers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.85, p. 530-536, 1996.

Canevarolo Jr., S. V. Técnicas de caracterização de polímeros. São Paulo: Artliber, 2004.

Casagrande, R.; Georgetti, S. R.; Verri Jr., W. A.; Dorta, D. J.; Santos, A. C.; Fonseca, M. J. V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.84, p. 21-27, 2006.

Celia, C.; Trapasso, E.; Cosco, D.; Paolino, D., Fresta, M. Turbiscan Lab® Expert analysis of the stability of ethosomes® and ultradeformable liposomes containing fluidizing agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* v. 72, p. 155-160, 2009.

Cevc, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 675-711, 2004.

Chasteigner, S.; Fessi, H.; Cavé, G.; Devissaguet, J-Ph.; Pusieux, F. Gastrointestinal tolerance study of a freeze-dried oral dosage form of indomethacin-loaded nanocapsules. *STP Pharma Sciences*, v.5, p. 242-246, 1995.

Clas, S. D.; Dalton, C. D.; Hancock, B. C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *Pharmaceutical Science and Technology*, v. 2, p. 311-319, 1999.

Cowley, J. M.; Merkulov, V. I.; Lannin, J. S. Imaging of light-atom nanocrystals with a thin annular detector in STEM. *Ultramicroscopy*, v. 65, p. 61-70, 1996.

Couvreur, P.; Roland, M.; Speiser, P. Biodegradable submicromic particles containing a biologically active and composition containing them. *U.S. Patent*, 4329332, 1982.

Couvreur, P.; Barrat, G.; Fattal, E.; Legrand, P., Vauthier, C. Nanocapsule technology: a review. *Critical Reviews in Therapeutic Carrier Systems*, v. 19, p. 99-134, 2002.

Cruz, L.; Soares, L.U.; Costa, T.D.; Mezzalira, G.; Silveira, N.P. da; Guterres S.S.; Pohlmann, A.R. Diffusion and Mathematical Modeling of Release Profiles from Nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics*, v.313, p.198 - 205, 2006.

De Campos, A. M.; Sánchez, A.; Gref. R.; Calvo, P.; Alonso, M. J. The effect of a PEG versus a chitosan coating on the interaction of drug colloidal carries with the ocular mucosa. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.20, p. 73-81, 2003.

Diaz, J.; Serrano, E.; Acosta, F.; Carbonell, L.F. Reference intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma. *Clinical and Chemistry*, v.44, n.10, p. 2215-2217 1998.

Dihang, H., Bru, P., Meunier, G., Pouligny, B., Snabre, P, Effect on centrifugation on sample homogeneity. *Application paper*, p. 1-5, 2005

Eide, M.J.; Weinstock, M.A. Public Health Challenges in Sun Protection. *Dermatologic Clinics*, v. 24, p. 119 – 124, 2006.

Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J-P.H.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition flowing solvent displacement. *International Journal of Pharmacy*, v. 55, R1-R4, 1989.

Fifield, F. W.; Kealey, D. Principles and practice of analytical chemistry. 3<sup>rd</sup> ed. Cornwall: Stanley Thornes, 1995.

Ford, J. L.; Timmins, P. Pharmaceutical Thermal Analysis. Chichester: Ellis Horwood, 1989.

Fórmica, J. V.; Regelson, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chemical and Toxicology*, v. 33, p. 1061-1080, 1995.

Formulation© Multiple Light Scattering Theory. TurbiscanLab – User Guide, 2004.

Guinebretiére, S.; Brianon, S.; Fessi, H.; Teodorescu, V. S.; Blanchin, M. G. Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy. *Materials Science and Engineering C*, v. 21, p. 137-142, 2002.

Guterres, S. S.; Fessi, H.; Barrat, G.; Devissaguet, J-Ph.; Pusieux, F. Poly (D,L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. *International Journal of Pharmaceutics*, v.113, p. 57-63, 1995.

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

Halliwell, B; Gutteridge, J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysical*, v. 246, n. 2, p. 501-514, 1986.

Halliwell, B. e Gutteridge, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Oxford University, 2000.

Harbone, J.F.; Willians, C.A. Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, p. 481-504, 2000.

Ibrahim, S.F.; Brown, M.D. Tanning and cutaneous malignancy. *Dermatologic Surgery*, v. 34, p. 460-474, 2008.

Inal, M. E.; Kaharaman, A. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Toxicology*, v. 154, p. 21-29, 2000.

Irache, J. M.; Durrer, C.; Ponchel, G.; Duchêne, D. Determination of particle concentration in latexes by turbidimetry. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 90, R9-R12, 1993.

Jäger, A.; Stefani, V.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. . Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 338, p. 297-305, 2007.

Jäger, E.; Venturini, C. G.; Poletto F.; Colomé L. M.; Pohlmann, J. P. U.; Bernardi A.; Battastini A.M.; Guterres S. S.; Pohlmann A. R. Sustained release from lipid-core

nanocapsules by varying the core viscosity and the particle surface area. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 5, p. 130-140, 2009

Jiménez, M. M.; Pelletier, J.; Bobin, M. F.; Martini, M. C. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 272, p. 45-55, 2004A.

Jiménez, M. M.; Pelletier, J.; Bobin, M. F.; Martini, M. C.; Fessi, H. Poly-epsilon-caprolactona nanocapsules containing octyl metoxycinnamate: Preparation and characterization. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 9, p. 329-339, 2004B.

Layre, A.; Gref, R.; Richard, J.; Requier, D.; Chacun, H.; Appel, M.; Domb, A. J.; Couvreur, P. Nanoencapsulation of a crystalline drug. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 298, p. 323-327, 2005.

Lee, J.; Ha, J. U.; Choe, S.; Lee, C-S.; Shim, S. E. Synthesis of highly monodisperse polystyrene microspheres via dispersion polymerization using an amphoteric initiator. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.298, p. 663-671, 2006.

Leroux, J. C.; Alléman, E.; Doelker, E.; Gurny, R. New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-difusion method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 41, p. 14-18, 1995.

Lucas, E. F.; Soares, B. G.; Monteiro, E. E. Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica. E-papers: Rio de Janeiro, 2001.

Mallin, M.; Hiljanen-Vainio, M.; Karjalainen, T.; Sepala, J. Biodegradabele lactone copolymer. II. Hydrolytic study of  $\epsilon$ -caprolactone and lactide copolymers. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 59, p. 1289-1298, 1996.

- Magenheim, B.; Benita, S. Nanoparticles characterization: a comprehensive physicochemical approach. *STP Pharma Sciences*, v. 1, 221-241, 1999.
- Mengual, O.; Meunier, G.; Cayre, I.; Puech, K.; Snarbe, P. Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: the TURBISCAN MA 1000. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 152, p.111–123, 1999.
- Mengual, O.; Meunier, G.; Cayre, I.; Puech, K.; Snarbe, P. TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*, vol. 50, p. 445-456, 1999B.
- Mersmann, A.; Heyer, C.; Eble, A. Activated Nucleation. in: A. Mersmann (Ed.), *Cristallization technology handbook*, Marcel Dekker, 2<sup>nd</sup> edition, New York, 2001, p. 13-47.
- Modesti, M.; Lorenzetti, A.; Bon, D.; Besco, S. Thermal behaviour of compatibilised polypropylene nanocomposite: effect of processing conditions. *Polymer Degradation and Stability*, v. 91, p. 672-680, 2006.
- Mosqueira, V. C. F.; Legrand, P.; Pinto-Alphandary, H.; Puisieux, F.; Barrat, G. Poly(D,L-Lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 89, p. 614-626, 2000.
- Mosqueira, V. C. F.; Legrand, P.; Gulik, A.; Bourdon, O.; Gref, R.; Labarre, D.; Barrat, G. Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials*, vol. 22, p. 2697-2979, 2001.
- Müller, C. R. Desenvolvimento tecnológico e avaliação biológica de nebulizados de nanocápsulas e nanoesferas contendo diclofenaco. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 1999. Dissertação (Mestrado em Farmácia).

- Müller, C. R.; Schaffazick, S. R.; Pohlmann, A. R.; Freitas, L. L.; Silveira, N. P. da; Costa, T. D.; Guterres, S. S. Spray-dried diclofenac poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres: Preparation and physicochemical characterization. *Die Pharmazie*, v. 56, p. 864-867, 2001
- Müller-Goyman. C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals*, v. 58, p. 343-346, 2004.
- Musumeci, T.; Ventura, C. A.; Giannone, I.; Ruozi, B.; Montenegro, L.; Pignatello, R.; Puglisi, G. PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel. *Pharmaceutical Nanotechnology*, v. 325, p. 172-179, 2006.
- Nuñez, E.; García, P.; Gedde, U. W. Crystallisation behaviour and crystal rearrangement of poly(ethylene oxybenzoate). *Materials Science and Engineering A*, v. 413-414, p. 435-441, 2005.
- Oda, S.; Sawada, T.; Moriguchi, T.; Kamada, H. Analysis of turbid solutions by laser-induced photoacoustic spectroscopy. *Analytical Chemistry*, v. 52, p. 650-653, 1980.
- Ottewill, R. H. Light and neutron studies of colloidal dispersions. In: Borsali R. and Pecora R. (eds.) Structure and dynamics of polymer and colloidal systems. Kluwer Academica Publishers: Netherlands, 2002.
- Paese K.; Jäger, A.; Poletto, F.; Pinto, E.F.; Rossi-Bergmann, B.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. Semisolid formulation containing a nanoencapsulated sunscreen: effectiveness, in vitro photostability and immune response. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 5, p. 240-246, 2009.
- Palm, M. D.; O'Donoghue, M. N. Uptade on photoprotection. *Dermatologic Therapy*, v. 20, p.360-376, 2007.

Pattanaargson, S.; Limphong, P. Stability of octyl methoxycinnamate and identification of its photo-degradation product. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 23, p. 153-160, 2001.

Pecora, R.; Berne, B. J. *Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics*. New York: Dover Publications, Inc. 2000.

Pohlmann, A. R.; Mezzalira, G.; Venturini, C. G.; Cruz, L.; Bernardi A.; Jäger, E.; Battastini A. M.; Silveira, N. P. da; Guterres, S. S. Determining the simultaneous presence of drug nanocrystals in drug-loaded polymeric nanocapsule aqueous suspensions: A relation between light scattering and drug content. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 359, p. 288-293, 2008.

Poletto, F.S.; Jäger, E.; Ré, M.I.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A.R. . Rate-modulating PHBV/PCL microparticles containing weak acid model drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 345, p. 70-80, 2007.

Poletto, F. Estudo físico-químico de micropartículas compostas por P(HB-HV) e por bandas de P(HB-HV) e PCL contendo fármacos-modelo lipofílicos ionizáveis. Porto Alegre: UFRGS, 2006. Dissertação (Mestrado em Farmácia).

Poletto, F. S.; Jäger, E.; Cruz, L.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. *Materials Science and Engineering C*, v. 28, p. 472-478, 2008.

Poletto, F. S.; Silveira, R. P., Fiel, L. A.; Donida, B.; Rizzi, M.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R. Size-control of Poly(epsilon-caprolactone) Nanospheres by the Interface Effect of Ethanol on the Primary Emulsion Droplets. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 9, p. 1-9, 2009.

- Quintanar-Guerrero, D.; Fessi, H.; Allémann, E.; Doelker, E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 143, p. 133-141, 1996.
- Saija, A.; Tomaino, A.; Trombetta, D.; Giacchi, M.; De Pasquale, A.; Bonina, F. Influence of different penetration enhancers on in vitro skin permeation and in vivo photoprotective effect of flavonoids. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 175, p. 85-94, 1998.
- Santos, A. F.; Polese, L.; Crespi, M. S.; Ribeiro, C. A. Kinetic model of poly(3-hydroxybutyrate) thermal degradation from experimental non-isothermal data. *Journal of Analysis and Calorimetry*, v. 96, p. 287-291, 2009.
- Schaffazick, S. R. Caracterização físico-química e avaliação biológica de liofilizados de nanopartículas poliméricas contendo diclofenaco. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2001. Dissertação (Mestrado em Farmácia).
- Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. L.; Pohlmann, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Química Nova*, v. 26, p. 726-737, 2003.
- Schauder, S.; Ippen, H. Contact and photocontact sensitivity to sunscreens *Contact Dermatitis*, v. 37, p. 221-232, 1997.
- Silveira, N. P.; Samios, D.; Strehle, F.; Dorfmueller, T. Determination of the optical anisotropy of atactic polystyrene using a grating monochromator. *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 197, p. 1945-1957, 1996.
- Sinko, P. J. (ed.) Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences: physical chemical and biopharmaceutical principles in the pharmaceutical sciences. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams, 2006.

Slater, T. F. Free radical mechanism in tissue injury. *Biochemistry Journal*, v. 222, p. 1-15, 1984.

Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, v.70, p. 1-20, 2001.

Souto, E. B.; Wissing, S. A.; Barbosa, C. M.; Müller, R. H. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, p. 83-90, 2004.

Tarras-Wahlberg, N.; Stenhagen, G.; Larkö, O.; Rosén, A.; Wennberg, A.M.; Wennerström, O. Changes in Ultraviolet Absorption of Sunscreens After Ultraviolet Irradiation *Journal of Investigative Dermatology*, v. 113, p. 547-553, 1999.

Teixeira, M.; Alonso, M. J.; Pinto, M. M. M.; Barbosa, C. M. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 59, p. 491-500, 2005.

THE UNITED States Pharmacopeia. 32<sup>nd</sup>.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2009.

Vogelsanger, N.; Formolo, M. C.; Pezzin, A. P. T.; Schneider, A. L. S. S.; Furlan, S. A.; Bernardo, H. P.; Pezzin, S. H.; Pires, A. T. N.; Duek, E. A. R. Blendas biodegradáveis de poli(3-hidroxibutirato)/poli(ε-caprolactona): obtenção e estudo da miscibilidade. *Materials Research*, v. 6, p. 359-365, 2003.

Weiss-Angeli, V.; Poletto, F.; Zancan, L.; R, Baldasso, F.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S. Nanocapsules of octyl methoxycinnamate containing quercetin delayed the photodegradation of both components under ultraviolet A radiation. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v.4, p.80 - 89, 2008.

Winefordner, J. D. (ed.). *Treatise on Analytical Chemistry. Part I, Volume 13. Second edition: Thermal Methods.* Jhon Wiley & Sons, Inc. 1993.

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

Wu, T.; Yen, F.; Lin, L.; Tsaid, T.; Lin, C.; Cham, T. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 346, p. 160-168, 2008.

Yang, S-L.; Wu, Z-H.; Yang, W.; Yang, M-B. Thermal and mechanical properties of chemical crosslinked polylactide (PLA). *Polymer Testing*, v. 27, p. 957-963, 2008.

Yuan, X.; Mak, A. F. T.; Yao, K. Surface degradation of poly(L-lactid acid) fibres in a concentrated alkaline solution. *Polymer Degradation and Stability*, v. 79, p. 45-52, 2003.

Zattoni, A.; Piccolomini, E. L.; Torsi, G.; Reschiglian, P. Turbidimetric detection method in flow-assisted separation of dispersed samples. *Analytical Chemistry*, v.75, n. 23, p. 6469-6477, 2003.

Zattoni, A.; Melucci, D.; Reschiglian, P.; Sanz, R.; Puignou, L.; Galceran, M.T.; Characterization of winemaking yeast by cell number–size distribution analysis through flow field-flow fractionation with multi-wavelength turbidimetric detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1054, p. 293–301, 2004.

Zollars, R. L.; Turbidimetric method for on-line determination of latex particle number and particle size distribution. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 74, p.163-172, 1980.