

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

Espalhamento múltiplo de luz em temperatura variável: um método inovador para
determinação dos parâmetros termodinâmicos de dispersões coloidais

LUANA ALMEIDA FIEL

PORTO ALEGRE, 2010.

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

Espalhamento múltiplo de luz em temperatura variável: um método inovador para
determinação dos parâmetros termodinâmicos de dispersões coloidais

Dissertação apresentada por **Luana Almeida Fiel**
para obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Porto Alegre, 2010.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado - Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos - da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 19.03.2010, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Paulo Augusto Netz
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

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

F452e Fiel, Luana Almeida
Espalhamento múltiplo de luz em temperatura variável: um método inovador para determinação dos parâmetros termodinâmicos de dispersões coloidais / Luana Almeida Fiel. – Porto Alegre : UFRGS, 2010. – xxii, 133 p. : il.

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

1. Estabilidade. 2. Termodinâmica. 3. Nanocápsulas. 4. Deformação.
I. Pohlmann, Adriana Raffin. II. Título.

CDU: 615.4

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

Este trabalho foi realizado nos laboratórios de Micro e Nanopartículas Aplicadas na Terapêutica (Instituto de Química/ UFRGS), de Sistemas Nanoestruturados para a Administração de Fármacos (Faculdade de Farmácia/ UFRGS) e de Microscopia Avançada (Departamento de Física/UFC). A aluna recebeu bolsa CNPq.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Adriana Pohlmann, por ter me orientado nesses quatro anos em que estou no seu laboratório, primeiramente na iniciação científica e depois no mestrado. Não foi uma simples orientação, mas sim um incentivo constante, confiança depositada e oportunidades cedidas que se refletiram na boa produtividade que conseguimos durante esse trabalho e em projetos paralelos. Também a Prof^a. Dr^a. Sílvia Guterres pela colaboração durante o decorrer desses anos, pela ajuda e por disponibilizar seu laboratório. Agradeço aos colaboradores da Bioquímica, que ajudaram nos estudos de densidade, Prof^a. Dr^a. Ana Maria Battastini e Dr^a. Andressa Bernardi, e aos colaboradores da Universidade Federal do Ceará, que ajudaram nas análises de AFM, Prof. Dr. Jeanlex de Sousa e Doutoranda Luciana Alencar.

Agradeço a todos atuais e antigos colegas do laboratório 405 pela receptividade e ajuda. Também agradeço ao pessoal do K204/K213, Fer, Cati, Samuel, Marli, Edu, Tainá e Bruna pela companhia, pela amizade e pelas discussões produtivas e, principalmente, a Cris, que além de tudo isso, colaborou com o trabalho. Agradeço as alunas de IC, Márcia e Marília, pela enorme ajuda. Agradeço a Rê Contri, minha grande amiga que também virou minha colega. Tal fato tornou meu trabalho muito mais prazeroso. Agradeço também as minhas amigas Lú, Lari e Tanara.

Agradeço ao meu Pai, Édison, por ter me propiciado um estudo de qualidade e me ensinado que o conhecimento adquirido é a única coisa que não podem tirar de nós. É por ele e devido a ele, mesmo depois de sua partida, que alimento a razão da paixão que eu tenho pelo estudo e, por consequência, pela pesquisa. Agradeço a toda minha família, à minha Mãe Leonor, ao meu Irmão Edmilson, e ao meu noivo Cristian pelo incentivo constante, pelo festejo por cada conquista minha, pelo carinho e porto de repouso que me forneciam quando eu chegava em casa após um dia exaustivo de trabalho.

RESUMO

O espalhamento múltiplo de luz em temperatura variada (EML-TV) foi proposto como um método inovador para determinar as variáveis termodinâmicas de dispersões coloidais. Um processo de floculação de partículas de sistemas submicrométricos, como nanocápsulas foi estudado. Paralelamente, como objetivo complementar verificou-se a capacidade de deformação de nanocápsulas (NC) comparadas com nanocápsulas de núcleo lipídico (NCL). As suspensões foram preparadas de acordo com a presença (combinada ou não) ou ausência dos tensoativos: fosfatidilcolina (F) e monoestearato de sorbitano (MS). Para fins comparativos, nanoemulsões foram preparadas para evidenciar o efeito do polímero na estabilidade do sistema. As formulações foram denominadas NCL_F , NCL_0 , NC_F e NC_0 e NEL_F , NEL_0 , NE_F e NE_0 , apresentando distribuições de tamanho estreita e nanométrica. O método EML-TV baseou-se no acompanhamento do retroespalhamento de luz, backscattering (BS), durante um gradiente de temperatura (T) de 23 °C a 56 °C (0,6 °C/min). Os sinais de BS na T inicial, BS_i , e nas T subsequentes, BS_n , foram utilizados para a obtenção das constantes de equilíbrio $K=(BS_n/BS_i)$ do processo. Os valores de ΔH_{floc}° (J mol⁻¹) e ΔS_{floc}° (J mol⁻¹ K⁻¹) foram calculados através da relação de van't Hoff. Um desenho fatorial 2³ para os valores de ΔH_{floc}° mostrou que a presença de fosfatidilcolina leva à desestabilização do sistema, enquanto o polímero conduz a sua estabilização. A classificação de estabilidade obtida pelo ordenamento dos valores de ΔH_{floc}° foi a mesma que a obtida em análise de estabilidade física a longo prazo. Em conclusão, através dos valores ΔH_{floc}° , o novo método pode ser utilizado para comparar rapidamente a estabilidade física relativa entre sistemas coloidais. Para os estudos de deformação das partículas foram escolhidas as formulações NCL_0 e NC_0 . Os resultados das medidas de força, realizadas por microscopia de força atômica, indicaram que a presença de MS no núcleo das partículas aumenta a rigidez do sistema.

Palavras-chaves: estabilidade, termodinâmica, nanocápsulas, deformação.

Variable temperature multiple light scattering: an innovative method to determining
the thermodynamic parameters of colloidal dispersions

ABSTRACT

The multiple light scattering at varied temperature (EML-TV) was proposed as a novel method to determine the thermodynamic variables of colloidal dispersions. A flocculation process of submicron particle systems, such as nanocapsules, was studied. In addition, it was intended to verify the capacity of deformation of nanocapsules (NC) compared with lipid-core nanocapsules (LNC). The suspensions were prepared in accordance with the presence (combined or not) or absence of the surfactants: phosphatidylcholine (PC) and sorbitan monostearate (SM). For comparative purposes, nanoemulsions were prepared to identify the polymer effect on the system stability. The formulations were called LNC_{PC}, LNC₀, NC_{PC} and NC₀ and LNE_{PC}, LNE₀, NE_{PC} and NE₀, with narrow size distributions and nanoscale. The method EML-TV was based on monitoring the backscattering (*BS*) during a temperature gradient (*T*) of 23 °C to 56 °C (0.6 °C / min). The signs of *BS* in the initial *T*, *BS_i*, and in the subsequent *T*, *BS_n*, were used to obtain the equilibrium constants $K = (BS_n / BS_i)$ of the process. The values of ΔH°_{floc} (J mol⁻¹) and ΔS°_{floc} (J mol⁻¹ K⁻¹) were calculated by the van't Hoff ratio. A 2³ factorial design for the values of ΔH°_{floc} showed that the presence of phosphatidylcholine leads to destabilization of the system, while the polymer leading to its stabilization. The stability range obtained by ordering the values of ΔH°_{floc} was the same as that obtained in the analysis of long-term physical stability. In conclusion, through the values ΔH°_{floc} , the new method can be used to quickly compare the relative physical stability of colloidal systems. For the studies of particle deformation, the formulations LNC₀ and NC₀ were chosen. The results of force measurements, carried out by atomic force microscopy, indicated that the presence of SM in the core of the particles increases the rigidity of the system.

Keywords: stability, thermodynamic, nanocapsules, deformation.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Ilustração dos mecanismos de estabilização estérea e eletrostática..... | 16 |
| Figura 2. Variação da energia potencial em função da distância entre as partículas..... | 17 |
| Figura 3. Ilustração dos fenômenos de instabilidade física..... | 20 |
| Figura 4. Imagem de uma curva de força..... | 48 |
| Figura 5. Distribuição de tamanho (volume %) (difração de laser) para as formulações de NCL, NC, NEL e NE..... | 53 |
| Figura 6. Distribuição de diâmetro (espectroscopia de correlação de fótons) em intensidade (%), número (%) e volume (%) para as formulações de NCL e NC..... | 58 |
| Figura 7. Distribuição de diâmetro (espectroscopia de correlação de fótons) em intensidade (%), número (%) e volume (%) para as formulações de NEL e NE..... | 59 |
| Figura 8. Curvas de DSC..... | 66 |
| Figura 9. Perfis de ΔBS para as formulações de NCL, NC, NEL e NE..... | 68 |
| Figura 10. Gráfico da modificação dos valores de diâmetro médio aparente de partícula com o aumento de T | 71 |
| Figura 11. Esquema do processo de redução de número de partículas/gotas pelo aumento de T | 72 |
| Figura 12. Diagramas de van't Hoff para as formulações de NCL, NC, NEL e NE..... | 74 |
| Figura 13. Diagrama de van't Hoff obtidos com o aumento e redução de T | 77 |
| Figura 14. Gráficos de ΔG_{floc} em função de T | 78 |
| Figura 15. Histograma dos valores de ΔH_{floc}° para as formulações de NCL, NC, NEL e NE..... | 79 |
| Figura 16. Gráfico de Pareto do delineamento fatorial 2^3 dos dados obtidos pelo método EML-TV..... | 82 |
| Figura 17. Gráfico dos resíduos dos resultados do delineamento fatorial 2^3 | 84 |
| Figura 18. Ilustração das bandas de densidade para nanoesferas, nanodispersão, lipossomas e dos marcadores..... | 89 |

| | |
|---|-----|
| Figura 19. Ilustração das bandas de densidade, formadas <i>in situ</i> durante centrifugação isopínica, para formulações de NCL, NC, NEL e NE..... | 89 |
| Figura 20. Gráficos mostrando a variação nos valores de tamanho médio em função do tempo (90 dias)..... | 91 |
| Figura 21. Gráficos da variação do perfil de distribuição de tamanho (volume %) antes e após 5 meses de armazenamento das formulações de NCL, NC, NEL e NE..... | 93 |
| Figura 22. Fotografia das formulações de nanocápsulas após 5 meses de preparo. | 94 |
| Figura 23. Perfis de <i>BS</i> (%) <i>versus</i> tempo (90 dias) obtidos para as formulações de NCL, NC, NEL e NE..... | 96 |
| Figura 24. Gráficos mostrando a variação dos valores de pH e % de MCO em função do tempo..... | 98 |
| Figura 25. Fluxograma com os resultados de estabilidade física obtidos por difração de laser, observação macroscópica e espalhamento múltiplo de luz em análises a longo prazo..... | 99 |
| Figura 26. Fluxograma com a comparação de ordem de classificação de estabilidade física das formulações obtidos pelo método EML-TV e pela análise de estabilidade a longo prazo..... | 100 |
| Figura 27. Ilustração do perfil de rigidez esperado para as formulações NCL ₀ e NC ₀ durante análise por AFM..... | 103 |
| Figura 28. Imagens de topografia e de fase obtidas por AFM no modo <i>tapping</i> para a formulação NC ₀ em diferentes diluições mostrando a presença de polissorbato 80 entre e ao redor das partículas..... | 104 |
| Figura 29. Imagens de topografia obtidas por AFM no modo <i>tapping</i> para as formulações NCL ₀ e NC ₀ | 105 |
| Figura 30. Imagem fornecida pelo tratamento matemático dos dados de força obtidos pela análise de <i>Force Volume</i> mostrando o grau de rigidez das formulações de NCL ₀ e NC ₀ | 106 |
| Figura 31. Gráfico de contorno obtido no delineamento fatorial 2 ³ | 131 |
| Figura 32. Gráfico de contorno (fatorial 2 ²) para nanocápsulas..... | 131 |

| | |
|--|-----|
| Figura 33. Gráfico de contorno obtido no delineamento fatorial 2^2 para nanoemulsões..... | 131 |
|--|-----|

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Descrição quali-quantitativa das formulações de NCL, NC, NEL e NE... | 37 |
| Tabela 2. Delineamento fatorial..... | 44 |
| Tabela 3. Descrição quali-quantitativa das formulações de nanoesferas, nanodispersão e lipossomas, preparadas para comparação nos estudos de densidade..... | 45 |
| Tabela 4. Valores de tamanho médio e SPAN para as formulações de NCL, NC, NEL e NE..... | 54 |
| Tabela 5. Valores de diâmetro médio, PDI e potencial zeta para as formulações de NCL, NC, NEL e NE..... | 56 |
| Tabela 6. Valores de tensão superficial e viscosidade das fases orgânicas das formulações de NCL, NC, NEL e NE..... | 61 |
| Tabela 7. Valores de N e área total das formulações de NCL, NC, NEL e NE..... | 63 |
| Tabela 8. Temperaturas de fusão (T_m) e cristalização (T_c) e entalpias de fusão (ΔH_m) e cristalização (ΔH_c) obtidas por análise de DSC..... | 67 |
| Tabela 9. Índices de refração em diferentes T determinados para TCC e fase aquosa..... | 71 |
| Tabela 10. Valores de ΔH_{floc}° e ΔS_{floc}° e faixas de T utilizadas nos diagramas de van't Hoff..... | 76 |
| Tabela 11. Valores dos efeitos dos fatores (parede polimérica, monoestearato de sorbitano e fosfatidilcolina) sobre os valores de ΔH_{floc}° | 83 |
| Tabela 12. Valores experimentais obtidos pelo método EML-TV e valores previstos pelas equações de regressão dos modelos fatoriais..... | 87 |
| Tabela 13. Valores de SPAN verificados durante um período de 90 dias para as formulações de NCL, NC, NEL e NE..... | 92 |
| Tabela 14. Densidades (g cm^{-3}) das formulações..... | 133 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCL: poli(epsilon-caprolactona)

MCO: metoxicinamato de octila

TCC: triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico

MS: monoestearato de sorbitano

F: fosfatidilcolina

BS: backscattering (retroespalhamento de luz)

ΔG_{floc} : variação da energia-livre de floculação.

ΔH°_{floc} : variações da entalpia de floculação em condições padrão

ΔS°_{floc} : variações da entropia de floculação em condições padrão

T: temperatura

K: constante de equilíbrio

R: constante universal dos gases

NCL: nanocápsulas de núcleo lipídico

NCL₀: nanocápsulas de núcleo lipídico sem fosfatidilcolina

NCL_F: nanocápsulas de núcleo lipídico com fosfatidilcolina

NC: nanocápsulas

NC₀: nanocápsulas sem fosfatidilcolina

NC_F: nanocápsulas com fosfatidilcolina

NEL: nanoemulsão lipídica

NEL₀: nanoemulsão lipídica sem fosfatidilcolina

NEL_F: nanoemulsão lipídica com fosfatidilcolina

NE: nanoemulsões

NE₀: nanoemulsão sem fosfatidilcolina

NE_F: nanoemulsão com fosfatidilcolina

SPAN: polidispersão

PDI: índice de polidispersão

N: número de partículas por cm³

EML-TV: espalhamento múltiplo de luz em temperatura variada

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

AFM: microscopia de força atômica

ANOVA: análise de variância

P: valor de significância

α = nível de significância

R²: coeficiente de determinação

r: coeficiente de correlação

DSC: calorimetria exploratória diferencial

T_m: temperatura de fusão

T_c: temperatura de cristalização,

T_g: temperatura de transição vítrea.

ΔH_m : entalpia de fusão

ΔH_c : entalpia de cristalização

EHL: equilíbrio hidrófilo-lipófilo

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 01 |
| 2. | OBJETIVOS..... | 07 |
| 3. | REVISÃO DE LITERATURA..... | 11 |
| 3.1 | Dispersões coloidais..... | 13 |
| 3.2 | Estabilidade Física de dispersões coloidais..... | 15 |
| 3.3 | Métodos de determinação da estabilidade física..... | 19 |
| 3.4 | Metoxicinamato de octila..... | 21 |
| 3.5 | Parâmetros termodinâmicos de sistemas dispersos..... | 23 |
| 3.6 | Diagramas de van't Hoff..... | 25 |
| 3.7 | Deformação de nanocápsulas..... | 26 |
| 4. | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 31 |
| 4.1 | Materiais..... | 33 |
| 4.1.1 | Matérias-primas e materiais..... | 33 |
| 4.1.2 | Aparelhos e equipamentos..... | 34 |
| 4.2 | Métodos..... | 36 |
| 4.2.1 | Preparação das dispersões coloidais..... | 36 |
| 4.2.2 | Distribuição de tamanho, tamanho médio e polidispersão..... | 37 |
| 4.2.3 | Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta..... | 38 |
| 4.2.4 | Medidas de tensão superficial..... | 39 |
| 4.2.5 | Medidas de Viscosidade..... | 39 |
| 4.2.6 | Turbidimetria..... | 39 |
| 4.2.7 | Calorimetria exploratória diferencial..... | 41 |
| 4.2.8 | Análises de Espalhamento Múltiplo de Luz..... | 41 |
| 4.2.8.1 | Perfis de <i>BS</i> | 42 |
| 4.2.8.2 | Método EML-TV..... | 42 |
| 4.2.8.2.1 | Determinação de parâmetros termodinâmicos..... | 42 |
| 4.2.9 | Índice de refração..... | 43 |
| 4.2.10 | Delineamento fatorial..... | 43 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.2.11 | Estudos de densidade..... | 44 |
| 4.2.12 | Estudos de estabilidade física em tempo real e validação do método EML-TV..... | 45 |
| 4.2.13 | Análise de estabilidade química..... | 46 |
| 4.2.13.1 | Método Analítico..... | 46 |
| 4.2.13.2 | Medidas de pH..... | 46 |
| 4.2.13.3 | Estabilidade química..... | 46 |
| 4.2.14 | Capacidade de deformação das partículas..... | 46 |
| 4.2.14.1 | Fundamentação teórica das medidas de AFM..... | 48 |
| 4.2.15 | Análise estatística..... | 50 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 51 |
| 5.1 | Preparação das dispersões coloidais..... | 53 |
| 5.2 | Diâmetro médio, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta..... | 55 |
| 5.3 | Medidas de tensão superficial e de viscosidade..... | 60 |
| 5.4 | Concentração de partículas/gotículas e área total..... | 63 |
| 5.5 | Calorimetria Exploratória Diferencial..... | 64 |
| 5.6 | Análises de espalhamento múltiplo de luz..... | 68 |
| 5.6.1 | Perfis de <i>BS</i> | 68 |
| 5.6.2 | Método EML-TV..... | 69 |
| 5.6.2.1 | Determinação de parâmetros termodinâmicos..... | 72 |
| 5.6.2.1.1 | Determinação de parâmetros termodinâmicos: diagramas de van't Hoff | 72 |
| 5.6.2.1.2 | Determinação de parâmetros termodinâmicos: reversibilidade do processo..... | 76 |
| 5.6.2.1.3 | Determinação de parâmetros termodinâmicos: espontaneidade do processo..... | 77 |
| 5.7 | Experimento de delineamento fatorial..... | 82 |
| 5.8 | Estudos de densidade..... | 87 |
| 5.9 | Validação do método EML-TV..... | 90 |
| 5.9.1 | Difração de laser..... | 91 |
| 5.9.2 | Observação macroscópica..... | 94 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 5.9.3 | Espalhamento múltiplo de luz..... | 95 |
| 5.9.4 | Estudos de estabilidade química..... | 97 |
| 5.9.5 | Classificação das formulações..... | 99 |
| 5.10 | Estudo da deformação das nanocápsulas..... | 101 |
| 5.11 | Relação entre estabilidade física e rigidez das nanocápsulas..... | 107 |
| 6. | CONCLUSÕES..... | 109 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 113 |
| 8. | ANEXOS..... | 127 |

1. INTRODUÇÃO

As nanopartículas têm sido amplamente estudadas como sistemas de transporte devido ao seu potencial de direcionar e controlar a liberação de substâncias (BRIGGER e col., 2002; SCHAFFAZICK e col., 2003). O termo nanopartícula inclui nanoesferas e nanocápsulas (NC), que diferem uma da outra de acordo com sua composição e organização estrutural. NC são compostas por um núcleo oleoso rodeado por uma parede polimérica (JÄGER e col., 2007; POLETTO e col., 2008a) e nanoesferas são sistemas matriciais estabilizados por tensoativos (POHLMANN e col., 2007). Além disso, nanoemulsões (NE) são geralmente utilizadas para veicular fármacos lipofílicos e como dispositivo comparativo com NC, por omitir o polímero durante a preparação das formulações (TEIXEIRA e col., 2002; CRUZ e col., 2006). Entretanto, sistemas poliméricos mostram-se mais vantajosos no que se refere à estabilidade física final da formulação (CALVO e col., 1996; SANTOS-MAGALHÃES e col., 2000) e proteção do princípio ativo contra sua degradação (SCHAFFAZICK e col., 2007).

Dispersões coloidais submicrométricas, cujo tamanho médio pode variar entre 10 e 1000 nm, têm sido propostas como alternativa para aumentar a penetração de substâncias na pele devido à sua forte interação com a superfície cutânea (SHIM e col., 2004; ALVAREZ-ROMÁN e col., 2004a). As características físico-químicas e estruturais desses sistemas estão fortemente relacionadas com a capacidade dos mesmos de interagir com a superfície da pele e transportar substâncias através da barreira cutânea. A passagem intercelular desses carreadores envolve a existência de habilidade de adaptabilidade suficiente para permitir a deformação e penetração de acordo com o tamanho do poro intercelular (CEVC, 2004). As NC apresentam uma fina parede polimérica disposta ao redor de um núcleo lipofílico, o qual pode ter alteração de viscosidade de acordo com a composição. Alguns estudos sugeriram que tais sistemas apresentam certo grau de deformação (MONTASSER e col., 2002; MOSQUEIRA e col., 2005). Recentemente ficou demonstrado que existe uma relação entre a concentração de monoestearato de sorbitano no núcleo de NC e a taxa de liberação de uma substância lipofílica encapsulada devido à permeabilidade relativa dos nanocarreadores (JÄGER e col., 2009). Nesse estudo verificou-se que o fluxo

difusional do éster etílico de indometacina a partir das NC diminuiu significativamente com o aumento da concentração do monoestearato de sorbitano, devido a mudanças na viscosidade do núcleo das NC (JÄGER e col., 2009). Assim, a presença de monoestearato de sorbitano nas NC poderia modificar as propriedades de deformação das mesmas, tornando-as mais rígidas. Isso é interessante, principalmente, para a via de administração cutânea, pois o sistema poderia ser formulado de acordo com o local de ação do princípio ativo (em camadas mais superiores ou profundas da pele).

Tratando-se, assim, de possíveis candidatas a formulações cosméticas, farmacêuticas ou fotoprotetoras, é necessário selecionar sistemas que se mostrem físico-quimicamente estáveis. Entretanto, dispersões coloidais são sistemas inerentemente instáveis devido a sua heterogeneidade. A estabilidade desses sistemas pode ser afetada por fenômenos como a migração (cremagem e sedimentação) e / ou variações do tamanho das partículas (coalescência, floculação). As técnicas geralmente empregadas para investigar a ocorrência de tais fenômenos incluem os testes de envelhecimento (observação macroscópica) e alguns procedimentos analíticos, tais como microscopia, espectroscopia, turbidimetria e análise da mobilidade eletroforética (GREGORY, 2009). No entanto, essas técnicas normalmente requerem diluição da amostra opaca e/ou concentrada, devido ao espalhamento múltiplo de luz característico desse tipo de amostra, reduzindo a precisão das análises. Além disso, algumas dessas têm necessidade de se determinar a estabilidade físico-química da amostra durante grandes períodos. Para superar essas limitações, medidas de propagação de luz através de dispersões concentradas podem fornecer informações sobre a estabilidade físico-química dos sistemas coloidais (MENGUAL e col., 1999b) e mostrar como esses sistemas comportam-se frente a modificações de temperatura (PIZZINO e col., 2007; PIZZINO e col., 2009).

Estar ciente das propriedades termodinâmicas de um sistema pode auxiliar a estimar a sua estabilidade. Entretanto, pouco é abordado sobre o assunto (PACHECO e col., 2007). Alguns estudos utilizaram a termodinâmica clássica, para estudar os fenômenos de interação em sistemas submicrométricos, especialmente no que se refere à estabilidade destes sistemas (ALEXANDRIDIS e col., 1995; JODÁR-REYES e col.,

2001; DALE e col., 2005; DALE e col., 2006). No entanto, a informação sobre mudanças nos valores de entalpia e entropia envolvidas em processos de desestabilização de nanosistemas tem sido relatada unicamente com a utilização de métodos destrutivos, que modificam irreversivelmente o estado inicial da amostra (JODÁR-REYES e col., 2001) ou que necessitam de indução do fenômeno por adição de eletrólitos (DALE e col., 2005; DALE e col., 2006). Além disso, não há informações quantitativas sobre a influência da parede polimérica na estabilidade de NC, ou mesmo de parâmetros termodinâmicos relacionados com sua estabilidade. Dessa forma, o desenvolvimento de um método que possibilite a rápida avaliação da estabilidade física desses sistemas seria de grande vantagem tecnológica (redução de custos e tempo) para o estabelecimento de formulações inovadoras.

Portanto, nosso objetivo foi desenvolver um novo método baseado em espalhamento múltiplo de luz para determinar variáveis termodinâmicas e para fornecer informações sobre a estabilidade relativa dos sistemas coloidais. Para desenvolver esse método utilizou-se como modelo dispersões líquidas de NC poliméricas preparadas com um poliéster e uma mistura de metoxicinamato de octila, um protetor solar químico, e triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico, estabilizadas por polissorbato 80, tensoativo hidrofílico. Para fins de avaliação da sensibilidade do método frente a pequenas alterações na composição da formulação, estas foram preparadas na presença (concomitante ou não) ou ausência dos tensoativos: monoestearato de sorbitano e fosfatidilcolina. Esses tensoativos foram escolhidos devido à diferença de caráter, não-iônico e dipolar, respectivamente, assim como de estruturação, disperso no núcleo ou adsorvido na parede polimérica, respectivamente. Desta forma, as NC contendo monoestearato de sorbitano seriam mais estáveis do que aquelas sem este componente devido à viscosidade no núcleo oleoso que seria diferente para cada sistema. Para validar o método, formulações compostas por NE similares às NC, omitindo-se o polímero na composição também foram estudadas. Em paralelo, considerando que a variação da concentração de monoestearato de sorbitano nas NC modifica o caráter do núcleo de líquido oleoso para uma dispersão lipídica, outro objetivo do presente trabalho foi verificar se a capacidade de deformação seria diferente para cada sistema contendo ou não monoestearato de sorbitano.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver um método inovador usando espalhamento múltiplo de luz para a avaliação da estabilidade física de dispersões coloidais, nanocápsulas e nanoemulsões, assim como determinar se a capacidade de deformação de nanocápsulas poliméricas é modificada pela presença de um lipídio sólido, monoestearato de sorbitano, disperso no núcleo dessas partículas.

Objetivos específicos:

- ❖ Preparar formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico, formado por monoestearato de sorbitano + mistura de triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (TCC) e do filtro solar químico metoxicinamato de octila (MCO), nanocápsulas, nanoemulsões lipídicas e nanoemulsões com diferentes composições quali-quantitativas de tensoativos (monoestearato de sorbitano e/ou fosfatidilcolina);
- ❖ Caracterizar as formulações coloidais quanto a distribuição de tamanho, diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, número de partícula por unidade de volume, área total e teor de MCO;
- ❖ Estudar a tensão superficial e a viscosidade das fases orgânicas para avaliar se existe uma relação entre as soluções iniciais e o diâmetro da dispersão final;
- ❖ Avaliar a estabilidade relativa das formulações em função do tempo;
- ❖ Desenvolver um método baseado no espalhamento múltiplo de luz empregando temperatura variada para determinar parâmetros termodinâmicos dos sistemas dispersos;
- ❖ Investigar as relações dos parâmetros termodinâmicos com a estabilidade física e características (composição e organização estrutural) dos diferentes sistemas;
- ❖ Selecionar duas formulações de nanocápsulas, uma contendo e outra não contendo monoestearato de sorbitano, para avaliação da capacidade de deformação das partículas através de microscopia de força atômica

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Dispersões coloidais

Sistemas coloidais nanoestruturados incluem nanopartículas poliméricas, nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas lipídicas, niossomas entre outros (BARRAT, 2000; SOPPIMATH e col., 2001; SAHOO e LABHASETWAR, 2003; BORGIA e col., 2005; SHAHIWALA e MISRA, 2002).

Nanopartículas poliméricas são sistemas com diâmetro inferior a 1 μm que apresentam potencialidades como carreadores de ativos, na estabilidade em fluidos biológicos e na estabilidade física no que se refere ao armazenamento da formulação final (SCHAFFAZICK e col., 2003). O termo nanopartículas poliméricas inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e a organização estrutural. As nanocápsulas são sistemas vesiculares onde o núcleo oleoso é recoberto por uma parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas são sistemas matriciais e não apresentam óleo em sua composição (SOPPIMATH e col., 2001; SCHAFFAZICK e col., 2003; LOPES e col., 2001; CRUZ e col., 2006a; CRUZ e col., 2006b). As nanoemulsões são sistemas usualmente empregados para aumentar a capacidade de associação de uma substância ativa lipofílica a uma formulação e, em trabalhos de pesquisa sobre nanopartículas poliméricas, são também utilizadas para fins comparativos (CRUZ e col., 2006a; CRUZ e col., 2006b).

Uma ampla variedade de polímeros, desde naturais (por exemplo: quitosana, gelatina) até, e mais comumente, sintéticos [por exemplo: poli(epsilon-caprolactona) (PCL), poli(D,L-lactídeo) (PLA), poli(cianoacrilatos de alquila)], vêm sendo utilizados para a preparação de nanopartículas poliméricas. Para a preparação dessas estruturas encontramos métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (GALLARDO e col., 1993) ou na precipitação de polímero pré-formado (FESSI e col., 1989). Embora o primeiro possa ser interessante para aumentar a quantidade de fármaco encapsulada via formação de ligações covalentes, o segundo é mais empregado devido à simplicidade e reprodutibilidade, sendo aplicável para vários polímeros além de ser de fácil transposição de escala (LEGRAND e col., 1999). O método de precipitação de polímero pré-formado é subdividido em *salting-out*

(ALLÉMANN e col., 1993), emulsificação-difusão (NIWA e col., 1993; QUINTANAR-GUERRERO e col., 1996; QUINTANAR-GUERRERO e col., 1998) e deposição interfacial (FESSI e col., 1989). Neste último, a formação das nanopartículas é baseada no efeito Marangoni, onde, durante a mistura da fase orgânica com a fase aquosa, ocorre a difusão convectiva (turbulenta) do solvente entre as fases desequilibradas de uma região de baixa tensão, fase orgânica, para uma região de alta tensão, fase aquosa. Quanto maior a diferença de tensão entre as fases, mais turbulento é o fluxo. Quando a difusão está completa, o polímero agrega-se ao redor das gotículas de óleo depositando-se na interface (FESSI e col., 1989).

Entre os fatores que influenciam na formação das partículas e, por conseguinte nas características finais do sistema, como por exemplo, diâmetro de partícula, potencial zeta, número de partícula e tipo de partícula formada estão: a tensão superficial das fases utilizadas para preparação dos sistemas (aquosa e oleosa), viscosidade das fases, parâmetros de interação água-solvente, quantidades e tipos de componentes (MOSQUEIRA e col., 2000; GALINDO RODRÍGUEZ e col., 2004). GALINDO-RODRIGUEZ e colaboradores (2004) prepararam nanoesferas de Eudragit L 100-55 estabilizadas por álcool polivinílico através de *salting-out*, emulsificação difusão e nanoprecipitação. As partículas preparadas por *salting-out* tiveram menor tamanho médio do que as preparadas por emulsificação difusão. Os autores atribuíram isso ao fato de que tanto a tensão superficial quanto a viscosidade da fase orgânica foram menores para a formulação preparada por *salting-out*. Ou seja, uma fase interna, com maiores valores de tensão superficial e viscosidade, resistirá mais ao fluxo turbulento e às forças de pressão e, assim, o cisalhamento de partículas vai reduzir. Os autores também investigaram a relação do tamanho médio de partículas preparadas por nanoprecipitação com diferentes solventes na fase orgânica e com diferentes concentrações de polímero. Os resultados demonstraram que quanto menor o parâmetro de interação água-solvente e quanto menor a concentração de polímero (menor viscosidade) menor o tamanho de partícula.

MOSQUEIRA e colaboradores (2000) também investigaram alguns fatores que estão relacionados com as características finais dos sistemas nanoestruturados

formados a partir de deposição interfacial de polímero pré-formado. Para isso os autores prepararam nanocápsulas de PLA com diferentes óleos, como núcleo oleoso, e Epikuron 170[®] (aproximadamente 70 % de fosfatidilcolina), como tensoativo, contendo ou não poloxamer 188[®], um polímero com propriedades tensoativas. Entre os resultados, o volume ótimo de Epikuron 170[®] foi de 0,3 % m/v, a partir do qual acréscimos levaram a um aumento do tamanho de partícula. Os autores verificaram que quanto menor a tensão interfacial da fase oleosa, menor o diâmetro de partícula observado. Uma correlação diretamente proporcional entre a viscosidade e o tamanho de partícula também foi encontrada. Neste mesmo trabalho, utilizando um gradiente de densidade por centrifugação isopínica, os autores verificaram que as suspensões de nanocápsulas são sistemas multicomponentes, onde, dependendo dos constituintes, nanoesferas, lipossomas e nanoemulsão podem estar concomitantemente presentes com as nanocápsulas.

3.2 Estabilidade física de dispersões coloidais

Dispersões coloidais aquosas são sistemas inerentemente instáveis, do ponto de vista físico, devido à sua heterogeneidade. No entanto, se a taxa de desestabilização for consideravelmente pequena comparada ao seu tempo de meia-vida, a dispersão tem uma estabilidade cinética (MENGUAL e col., 1999a). Os fenômenos de desestabilização desses sistemas incluem a migração de partículas (cremagem, sedimentação) e / ou variações de tamanho de partículas (coalescência, floculação). De acordo com a Lei de Stoke-Einstein, a velocidade de migração das partículas está relacionada à gravidade, dimensão da partícula, viscosidade da fase contínua e à diferença de densidade entre as duas fases. Já a velocidade da variação de tamanho de partícula está ligada a energia ou forças de interação entre elas, podendo, estas forças, determinar a estabilidade mesoscópica de diferentes sistemas coloidais (SHAW, 1992). Dependendo da composição, o mecanismo de estabilização dessas estruturas pode ser por repulsão estérea e/ou eletrostática.

A estabilização estérea é consequência da interação física de substâncias não-iônicas de cadeia longa (por exemplo: polímeros, tensoativos) que se encontram

adsorvidas ou retidas ao redor da partícula formando uma espécie de camada. Com a aproximação das partículas, as camadas se interpenetram e as cadeias tendem a se ordenar paralelamente (Figura 1a). Isso faz com que, no equilíbrio termodinâmico, as partículas permaneçam isoladas. Já entre partículas carregadas, ou seja, ionizadas superficialmente, haverá a repulsão eletrostática entre os íons de mesma carga (Figura 1b).

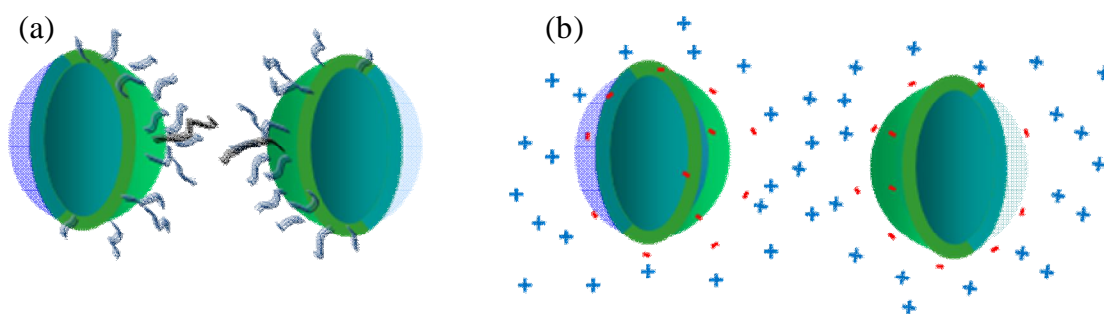


Figura 1. Esquema dos mecanismos de estabilização (a) estérica e (b) eletrostática.

A teoria Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek (DLVO) é extensamente utilizada para explicar estabilidade e a cinética de coagulação das partículas (VANDERHOFF, 1996; NETZ e GONZÁLES ORTEGA, 2002). Através dessa teoria, a energia total de interação entre duas partículas coloidais pode ser calculada a partir da soma das forças de atração de van der Waals e as forças repulsivas da dupla camada elétrica (Figura 2).

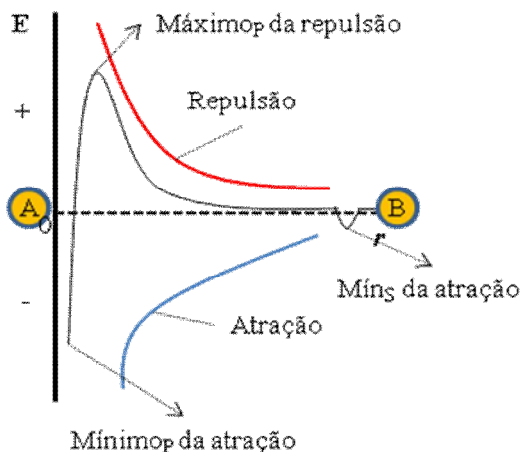


Figura 2. Variação da energia potencial em função da distância do raio (r) das partículas. Retirado de NETZ e GONZÁLES ORTEGA (2002).

A Figura 2 representa a energia potencial resultante em função da distância entre o raio (r) das partículas. À medida que as partículas se aproximam, é atingido um ponto de metaestabilidade, correspondente a um mínimo secundário (M_S). Nesse estado, as partículas se mantêm separadas por um filme líquido a uma distância relativamente grande, ou seja, não há floculação, ou a floculação é reversível. Se vencida uma barreira de energia, as partículas podem atingir um estado termodinamicamente mais estável, correspondente a um mínimo primário (M_P). Nesse ponto, a distância entre as partículas é a menor possível, o que significa na prática o fenômeno da floculação. Para manter a dispersão em estado de relativa estabilidade eletrostática, a barreira de energia deve, portanto, ser suficientemente alta a fim de mantê-la no ponto de mínimo secundário (JODÁR-REYES e col., 2001; VANDERHOFF, 1996; NETZ e GONZÁLES ORTEGA, 2002). Uma combinação dos mecanismos, eletrostático e estérico, pode resultar numa melhor estabilização.

Independente do método utilizado para preparar as nanopartículas, as formulações são obtidas na forma de dispersão coloidal aquosa. Tal fato pode ser favorável a problemas de estabilidade química do polímero e até mesmo do fármaco. Da mesma forma, durante o armazenamento, alterações do meio como, por exemplo, redução do pH por hidrólise do polímero e variação da carga de superfície da partícula,

podem afetar a estabilidade física e favorecer a agregação de partículas resultando em precipitação (GUTERRES e col., 1995; SCHAFFAZICK e col., 2003).

Tensoativos são geralmente empregados para prolongar a estabilidade física desses sistemas (FESSI e col., 1989; GUTERRES e col., 1995). Além disso, fatores como o tipo de partículas formadas (nanocápsulas, nanoesferas ou nanoemulsão), concentração dos componentes (por exemplo: polímero, óleo, tensoativos, substância ativa), localização dos tensoativos no sistema, diâmetro e carga de superfície das partículas e número de partículas formadas podem exercer grande influência na estabilidade final do sistema (CALVO e col., 1996; MOSQUEIRA e col., 2000; SCHAFFAZICK e col., 2003; POHLMANN e col., 2008).

CALVO e colaboradores (1996) prepararam nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão e investigaram esses sistemas segundo o tamanho médio de partícula por um período de 6 meses. Nos dois primeiros bimestres os diâmetros mantiveram-se similares aos iniciais. Entretanto, no último bimestre um significativo aumento foi observado para o sistema de nanoemulsão. Tal resultado indicou que os sistemas poliméricos são fisicamente mais estáveis do que os não poliméricos.

MOSQUEIRA e colaboradores (2000) prepararam nanocápsulas de PLA contendo diferentes óleos como núcleo oleoso, Epikuron 170[®], o qual contém 70% do tensoativo fosfatidilcolina, associadas ou não ao tensoativo não-iônico poloxamer 188[®]. Os autores verificaram que o aumento da concentração de Epikuron 170[®] levou a um aumento do potencial zeta do sistema até que um platô foi atingido, onde os autores atribuíram que toda a superfície da partícula estaria recoberta pelo tensoativo, indicando que este está externamente localizado. Além disso, quando Epikuron[®] mais puro em fosfatidilcolina foi utilizado, menores valores de potencial zeta foram obtidos, indicando que a pureza do tensoativo utilizado pode influenciar estabilidade do sistema, uma vez que a fosfatidilcolina é dipolar e o ácido fosfático, uma das impurezas do Epikuron 170[®], é aniônico.

3.3 Métodos de determinação da estabilidade física

A avaliação da estabilidade física das formulações coloidais geralmente é realizada pelas análises de diâmetro de partícula e de potencial zeta, que reflete o potencial eletrostático de superfície, em função do tempo (CALVO e col., 1996, MOSQUEIRA e col., 2000; SCHAFFAZICK e col., 2007). Para as análises, as técnicas utilizadas são: microscopia, espectroscopia (espalhamento de luz dinâmico), turbidimetria, mobilidade eletroforética e testes de envelhecimento (observação macroscópica) (GRÉGORY, 2009).

Entretanto, as técnicas expostas acima necessitam de pré-tratamento da amostra (diluição), resultando na destruição, irreversível, da condição inicial do sistema e/ou são de longa duração, o que atrasa o desenvolvimento de um produto. Ainda, a possibilidade de comparações quantitativas através dessas técnicas é deficiente. Somente na metade da última década MEUNIER (1996) desenvolveu pela empresa *Formulation* um equipamento chamado Turbiscan, o qual analisa amostras opacas e concentradas pela técnica de espalhamento múltiplo de luz. Este equipamento fornece a transmissão ou o retroespalhamento de luz, backscattering (*BS*), das dispersões através de varreduras da base ao topo da cubeta óptica. Com base em parâmetros da fase dispersa (fração volumétrica e índice de refração) e da fase dispersante (índice de refração) o diâmetro médio de partículas pode ser determinado. Fazendo-se várias varreduras em função do tempo, a estabilidade da formulação pode ser verificada por leves alterações do sinal de *BS* ou de transmissão que podem indicar tendências aos fenômenos de migração (sedimentação, cremagem) e/ou de variação de tamanho de partícula (floculação ou coalescência) (MENGUAL e col., 1999a; MENGUAL e col., 1999b). Na Figura 3, está representado um esquema da avaliação da estabilidade física de sistemas nanoscópicos empregando o espalhamento múltiplo de luz.

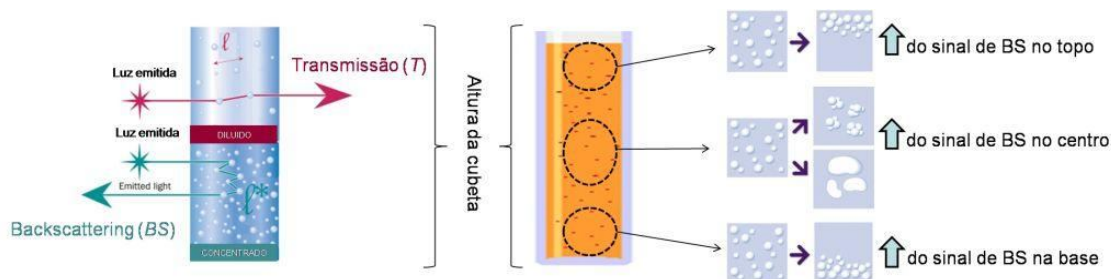


Figura 3. Esquema da interpretação dos fenômenos de instabilidade analisados por espalhamento múltiplo de luz empregando o equipamento Turbiscan.

ROLAND e colaboradores (2003) estudaram quais testes devem ser realizados sistematicamente para acessar de maneira eficiente as propriedades e a estabilidade física de uma emulsão. Os autores determinaram que, pelo menos, medidas de diâmetro, potencial zeta, análise por Turbiscan[®], investigação da estabilidade após centrifugação e ciclos de congelamento/aquecimento, devem ser realizados. Vários estudos subsequentes utilizaram a análise de espalhamento múltiplo de luz para avaliar a estabilidade em longo prazo de sistemas coloidais incluindo nanopartículas de látex (BORDES e col., 2003), nanoemulsão (PORRAS e col., 2008), dispersões de nanotubos de carbono (KIM e col., 2008), ethosomes[®] e lipossomas ultradeformáveis (CELIA e col., 2009).

PORRAS e colaboradores (2008) investigaram a estabilidade de nanoemulsão água/óleo (A/O) preparadas com diferentes misturas dos tensoativos Span 20 (laureato de sorbitano), Span 80 (monooleato de sorbitano), polissorbato 20 e polissorbato 80 adicionadas de água utilizando Turbiscan. Os autores verificaram que as melhores formulações foram preparadas quando um EHL de 8-12 foi obtido e que as formulações não apresentavam fenômenos de migração de partículas em função do tempo, embora um leve aumento de tamanho tenha sido verificado.

WULFF-PÉREZ e colaboradores (2009) prepararam, por ultrasonicação, nanoemulsões contendo, como núcleo oleoso, óleos vegetais como óleo de soja, gergelim e azeite de oliva e como sistema tensoativo um copolímero tri-bloco anfifílico não-iônico, o Pluronic F68. A estabilidade sob diferentes condições de

síntese tais como o poder do ultrason e a concentração de tensoativo, foi investigada através do sinal de *BS* medido por Turbiscan. Os autores verificaram que formulações estáveis foram obtidas mesmo em baixas concentrações de tensoativo e que altas concentrações de tensoativo desestabilizam o sistema. Esse fenômeno foi descrito como efeito de floculação depletiva causada por micelas não adsorvidas. Tal observação demonstra que, embora a presença de tensoativos possa aumentar a estabilidade dos sistemas, a concentração desse componente pode influenciar de maneira contrária na estabilidade da formulação.

Mudanças de temperatura podem acelerar os fenômenos de interação entre as partículas e podem mudar o estado de equilíbrio do sistema (MENGUAL e col., 1999a). O espalhamento de luz, utilizando equipamento Turbiscan *on line*, foi recentemente empregado em um gradiente de temperatura para detectar a inversão de fase de um sistema de emulsão de óleo-água (O/A) para água-óleo (A/O) (PIZZINO e col., 2007; PIZZINO e col., 2009). Nestes estudos, foi verificado que após 3 ciclos de aquecimento e resfriamento foi possível, durante o resfriamento, obter a inversão de fase da emulsão O/A para A/O. Ao ocorrer a inversão, uma modificação brusca no sinal de backscattering foi visualizada. O sinal primeiramente diminuiu até a temperatura de mudança e, após atingi-la, o mesmo aumentou.

3.4 Metoxicinamato de octila (MCO)

Frente à atual situação da camada de ozônio, cresce a preocupação com a proteção contra os raios solares. Filtros químicos e físicos são combinados em formulações para aumentar essa proteção. A busca por dispositivos que possibilitem um maior tempo de permanência desses ativos na superfície da pele aliou a nanotecnologia à proteção solar.

O MCO é um filtro químico de espectro UVB altamente lipofílico. Sua vinculação em sistemas nanométricos vem sendo estudada para aumentar o tempo de resistência frente a radiações solares (ALVAREZ-ROMÁN e col., 2001; ALVAREZ-

ROMÁN e col., 2004; JIMENÉZ e col., 2004; WEISS-ANGELI e col., 2008). A estabilidade física de uma formulação pode influenciar em sua estabilidade química, visto que, no caso de ocorrer um fenômeno de coalescência, seguido de separação de fase, pode deixar o ativo menos protegido contra degradações. Assim, tratando-se de possíveis candidatas a formulações fotoprotetoras, o estudo da estabilidade física de dispersões coloidais de nanopartículas poliméricas mostra-se essencial. Ainda, considerando que as dispersões de nanocápsulas poliméricas já estão no mercado em formulações cosméticas (L'Oreal) e fotoprotetoras (Biolab), o desenvolvimento de um método que possibilite a rápida avaliação da estabilidade física desses sistemas seria de grande vantagem tecnológica (redução de custos e tempo) para o estabelecimento de formulações inovadoras.

ALVAREZ-ROMÁN e colaboradores (2001) avaliaram a influência do polissorbato 85 e do Poloxamer 188[®] como agente estabilizante de nanocápsulas contendo MCO sob as características das formulações em termos de capacidade de encapsulamento e potencial de fotoproteção do carreador. O polissorbato 85 estabilizou as nanocápsulas melhor do que o Poloxamer 188[®], e as nanocápsulas foram mais efetivas em fornecer proteção contra edema induzido por UV em comparação com o filtro solar livre, provavelmente devido a formação de um filme na superfície da pele.

Recentemente, WEISS-ANGELI e colaboradores (2008) avaliaram a estabilidade química do MCO encapsulado concomitantemente com quercetina, um antioxidante, em nanocápsulas de PCL estabilizadas por monoestearato de sorbitano e polissorbato 80 ou somente por Epikuron 170[®]. O estudo da fotoestabilidade frente radiação UVA demonstrou que o co-encapsulamento dessas substâncias retardou a fotodegradação de ambas simultaneamente. Ainda, a co-encapsulamento permitiu melhor estabilização do que o encapsulamento das substâncias isoladas. Os diâmetros de partícula foram acompanhados durante 15 dias, com e sem exposição à luz, e verificou-se que este reduziu levemente para todas as formulações sem exposição à luz e manteve-se constante quando as formulações foram expostas a luz. Tal resultado levou os autores à conclusão de que ambos os sistemas tensoativos foram capazes de

estabilizar fisicamente as suspensões. Entretanto, a fotoestabilidade foi maior quando as substâncias foram co-encapsuladas em suspensão contendo monoestearato de sorbitano e polissorbato 80 como sistema tensoativo.

3.5 Parâmetros termodinâmicos de sistemas dispersos

A termodinâmica informa se determinado fenômeno terá uma tendência a ocorrer de forma espontânea ou não. Parâmetros cinéticos somente podem ser acessados pela análise das variações de energia livre do estado de transição. O estudo termodinâmico de um fenômeno pode fornecer dados rápidos e quantitativos para fins de estudos preliminares de estabilidade para seleção de formulações.

O conceito de “nanotermodinâmica” foi introduzido na década de 1970 e considera, além das interações partícula-partícula, as interações partícula-meio (HILL, 1962). Uma vez que as interações partícula-meio não são negligenciáveis e que as propriedades termodinâmicas e equações são dependentes do "meio" (ou seja, isotérmico, isobárico, aberto, fechado, etc.), as flutuações dos valores das variáveis extensivas devem ser levados em consideração (HILL, 1962). No entanto, a determinação de tais valores é complexa.

As mudanças na energia-livre de *Gibbs* de um sistema nas condições padrão ΔG° ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$) pode ser descrita de acordo com as leis da termodinâmica clássica (Equação 1).

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

(Equação 1)

onde ΔH° (J mol^{-1}) e ΔS° ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) são as variações da entalpia e da entropia em condições padrão e T (K) é a temperatura. Tal equação mostra o impacto da variação da entalpia padrão, da variação da entropia padrão e da temperatura sob a energia livre padrão do sistema (KUBUROVIC e col., 2002). A constante de equilíbrio K pode ser correlacionada com as mudanças na energia-livre do sistema (Equação 2).

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K$$

(Equação 2)

onde R ($8,3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) é a constante dos gases.

ALEXANDRIDIS e colaboradores (1995) investigaram o efeito da temperatura na condutividade de microemulsões de sulfossuccinato de dioctila-água-alcano de diferentes tamanhos e concentração de gotícula para determinar a temperatura de percolação dos sistemas. Os autores consideraram um equilíbrio entre as gotas e os agregados para estimar parâmetros termodinâmicos (ΔH_{cl}° e ΔS_{cl}° de agregação), associados à formação da percolação. Os resultados mostraram que ΔH_{cl}° e ΔS_{cl}° aumentaram com o tamanho e concentração das partículas e com a massa molar do alcano.

JÓDAR-REYES e colaboradores (2001), dispostos a determinar a alteração da entalpia durante o processo de agregação (ΔH_{agr}) de partículas de poliestireno, fizeram uso de microcalorimetria. Neste experimento, a amostra foi diluída e cloreto de sódio foi utilizado como sal agregante. Os resultados mostraram que a ΔH_{agr} aumenta de 0 mJ para em torno de -5,00 mJ com o aumento da concentração de sal e que o processo de agregação foi reversível quando a concentração salina foi abaixo da concentração crítica de coagulação.

A influência da temperatura sobre a estabilidade de dispersões aquosas de nanopartículas de sílica (DALE e col., 2005) e nanoemulsões água-óleo (DALE e col., 2006) estabilizadas com tensoativos não-iônicos de diferentes pesos moleculares já foi investigada por uma abordagem da termodinâmica do processo de floculação induzido pela adição de um eletrólito. Usando, para amostras diluídas, uma técnica turbidimétrica padrão e, para amostras concentradas, observações visuais (DALE e col., 2005) ou o equipamento Turbiscan MA2000 (DALE e col., 2006), os autores determinaram a temperatura crítica de floculação (TCF) para cada sistema. Por meio de uma equação específica, considerando a espessura da monocamada de tensoativo, os autores calcularam a energia-livre relacionada com as atrações de van der Waals

(G_{vdw}) entre as partículas e verificaram que as atrações de van der Waals entre as partículas aumentam à medida que a temperatura da dispersão aumenta. Os experimentos demonstraram que a TCF depende da concentração e do tamanho da cabeça do grupamento do tensoativo, do tamanho e fração volumétrica das gotas ou partículas e da concentração de eletrólitos adicionada.

3.6 Diagramas de van't Hoff

A equação de van't Hoff (Equação 3) correlaciona as mudanças na constante de equilíbrio K como função da variação da temperatura.

$$\frac{\partial \ln K}{\partial T} = \frac{\Delta H^\circ}{RT^2}$$

(Equação 3)

Se a variação da ΔH° for assumida como constante com a temperatura, a integral dessa equação diferencial entre as temperaturas T_1 e T_2 é dada pela Equação 4.

$$\ln\left(\frac{K_2}{K_1}\right) = \frac{\Delta H^\circ}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)$$

(Equação 4)

Substituindo a Equação 1 e a Equação 2 na Equação 4, se obtém a Equação 5. Assim, tanto ΔH° como ΔS° podem ser obtidos plotando-se as mudanças na constante de equilíbrio pela temperatura correspondente.

$$\ln(K) = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

(Equação 5)

Um exemplo da aplicação dos diagramas de van't Hoff para obter as propriedades termodinâmicas de sistemas nanoestruturados e relacionar tais resultados

com sua estabilidade física é o trabalho de MERTINS e colaboradores (2010). Neste trabalho, a equação de van't Hoff foi aplicada para determinar as propriedades termodinâmicas de lipossomas e quitossomas. Os autores utilizaram como constante de equilíbrio o deslocamento químico anisotrópico dos espectros de RMN P^{31} dos sistemas vesiculares. Diferenças significativas não foram observadas entre os valores de ΔH^o e ΔS^o dos lipossomas e quitossomas. Entretanto os autores verificaram que a redução de ΔS^o foi levemente maior para os quitossomas o que sugere que mais energia é necessária para transpor a barreira de energia de transição de fase nesse sistema.

Considerando o exposto, a determinação dos parâmetros termodinâmicos de sistemas dispersos é importante para se estabelecer a estabilidade relativa entre diferentes formulações, tanto durante o seu desenvolvimento quanto para comparar quantitativamente diferentes formulações. Pouco foi relatado envolvendo sistemas nanoestruturados e seus parâmetros termodinâmicos, mesmo que obtidos por diferentes técnicas. Considerando o espalhamento múltiplo de luz de temperatura variada, o presente trabalho descreverá a proposta de sua utilização para a determinação dos parâmetros termodinâmicos de nanocápsulas e nanoemulsões.

3.7 Deformação de nanocápsulas

A técnica de preparação utilizada assim como a composição quali-quantitativa dos sistemas (natureza e concentração do polímero, do tensoativo e do núcleo oleoso) podem alterar as características físico-químicas do sistema e do mesmo modo influenciar a cinética de liberação da substância ativa ou a sua ação *in vivo* (MU e col., 2004). Estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram comportamentos físico-químicos diferentes para nanoesferas, nanocápsulas e nanoemulsão (SOARES, 2003; POHLMANN e col., 2004; CRUZ e col., 2006a). Em um desses trabalhos verificou-se que a variação da concentração do polímero nas nanocápsulas influenciou os perfis de liberação do éster etílico de indometacina a partir desses sistemas (CRUZ e col., 2006b). Mais recentemente foi demonstrado que existe uma relação direta entre a

concentração de monoestearato de sorbitano e a permeabilidade das nanocápsulas. Nesse estudo verificou-se que o fluxo difusional do éster etílico de indometacina a partir das nanocápsulas diminuiu significativamente com o aumento da concentração do monoestearato de sorbitano, devido a mudanças na viscosidade do núcleo das nanocápsulas (JÄGER e col., 2009). Tal aumento da viscosidade do núcleo das partículas pela presença de monoestearato de sorbitano estaria atribuído ao fato de este componente estar localizado disperso no núcleo da partícula (POHLMANN e col., 2002).

Esses carreadores têm sido propostos como alternativa para aumentar a penetração de substâncias na pele devido à sua potencial interação com a superfície cutânea (SHIM e col., 2004; ALVAREZ-ROMÁN e col., 2004a; ALVAREZ-ROMÁN e col., 2004b). Essa interação pode favorecer uma liberação controlada promovendo resposta apropriada por tempo prolongado no local de ação específico, além de possibilitar o uso de determinadas substâncias que são tóxicas e/ou irritantes em altas concentrações (VAUTHIER e col., 2003).

Dessa forma, nosso grupo de pesquisa também vem realizando estudos de permeação cutânea *in vitro* visando determinar o perfil de penetração de substâncias incorporadas em nanocarreadores (ALVES e col., 2007; WEISS-ANGELI, 2008). Recente verificou-se que a incorporação de benzofenona-3, substância altamente lipossolúvel, em nanocápsulas retardou a chegada dessa substância no fluido receptor em comparação com formulações convencionais, sendo que houve um aumento da retenção do ativo nas camadas mais superficiais da pele quando nanoencapsulado (PAESE, 2008). Ainda, o revestimento de nanocápsulas com quitosana, biopolímero catiônico, aumentou o tempo de permanência da benzofenona-3 nas camadas mais superficiais da pele em comparação com as nanocápsulas não-revestidas (SIQUEIRA, 2008). Portanto, o grau de penetração da substância ativa está relacionado com as propriedades físico-químicas dos nanocarreadores (OLVERA-MARTINEZ e col., 2005).

Anteriormente, estudos com conjugados mostraram que o grau de penetração de benzofenona-3 pode estar relacionado tanto com as propriedades do ativo quanto do material usado na conjugação (LUPPI e col., 2004). Utilizando diferentes tipos de conjugados de benzofenona-3 com álcool polivinílico ou com ácidos graxos de tamanhos de cadeia diferentes em dois graus de substituição, ocorrem mudanças nos perfis de permeação *in vitro* de benzofenona-3 em pele de porco. Quanto menor a cadeia do substituinte e menor o grau de substituição, menor foi o diâmetro de partícula, maior foi a fração de benzofenona-3 no compartimento receptor e maior a fração de benzofenona-3 recuperada após 6h da aplicação na pele. O *lag-time* e o fluxo da benzofenona-3 através da pele a partir dos diferentes sistemas foram mais influenciados pelo grau de substituição do que pela natureza do substituinte. Segundo os autores, conjugados com um menor grau de substituição promovem uma saturação mais rápida da pele e perfis de permeação mais rápidos, o que indicaria a habilidade dessas nanopartículas de permitir o movimento da benzofenona-3 para e através da pele.

LBOUOUNNE e colaboradores (2004) investigaram o transporte *in vitro* de clorexidina incorporada em nanocápsulas através de pele de rato sem pêlos utilizando células de difusão estáticas. Os resultados demonstraram que o encapsulamento reduziu a absorção percutânea. Através de microscopia confocal a laser os autores confirmaram que o transporte de nanocápsulas teve influência pela condução através da pele. A integridade mecânica das nanocápsulas estimada pelo ângulo de contato e tensão superficial foi mantida. Segundo os autores isso sugere que a flexibilidade das nanocápsulas garantiu uma bioadesão à pele enquanto sua rigidez restringiu a ligação molecular na pele controlando a liberação de clorexidina.

MOSQUEIRA e colaboradores (2005) prepararam nanocápsulas de PCL e encapsularam substâncias com alto caráter lipofílico (o antifúngico albaconazol e o antimalárico halofantrina) com o objetivo de analisar e compreender possíveis alterações induzidas pela inclusão dessas substâncias nos carreadores. Para esse estudo microscopia de força atômica foi utilizada. Os resultados da razão entre diâmetro e altura das nanocápsulas contendo as substâncias lipofílicas encapsuladas estiveram de

acordo com hipótese anteriormente levantada (MONTASSER e col., 2002) de que as nanocápsulas, compostas por núcleo oleoso, achatam-se no substrato de mica. A partir dos resultados os autores também sugerem que o núcleo oleoso das nanocápsulas pode estar em estado líquido (ou não-sólido) o que permite a deformação das nanocápsulas. As nanocápsulas seriam diferentes de outros sistemas, como as nanoesferas, por exemplo, devido a sua capacidade de deformação e isso permitiria que elas fossem capazes de passar através de espaços intercelulares (MOSQUEIRA e col., 2005).

Segundo OLIVERA-MARTINEZ e colaboradores (2005), a comparação da velocidade de penetração do metoxicinamato de octila (MCO) incorporado em nanoemulsões e em nanocápsulas sugere que as nanoemulsões proporcionam uma penetração mais rápida devido ao seu tamanho e flexibilidade comparada a das nanocápsulas, que são maiores e possuem uma estrutura mais rígida. Da mesma forma, mais recentemente, ALVES e colaboradores (2007) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a influência da composição e do tipo de estrutura dos diferentes nanocarreadores (nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões) na penetração de nimesulida através de pele humana. Os autores verificaram que para o gel contendo nanoemulsões de nimesulida não foi demonstrada a permanência do fármaco no estrato córneo, mas sim sua penetração e permeação direta para a derme. Por outro lado, a quantidade de nimesulida encontrada nas camadas mais profundas da pele foi maior para o gel contendo nanocápsulas de nimesulida do que para o gel contendo nanoesferas ou nanoemulsão de nimesulida. Os autores concluíram que a velocidade de permeação de ativos veiculados a nanoemulsão é mais rápida do que quando esses são veiculados a nanopartículas poliméricas, entretanto essas promovem uma maior penetração dos fármacos.

Dessa forma, tendo em vista que alguns estudos sugerem que as nanocápsulas podem ser estruturas com certo grau de deformação devido ao seu núcleo oleoso o qual, na presença de monoestearato de sorbitano, lipídio sólido, tem mudança de sua viscosidade, é interessante mostrar que, dependendo da composição, esses sistemas poderiam ter deformação modificada e, assim, ser utilizados para diferentes fins. Portanto, em paralelo, durante este trabalho também foi avaliada a hipótese de que

nanocápsulas de núcleo lipídico, ou seja, que contêm monoestearato de sorbitano (NCL) possuem deformação diferenciada de nanocápsulas sem este componente (NC).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Matérias-primas e materiais

- Poli(*epsilon*-caprolactona) (PCL) Mw = 60.000 g/mol (Aldrich, França);
- Monoestearato de sorbitano (Span[®] 60) (Delaware - Porto Alegre, Brasil);
- Polissorbato 80 (Tween 80[®]) (Delaware - Porto Alegre, Brasil);
- Mistura de triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (TCC) (Delaware - Porto Alegre, Brasil);
- Metoxicinamato de octila (Embacaps-Porto Alegre, Brasil);
- Fosfatidilcolina (Lipoid[®] 100) (Gerbras - Anápolis, Brasil);
- Sílica coloidal (Percoll[®]) (Pharmacia-Suécia);
- Acetona P.A. (Nuclear - Brasil);
- Cubetas de vidro borossilicado;
- Cubetas de quartzo;
- Substrato de mica muscovita;
- As sondas utilizadas nas medidas de *tapping* por microscopia de força atômica foram do modelo TESP7 (Veeco Probes, Santa Bárbara-CA);
- As sondas utilizadas nas medidas de contato por microscopia de força atômica foram do modelo OTR4 (Veeco Probes, Santa Bárbara-CA);
- Coluna Waters Nova Park[®] RP-18 (4 μ m, 3,9 x 150 mm) e pré-coluna Security Guard Cartridges C18 phenomenex[®].

4.1.2 Aparelhos e equipamentos

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

- Evaporador rotatório Büchi RE120 (Suíça);
- Placa de agitação magnética com 15 pontos Velp (Europa);
- Dispositivo de aquecimento e circulação de água, acoplado a termostato IKA EH4 (Alemanha);
- Medidas de pH foram realizadas utilizando-se potenciômetro Micronal B-474 (São Paulo, Brasil);
- As análises de espalhamento múltiplo de luz foram realizadas utilizando o Turbiscan LabExpert (Formulacion, Toulouse, França);
- Análise de cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada em equipamento Perkin Elmer S-200 com injetor S-200, detector UV-VIS;
- Medidas de tensão superficial foram realizadas em Tensiômetro DCAT 11 (Dataphysics, Alemanha), e placa Wilhelmy.

Departamento de Bioquímica/UFRGS, em colaboração com a Profa. Dra. Ana Maria Oliveira Battastini:

- Estudos de densidade foram realizados em centrífuga modelo Hitachi CP70 MX, e rotor PS28T (Japão).

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

- Análises de espectroscopia de correlação de fótons e as análises de mobilidade eletroforética foram realizadas utilizando um Zetasizer[®] Nanoseries, (Malvern, Reino Unido);
- Análises de difração a Laser foram realizadas utilizando um Mastersizer[®], (Malvern, Reino Unido);
- Medidas de Viscosidade foram realizadas em um viscosímetro vibro (A & D da Empresa, do Japão), modelo SV-10.

Departamento de Química Orgânica, IQ/UFRGS:

- Espectrofotômetro UV-1601PC (Shimadzu, Japão);
- Refratômetro Carl-Zeiss do tipo Abbe (Jena, Alemanha).

Centro de Combustíveis, Biocombustíveis, Lubrificantes e óleos/UFRGS: Laboratório Multiusuário de Análise Térmica (LAMAT). Auxílio do Técnico Dr. Júlio César Pacheco Vaghetti:

- As análises de calorimetria exploratória diferencial foram realizadas em um calorímetro de compensação de fluxo de calor (TA Instruments, Q20, EUA).

Laboratório de Microscopia Avançada, IF/UFC, em colaboração com o Prof. Dr. Jeanlex Soares de Sousa e com a Doutoranda Luciana Magalhães Rebêlo Alencar:

- Medidas de microscopia de força atômica foram realizadas em microscópio Nanoscope IIIa multimode (Digital Instruments-Veeco, Santa Bárbara- CA, E.U.A).

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação das dispersões coloidais

O método de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI e col., 1989) foi utilizado para preparar as formulações contendo ou não um lipídio sólido, monoestearato de sorbitano, disperso no núcleo (MÜLLER e col., 2001; WEISS-ANGELI e col., 2008; JÄGER e col., 2009). Resumidamente, para a obtenção das suspensões de nanocápsulas (NC), 0,25 g de PCL foram dissolvidos com 0,40 g de uma mistura de MCO e TCC (1:1, v / v) em 67,2 mL de acetona. 0,095 g de monoestearato de sorbitano e/ou 0,075 g de fosfatidilcolina, ou nenhum deles, foram adicionados à solução orgânica anterior. Essa fase orgânica foi injetada em uma solução aquosa de 132,5 mL contendo 0,20 g de polissorbato 80 sob agitação magnética. Após 10 min, a acetona foi removida e a suspensão aquosa foi concentrada sob pressão reduzida a 40 °C. O volume final da suspensão foi ajustado para 25,0 ml, correspondendo a 8 mg ml⁻¹ de MCO. As quantidades de componente oleoso e de monoestearato de sorbitano foram reduzidas a metade das quantidades usualmente empregadas desses componentes para o preparo das formulações (JÄGER, 2008). As formulações de nanoemulsões foram preparadas conforme descrito acima omitindo-se o polímero na fase orgânica (CALVO e col., 1996; TEIXEIRA e col., 2002; CRUZ e col., 2006a). As composições quali-quantitativas das formulações estão expostas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição quali-quantitativa das formulações de NC, NCL, NE e NEL (volume final= 25 mL).

| Constituinte | | NCL _F | NCL ₀ | NC _F | NC ₀ | NEL _F | NEL ₀ | NE _F | NE ₀ |
|---------------|---------------------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| Fase orgânica | PCL (mg) | 250 | 250 | 250 | 250 | - | - | - | - |
| | Monoestearato de sorbitano (mg) | 95 | 95 | - | - | 95 | 95 | - | - |
| | Fosfatidilcolina (mg) | 75 | - | 75 | - | 75 | - | 75 | - |
| | MCO (mg) | | | | 200 | | | | |
| | TCC (mg) | | | | 200 | | | | |
| | Acetona (mL) | | | | 67 | | | | |
| Fase aquosa | Polissorbato 80 (mg) | | | | 200 | | | | |
| | Água MilliQ® (mL) | | | | 133 | | | | |

As formulações contendo monoestearato de sorbitano foram nomeadas nanocápsulas de núcleo lipídico (NCL) ou nanoemulsões lipídicas (NEL) enquanto que as formulações de nanocápsulas ou de nanoemulsões sem este componente foram chamadas de NC e NE, respectivamente. Essas formulações foram preparadas na presença, NCL_F, NC_F, NEL_F e NE_F, ou ausência de fosfatidilcolina, NCL₀, NC₀, NEL₀ e NE₀. Para comparação, uma formulação de nanoemulsão foi preparada utilizando exclusivamente TCC (0,40 g) e polissorbato 80 e chamada de NE_{TCC}.

4.2.2 Distribuição de tamanho, tamanho médio e polidispersão

A análise da distribuição de tamanho de partículas foi primeiramente investigada por difração de laser em Mastersizer, obtendo-se tamanhos de partículas por volume e o valor de tamanho médio, obtido pelo cálculo do valor médio de diâmetro de esfera equivalente ($D_{[4,3]}$) conforme Equação 6, assim como os valores de polidispersão (SPAN) através da Equação 7.

$$D_{[4,3]} = \frac{\sum d^4}{\sum d^3}$$

(Equação 6)

$$SPAN = \frac{(D_{0.9} - D_{0.1})}{D_{0.5}}$$

(Equação 7)

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

4.2.3 Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

As determinações de diâmetro médio (z-average, calculado pela função de correlação) e o índice de polidispersão (PDI), Equação 8, foram realizadas por espalhamento de luz dinâmico em ZetaSizer após diluição das amostras em água MilliQ® (0,45 μm). Para cada medida foram realizadas 7 varreduras de 10 segundos cada. Empregando o mesmo equipamento, os valores de potencial zeta foram obtidos pela análise da mobilidade eletroforética de cada amostra (20 medidas). As análises foram realizadas após diluição adequada das suspensões ou emulsões com solução aquosa de NaCl 10 mM pré-filtrada (0,45 μm). As análises foram realizadas em triplicata de lote à temperatura ambiente (25 °C).

$$PDI = \frac{\sigma^2}{Z_D^2}$$

(Equação 8)

onde σ é o desvio padrão de uma gaussiana hipotética de distribuição e Z é o z-average.

4.2.4 Medidas de tensão superficial

Os valores de tensão superficial das fases orgânicas e da fase aquosa das suspensões de NCL e de NC e das formulações de NEL e de NE foram determinados pelo método de placa de Wilhelmy utilizando tensiômetro. Cada medida foi feita em triplicata a 23 ± 1 °C (n=3).

4.2.5 Medidas de Viscosidade

Os valores de viscosidade das fases orgânicas das suspensões de NCL e de NC e das fases orgânicas das formulações de NEL e de NE foram determinados em viscosímetro vibracional. A calibração do equipamento foi realizada com o solvente orgânico utilizado nas fases orgânicas (acetona). Três medidas de três lotes diferentes foram realizadas a 23 °C ± 1 (n=9).

4.2.6 Turbidimetria

A turbidez τ (cm^{-1}) dos sistemas foi determinada por método descrito anteriormente (ZATTONI e col., 2003; ZATTONI e col., 2004, POLETTTO e col., 2008a) (Equação 9). As formulações foram diluídas (água MilliQ®) e analisadas por espectrofotometria UV-Vis.

$$\tau = \frac{I}{b} \ln(I_0) \cdot A$$

(Equação 9)

onde b (cm) é o percurso óptico da célula e A é o sinal de absorbância.

Em uma amostra suficientemente diluída de partículas esféricas, τ é uma função do diâmetro de partícula d (cm), da concentração de partículas cm^{-3} (N) e da grandeza adimensional W , que é a eficiência de extinção (Equação 10).

$$\tau = \frac{\pi}{4} d^2 \cdot N \cdot W$$

(Equação 10)

onde W é uma função do tipo $W(x, m)$, onde x é o parâmetro de tamanho definido como $x = \pi d / \lambda$, onde λ (cm) é o comprimento de onda incidente do meio dispersante, e o parâmetro m é o índice de refração relativo da partícula. A um índice de refração fixo, W pode ser obtido pela Equação 11.

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

(Equação 11)

onde d (cm) é o diâmetro da partícula, ρ (g cm⁻³) é a densidade e K (cm² g⁻¹) é o coeficiente de extinção da amostra, que pode ser calculado utilizando a Equação 12.

$$\tau = \ln(10) \cdot K \cdot c$$

(Equação 12)

onde c (g cm⁻³) é a concentração da amostra. Desta forma, as suspensões de NCL e de NC e as formulações de NEL e de NE foram diluídas (água MilliQ[®]) para uma gama de concentrações das formulações (soma da massa de todos os componentes da partícula/gotícula dividido pelo volume final da formulação) obedecendo lei de Lambert-Beer. As amostras diluídas foram analisadas em 400 nm (nenhuma absorção do MCO ocorre neste comprimento de onda). Os diâmetros d (Equação 11) utilizados foram os diâmetros médios obtidos experimentalmente através de espectroscopia de correlação de fótons.

Os valores de área total (cm²), S_T , dos sistemas foram obtidos a partir da Equação 13.

$$S_T = N \cdot (4 \cdot \pi \cdot r^2)$$

(Equação 13)

onde N é o número de partículas por cm^3 e r (cm) é o raio da partícula ou da gotícula.

4.2.7 Calorimetria exploratória diferencial

As formulações de NCL e de NC foram analisadas por calorimetria exploratória diferencial. Para tal, as suspensões tiveram o seu conteúdo de água retirado por evaporação à baixa pressão e os seus respectivos resíduos foram, posteriormente, colocados em dessecador por 24 h. O equipamento utilizado foi um calorímetro de compensação de fluxo de calor, sendo que as referências foram amostras das matérias-primas: PCL, monoestearato de sorbitano, fosfatidilcolina e MCO. Foram realizados dois ciclos, um de $-80\text{ }^\circ\text{C}$ a $100\text{ }^\circ\text{C}$ e outro de $100\text{ }^\circ\text{C}$ a $-80\text{ }^\circ\text{C}$, com intervalo de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$.

4.2.8 Análises de Espalhamento Múltiplo de Luz

As análises de espalhamento múltiplo de luz foram realizados em um equipamento *TurbiscanLab*, cujo sistema de detecção consiste de um feixe de luz no infravermelho próximo ($\lambda = 880\text{ nm}$) e dois detectores [um para detectar a luz transmitida e outro para detectar a luz retroespalhada, backscattering (*BS*)]. Os detectores de transmissão e de backscattering recebem luz em ângulos de 180° e 45° , respectivamente, em relação ao feixe de luz incidente. O sistema detector realiza uma varredura da base para o topo da cubeta óptica de altura de 55 mm , adquirindo os dados a cada $40\text{ }\mu\text{m}$ de intervalo.

Para executar as análises, a cubeta foi preenchida até cerca de 44 mm de sua altura com cada suspensão ou nanoemulsão. As amostras foram analisadas em uma temperatura constante (determinação dos perfis de *BS*) ou utilizando um gradiente de

temperatura [método de espalhamento múltiplo de luz em temperatura variada (EML-TV)]. As curvas obtidas fornecem o fluxo de luz transmitido ou retroespalhado em percentagem relativa a dois padrões de referência (suspensão de esferas monodispersas de látex e óleo de silicone).

4.2.8.1 Perfis de *BS*

As formulações foram analisadas em uma cubeta óptica pelo período de 10 h à temperatura constante de 25 °C, usando o modo de varreduras múltiplas (uma varredura a cada 5 min). As variações de sinal de *BS* de todas as varreduras em relação à primeira varredura foram utilizadas para acessar os perfis de variação de *BS* e, assim, visualizar os fenômenos de migração (sedimentação, cremagem) e/ou variação de tamanho de partícula (floculação, coalescência).

4.2.8.2 Método EML-TV

Cada formulação foi vertida em uma cubeta óptica sem qualquer diluição prévia e o sinal de *BS* foi obtido utilizando um gradiente de temperatura entre 23 °C a 56 °C, para o qual a temperatura foi manualmente variada a cada 3 °C, esperando 5 min para a estabilização da temperatura e realização da varredura. O tempo de duração total de cada análise foi inferior a 1 h.

4.2.8.2.1 Determinação de parâmetros termodinâmicos

Para a determinação das variáveis termodinâmicas: variação de entalpia padrão de floculação (ΔH°_{floc}) e variação de entropia padrão de floculação (ΔS°_{floc}), os dados de espalhamento múltiplo de luz, obtidos como descrito no item 4.2.8.2, foram plotados em diagrama de van't Hoff. Os valores de variação de energia livre de

floculação (ΔG_{floc}) em função da temperatura foram obtidos por meio da equação de *Gibbs* (Equação 14).

$$\Delta G_{floc} = \Delta H_{floc}^{\circ} - T\Delta S_{floc}^{\circ}$$

(Equação 14)

4.2.9 Índice de refração

Os índices de refração do óleo e da fase aquosa (polissorbato 80 em água) que foram utilizadas para preparar a formulação NE_{TCC} foram determinados por um refratômetro onde os prismas foram fechados em uma camisa-de-água ligada a um banho termostaticado. As fases, orgânica e aquosa, foram preparadas em duplicata e foram realizadas três medições para cada solução (n=6).

4.2.10 Delineamento fatorial

A presença ou não de polímero, fosfatidilcolina e monoestearato de sorbitano foram escolhidos como fatores (X_1 , X_2 e X_3 , respectivamente) e avaliados quanto a sua influência sobre a estabilidade do sistema, utilizando um modelo fatorial completo 2^3 . Para avaliar, separadamente, o efeito desses fatores sobre a estabilidade de cada sistema coloidal, NCL e NC ou NEL e NE, foram delineados modelos fatoriais 2^2 utilizando, portanto, como fatores somente fosfatidilcolina (X_2) e monoestearato de sorbitano (X_3). Os fatores foram estabelecidos em dois níveis cada. Onde o menor (ausência) e o maior (presença) nível foram representados pelos sinais -1 e 1, respectivamente (Tabela 2). A variação da entalpia padrão de flocação foi utilizada como variável resposta. O software Statgraphics Plus[®] (STATGRAPHICS Plus versão 5.1) foi utilizado para realizar a análise estatística dos dados.

Tabela 2. Codificação das formulações segundo os níveis (1 e -1) das variáveis principais e originais para o desenho fatorial 2^3 . No caso dos desenhos 2^2 para os sistemas NCL e NC ou NEL e NE somente foram consideradas as colunas das variáveis fosfatidilcolina e monoestearato de sorbitano.

| Variável principal | Polímero | Fosfatidilcolina | Monoestearato de sorbitano |
|--------------------|-----------------------|------------------|----------------------------|
| Variável original | X ₁ | X ₂ | X ₃ |
| Formulação | Formulação codificada | | |
| NCL _F | 1 | 1 | 1 |
| NCL ₀ | 1 | -1 | 1 |
| NC _F | 1 | 1 | -1 |
| NC ₀ | 1 | -1 | -1 |
| NEL _F | -1 | 1 | 1 |
| NEL ₀ | -1 | -1 | 1 |
| NE _F | -1 | 1 | -1 |
| NE ₀ | -1 | -1 | -1 |

4.2.11 Estudos de densidade

O estudo de densidade das partículas foi realizado em gradiente de sílica coloidal (Percoll 54% v/v em NaCl 0,15 M) formado *in situ* durante ultracentrifugação a 20 °C e 30.000 ×g durante 90 min (PERTOFT, 2000). Para as análises, 19,6 ml da solução foram adicionados a 0,4 mL de dispersão coloidal concentrada. Marcadores, *beads*, de diferentes densidades foram utilizados para a calibração externa das bandas. Faixas de papel milimetrado foram utilizadas para medir a distância entre o topo do menisco até o limite da banda. As densidades foram calculadas a partir das curvas padrão plotando-se a distância do início até a banda *versus* a densidade de cada banda de marcador. Formulações de nanoesferas, nanodispersão de monoestearato de sorbitano e lipossomas de fosfatidilcolina foram preparadas para comparações nos

estudos de densidade (Tabela 3). Essas formulações foram preparadas empregando-se o método descrito na seção 4.2.1.

Tabela 3. Composição quali-quantitativa das formulações de nanoesferas (NS), nanodispersão (ND) e lipossomas (LS) (volume final= 10 mL).

| | Constituinte | NS | ND | LS |
|---------------|---------------------------------|-----|----|----|
| Fase aquosa | Polissorbato 80 | | 80 | |
| | Água MilliQ [®] | | 53 | |
| Fase orgânica | PCL (mg) | 100 | - | - |
| | Monoestearato de sorbitano (mg) | - | 38 | - |
| | Fosfatidilcolina (mg) | - | - | 30 |
| | Acetona (mL) | | 27 | |

4.2.12 Estudos de estabilidade física em tempo real e validação do método EML-TV

Análises de difração de laser, observação macroscópica e espalhamento múltiplo de luz foram realizadas nas formulações de NCL, NC, NEL e NE logo após o preparo e após ou durante um determinado período de armazenamento. Os valores de tamanho médio e SPAN foram medidos por difração de laser em intervalos de 0, 15, 45, 60 e 90 dias. Utilizando a mesma técnica, a distribuição de tamanho em volume (%) foi determinada após cinco meses (150 dias) de armazenamento das formulações e comparada com aquelas obtidas logo após o preparo. As formulações de NCL e NC foram analisadas quanto ao seu aspecto visual macroscópico após cinco meses (150 dias) de armazenamento. Análises de espalhamento múltiplo de luz foram realizadas, com varreduras de 1 h, para todas as formulações a cada período de 0, 15, 30, 60 e 90 dias. As condições de armazenamento utilizadas foram temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C) e abrigo da luz.

4.2.13 Análise de estabilidade química

4.2.13.1 Método Analítico

O método analítico foi validado conforme descrito por (WEISS-ANGELI, 2008) utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A fase móvel consistiu de acetonitrila/água MilliQ[®] (85:15, v/v), fluxo de 1,0 mL/min, $\lambda = 310$ nm. Foram preparadas diluições de 5 a 40 $\mu\text{g/mL}$ em metanol a partir de solução-mãe de MCO em metanol.

4.2.13.2 Medidas de pH

As mediadas de pH foram realizadas por potenciometria sem diluição prévia das amostras.

4.2.13.3 Estabilidade química

As formulações foram acompanhadas segundo o teor de MCO e pH durante um período de 90 dias (0, 15, 30, 60 e 90 dias). Para quantificar o MCO nas formulações, um volume determinado de cada suspensão de NCL ou de NC e de cada formulação de NEL ou de NE foi diluído em metanol, correspondendo teoricamente ao ponto médio (10 $\mu\text{g/mL}$) da curva padrão de quantificação. Cada teor em função do tempo foi correlacionado com o teor inicial de cada formulação e expresso em percentagem de MCO (%).

4.2.14 Capacidade de deformação das partículas

A diferença qualitativa no comportamento elástico (ou nanomecânico) das nanocápsulas, contendo (NCL) ou não (NC) o lipídio sólido, monoestearato de sorbitano, disperso no núcleo, foi determinada por meio de microscopia de força

atômica (AFM). As suspensões de nanocápsulas foram diluídas 1000x, em água MilliQ[®], sendo 5 μL desta solução depositados sob substrato de mica, que foi deixado em repouso até completa evaporação da água. Para avaliar o formato, diâmetro e altura, imagens topográficas e de fase foram realizadas ao ar, em modo *tapping*. Nesse modo de varredura foram utilizadas sondas com constante de mola entre 20 e 80 N/m. Para determinar a rigidez das amostras, medidas foram realizadas em modo contato aplicando o procedimento de *Force Volume*, o qual forneceu curvas de força. Nesse modo de análise, foram utilizadas sondas com constante de mola de 0,08 N/m.

A taxa de varredura empregada nas medidas de topografia foi de 1 Hz. As medidas de volume de força foram realizadas com resolução de 256 pontos por cada curva de força, 64 x 64 curvas de força, igualmente distribuídas sobre a área de varredura selecionada em cada medida. A taxa de varredura empregada nesse modo foi de 5 Hz. A força aplicada em cada indentação foi de aproximadamente 4 nN.

Os dados das curvas de força foram analisados a partir de uma rotina matemática, escrita em *Matlab*, desenvolvida pelos pesquisadores Prof. Dr. Jeanlex Soares de Sousa e com a Doutoranda Luciana Magalhães Rebêlo Alencar, colaboradores da Universidade Federal do Ceará (LMA - Laboratório de Microscopia Avançada). Tal rotina é baseada no modelo de Hertz para deformação de sólidos, considerando-se a geometria do indentador como sendo cônica (HERTZ *apud* NEUMANN, 2009; SNEDDON *apud* NEUMANN, 2009).¹

¹ HERTZ, H. **Über die Berührung Fester Elastischer Körper**. Journal für die Reine und Angewandte Mathematik, v. 92, p. 156-171, 1881 *apud* NEUMANN, T. Determining the elastic modulus of biological samples using atomic force microscopy. **Application Report for JPK Instruments AG**, Maio, 2009. Disponível em <<http://www.jpk.com/index.230.en.html>>. Acesso em 30.01.2010.
SNEDDON, I. N. **The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile**. International Journal of Engineering Science, v. 3, p. 47-57, 1965 *apud* NEUMANN, T. Determining the elastic modulus of biological samples using atomic force microscopy. **Application Report for JPK Instruments AG**, Maio, 2009. Disponível em <<http://www.jpk.com/index.230.en.html>>. Acesso em 30.01.2010.

4.2.14.1 Fundamentação teórica das medidas de AFM

Através das medidas de volume de força (*Force Volume*) realizadas no modo contato, dados qualitativos a respeito da capacidade de deformação das nanocápsulas foram obtidos. O “volume de força” é constituído por uma disposição tridimensional da combinação das curvas de força de um conjunto de pontos x-y apresentando a vantagem, em relação às curvas de força simples, de possibilitar que um conjunto de curvas seja coletado em todo o intervalo de varredura analisado. As curvas de força obtidas (Figura 4) carregam informações a respeito do potencial de interação entre o par sonda-amostra. Para analisar as curvas obtidas em um dado intervalo da força aplicada sob amostra e obtenção dos dados de rigidez é necessário converter os valores de deflexão em valores de força. Isso somente é possível através da extração dos dados das curvas e aplicação de modelos teóricos, pois elas não podem ser comparadas com gráficos potenciais de mesma natureza devido à presença fatores vinculados ao próprio equipamento (deflexão do cantilever decorrentes das forças intermoleculares entre a sonda e as moléculas da superfície indentada), assim como características ligadas ao tipo de rigidez da amostra (que pode ser pouco ou muito indentável).

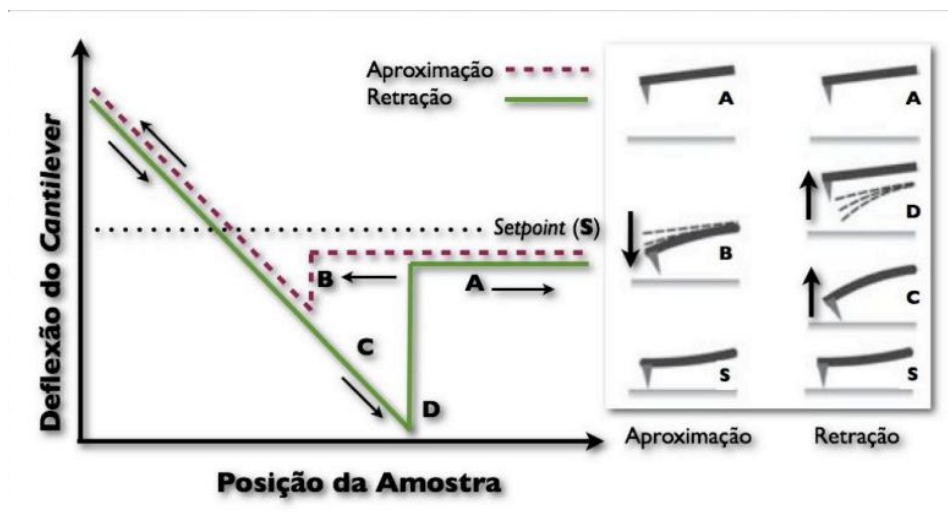


Figura 4. Imagem esquemática mostrando uma curva de força. Adaptado de THOURTON, 1997.

Considerando que os cantilevers podem ser considerados molas lineares para pequenas deflexões, para transformar os valores de deflexão em valores de força, a lei de Hooke pode ser aplicada (Equação 15).

$$F = k_c \cdot x$$

(Equação 15)

onde F é a força (N/m, que resultam em nN ou μ N em atmosfera ambiente), k_c é a constante de mola (N/m) e x é a deflexão do cantilever (nm).

No caso de amostras que são deformadas pelo cantilever (macias), a indentação δ é dada pela diferença entre a altura z da base da amostra e a deflexão x do cantilever (Equação 16).

$$\delta = (z - z_0) - (x - x_0) = z - z_0 - x + x_0$$

(Equação 16)

onde x_0 é o ajuste da deflexão e z_0 é a posição onde a sonda tocou a amostra pela primeira vez. Esses ajustes são necessários, pois a deflexão não é necessariamente nula quando o cantilever não está em contato com a amostra (o que pode ser devido a vibrações ou estresses no cantilever). Por razões similares, os ajustes na altura também são considerados.

A partir do modelo de Hertz, é descrita a resposta elástica de uma amostra infinitamente macia, em comparação ao indentador, os quais, nos casos das sondas AFM, possuem formato cônico ou parabólico. Como a geometria do indentador utilizado neste trabalho foi cônica, somente a equação que considera essa geometria é demonstrada (Equação 17).

$$F_{Hertz} = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{E}{(1 - \nu^2)} \cdot \delta^2 \tan(\theta)$$

(Equação 17)

onde F_{Hertz} é a força necessária para deformar uma amostra elástica, δ é a indentação, E é a resposta elástica (módulo de Young), ν é o raio de Poisson e θ é o ângulo de abertura do cone. A inclinação (“slope”) da curva que relaciona E e a F_{Hertz} é dada pela derivada de F_{Hertz} em função de δ^2 (Equação 18), a qual, reorganizada, fornece o valor de E (Equação 19).

$$slope = \frac{dF_{Hertz}}{d\delta^2} = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{E}{1-\nu^2} \cdot \tan(\theta)$$

(Equação 18)

$$E = \frac{\pi}{2} \cdot \frac{1-\nu^2}{\tan(\theta)} \cdot slope$$

(Equação 19)

Os valores das variáveis da equação acima são geralmente conhecidos ou podem ser obtidos experimentalmente. A constante de mola k_c e o ângulo de abertura α são fornecidos pelo fabricante das sondas ou podem ser determinados no experimento. A deflexão x e a altura z são valores extraídos das curvas de força obtidas com o AFM. O valor de x_0 é obtido pela média dos valores de x fora da amostra (geralmente os primeiros 100 nm). O módulo de Young E , representado por tensão *versus* deformação é o parâmetro mecânico que proporciona uma medida quantitativa da rigidez do material.

4.2.15 Análise estatística

Os dados foram avaliados empregando-se teste-t e ANOVA como métodos estatísticos, $\alpha=0,05$ (SigmaStat para Windows, versão 3.5).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação das dispersões coloidais

Os sistemas coloidais submicrométricos foram preparados por deposição interfacial de polímero pré-formado (NC ou NCL) ou emulsificação espontânea (NE ou NEL) (FESSI e col., 1989; CALVO e col., 1996; MÜLLER e col., 2001; TEIXEIRA e col., 2002; CRUZ e col., 2006a; JÄGER e col., 2009). As formulações de nanocápsulas (NC), de nanocápsulas de núcleo lipídico (NCL), de nanoemulsões (NE) ou de nanoemulsões lipídicas (NEL) apresentaram aspecto leitoso opalescente com efeito de Tyndall. As estruturas químicas dos componentes das formulações encontram-se em anexo (ANEXO 1).

Após o preparo, as formulações de NC, NCL, NE e NEL foram analisadas por difração de laser para se verificar a distribuição de tamanho (Figura 5), os valores de tamanho médio e os valores SPAN (Tabela 4).

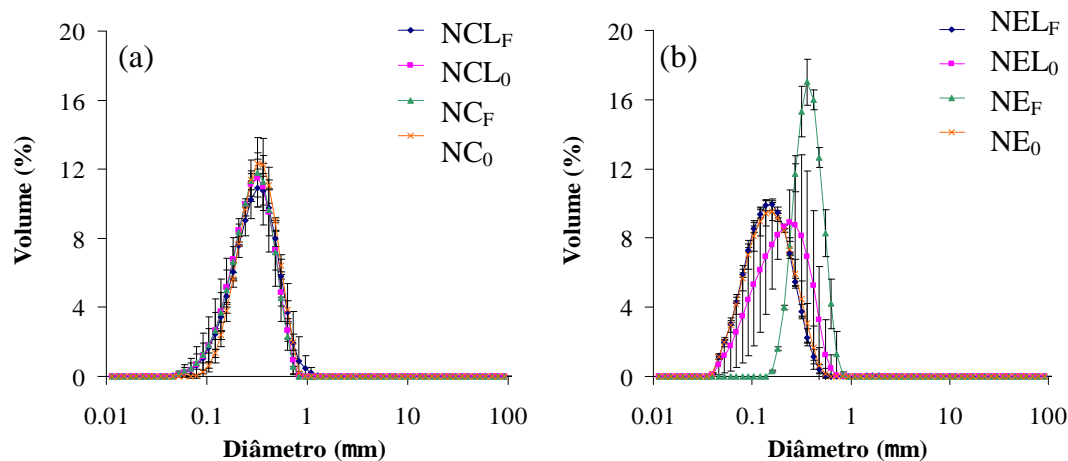


Figura 5. Gráficos de distribuição de tamanho de partícula (volume %) para as formulações (a) de NCL e NC e (b) de NEL e NE, obtidos por difração de laser. $n=3$ (lotes).

Tabela 4. Valores (média \pm DP) de tamanho médio e SPAN obtidos para as formulações de NC, NCL, NE e NEL. n=3 (lotes).*

| Formulação | Tamanho médio (nm) | SPAN |
|------------------|------------------------------|-----------------|
| NCL _F | 310 \pm 36 | 1,30 \pm 0,14 |
| NCL ₀ | 286 \pm 21 | 1,23 \pm 0,11 |
| NC _F | 283 \pm 35 | 1,23 \pm 0,20 |
| NC ₀ | 319 \pm 3 | 1,13 \pm 0,05 |
| NEL _F | 162 \pm 25 ^{bc**} | 1,42 \pm 0,07 |
| NEL ₀ | 207 \pm 65 ^b | 1,38 \pm 0,30 |
| NE _F | 356 \pm 13 ^a | 0,81 \pm 0,06 |
| NE ₀ | 157 \pm 16 ^{bcd} | 1,53 \pm 0,10 |

* Teste-t entre formulações com e sem fosfatidilcolina ou monoestearato de sorbitano e entre nanocápsulas e nanoemulsões correspondentes. ANOVA One-Way para comparações de todas as formulações de nanocápsulas ou de nanoemulsões. $\alpha=0.05$.

** Letras diferentes indicam significância estatística (Teste-Tukey para comparações múltiplas de amostras com diferença significativa entre as médias).

As distribuições de tamanho em volume cumulativo percentual, obtidas por difração de laser, mostraram-se na escala nanométrica. Tanto as formulações de NC (NC_F e NC₀) quanto às formulações de NCL (NCL_F e NCL₀) apresentaram valores de tamanho médio ao redor de 300 nm, sem diferenças significativas dentro e entre as séries ($P>0,05$). Para as formulações de NE (NE_F e NE₀), os valores de tamanho médio foram estatisticamente maiores ($P<0,05$) para a formulação NE_F (356 \pm 13 nm) do que para a formulação NE₀ (157 \pm 16 nm). Por outro lado, para as formulações de NEL (NEL_F e NEL₀), tais valores permaneceram entre 162 \pm 25 nm (NEL_F) e 207 \pm 65 nm (NEL₀), não apresentando diferenças significativas ($P>0,05$). A comparação múltipla entre as formulações de nanoemulsões indicou que a formulação NEF apresentou os maiores valores de tamanho médio ($P<0,05$).

Para as formulações de NCL, os valores de tamanho médio foram 310 \pm 36 nm (NCL_F) e 286 \pm 21 nm (NCL₀) enquanto que para as formulações de NEL esses foram

162 ± 25 nm (NEL_F) e 207 ± 65 nm (NEL_0). O que indica que as formulações de NCL apresentaram tendência a maiores valores de tamanho médio do que as formulações de NEL correspondentes. Por outro lado, o mesmo não foi observado entre as formulações de NC (NC_F e NC_0) e de NE (NE_F e NE_0) correspondentes, pois, enquanto a formulação NC_0 (319 ± 3 nm) apresentou maiores valores de tamanho médio que a formulação NE_0 (157 ± 16 nm), o inverso foi observado entre NC_F (283 ± 35 nm) e NE_F (356 ± 13 nm) ($P < 0,05$). Valores de SPAN próximos a 1 foram apresentados por todas as formulações, o que indica estreita distribuição de tamanho.

5.2 Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta

Uma vez que as distribuições de tamanho obtidas por difração de laser mostraram-se em escala nanométrica e estreitas, análises suplementares de caracterização foram realizadas. A espectroscopia de correlação de fótons, que é mais precisa para a nanoescala, foi realizada para determinar os valores de diâmetro médio, distribuição de diâmetros e índice de polidispersão (PDI) dos colóides (Tabela 5).

Tabela 5. Valores (média \pm DP) de diâmetro médio, PDI e potencial zeta, obtidos para as formulações de NC, NCL, NE e NEL. n=3.*

| Formulação | Diâmetro médio (nm) | PDI | Potencial zeta (mV) |
|------------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| NCL _F | 206 \pm 6 | 0,15 \pm 0,02 | -12 \pm 2 |
| NCL ₀ | 217 \pm 20 | 0,14 \pm 0,02 | -14 \pm 4 |
| NC _F | 237 \pm 8 | 0,15 \pm 0,02 | -12 \pm 1 |
| NC ₀ | 216 \pm 8 | 0,16 \pm 0,04 | -8 \pm 3 |
| NEL _F | 206 \pm 55 | 0,10 \pm 0,03 | -6 \pm 1 |
| NEL ₀ | 218 \pm 34 | 0,23 \pm 0,12 | -12 \pm 4 |
| NE _F | 222 \pm 35 | 0,18 \pm 0,05 | -6 \pm 1 |
| NE ₀ | 172 \pm 1 | 0,06 \pm 0,03 | -13 \pm 2 |

* Teste-t entre formulações com e sem fosfatidilcolina ou monoestearato de sorbitano e entre nanocápsulas e nanoemulsões correspondentes. ANOVA One-Way para comparações de todas as formulações de nanocápsulas ou de nanoemulsões. $\alpha=0,05$.

Os resultados mostraram valores de diâmetro médio em torno de 200 nm para a maior parte das formulações. As formulações de NC e de NE contendo fosfatidilcolina, NC_F (237 \pm 8 nm) e NE_F (222 \pm 35 nm), mostraram tendência a maiores valores de diâmetro médio do que as outras formulações de mesma natureza coloidal (NCL_F, NCL₀, NC₀ e NEL_F, NEL₀, NE₀). Conforme havia sido observado nos resultados anteriormente mostrados de difração de laser, a formulação NE₀ apresentou tendência aos menores valores de diâmetro médio (172 \pm 1 nm) (P<0,05).

Os valores de diâmetro médio não apresentaram diferenças significativas entre NCL (NCL_F e NCL₀) e NEL (NEL_F e NEL₀) (P>0,05). Por outro lado, entre as formulações de NC e NE, NC₀ diferiu significativamente de NE₀ quanto aos valores de diâmetro médio (P<0,05). Entretanto, os resultados de diâmetro médio obtidos estão em conformidade com os valores apresentados por esses sistemas quando os mesmos são obtidos através dos métodos de preparo utilizados: deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI e col., 1989; JÄGER e col., 2007) ou emulsificação-

espontânea (TEIXEIRA e col., 2002; CRUZ e col., 2006a). Ainda, embora tais sistemas sejam polidispersos, os valores de PDI abaixo de 0,25 indicaram que a distribuição de diâmetro é estreita.

Valores de potencial zeta foram determinados no intervalo de -5 a -18 mV. Levando em consideração as características dos componentes utilizados, tais valores são explicados devido aos materiais dos colóides que têm funções oxigenadas e, portanto, apresentam densidade parcial negativa na pseudo-fase interface. Os valores próximos de zero de potencial zeta são consequência do efeito de impedimento estérico do polissorbato 80, tensoativo não-iônico utilizado para estabilizar os colóides (JÄGER e col., 2009).

Os gráficos de distribuição de diâmetro para as formulações de NCL e NC (Figura 6) e de NEL e NE (Figura 7) foram plotados considerando as contribuições das partículas sob a luz espalhada em intensidade (%), em volume (%) e número (%) de três medidas de um mesmo lote, durante uma análise, e da média de três lotes de formulação.

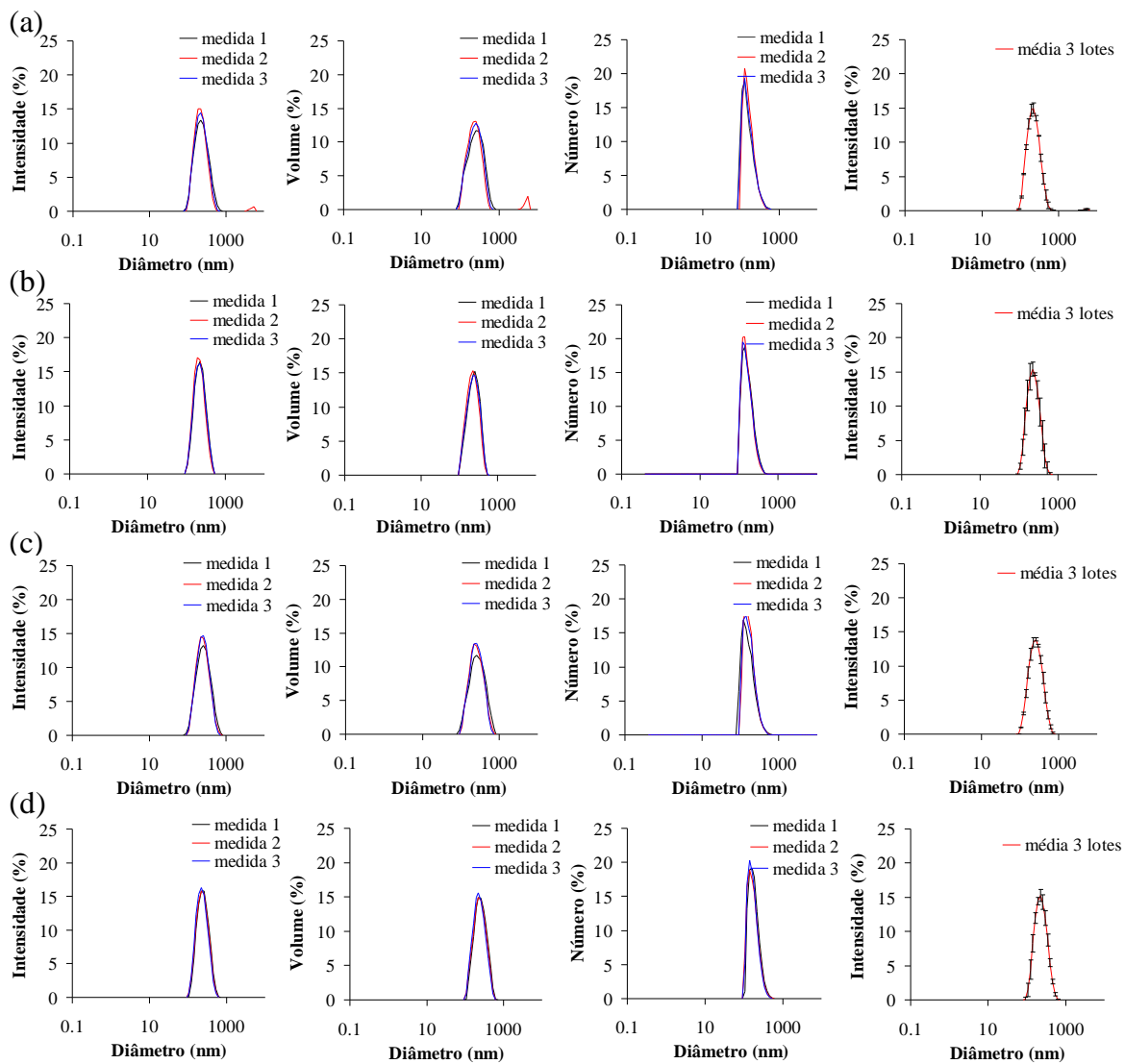


Figura 6. Gráficos de distribuição de diâmetro por intensidade (%), volume (%) e número (%) de três medidas de um lote e Gráficos de distribuição de diâmetro por intensidade da média de três lotes (último gráfico da direita) das formulações de NCL (a) NCL_F , (b) NCL_0 e de NC (c) NC_F , (d) NC_0 .

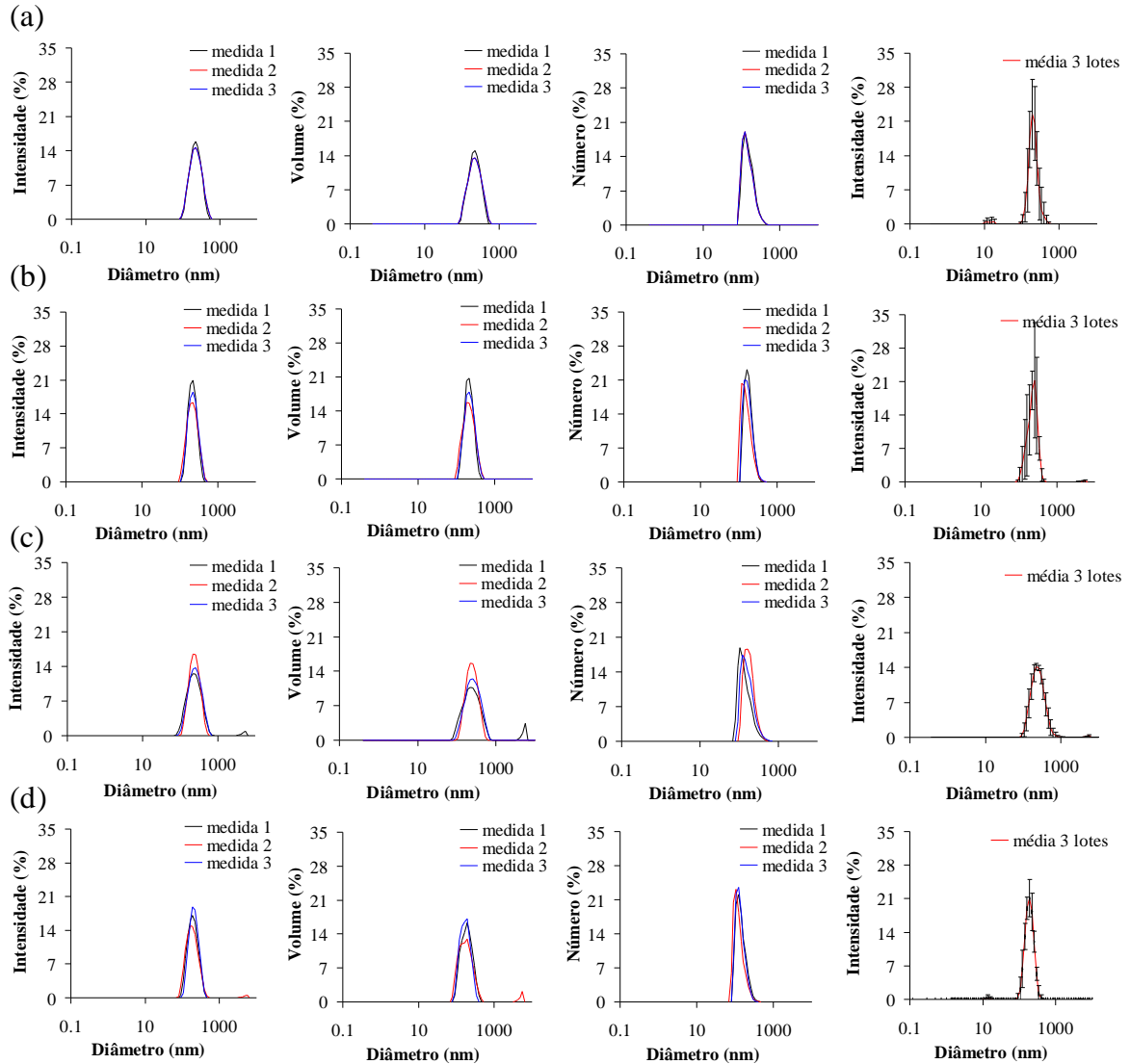


Figura 7. Gráficos de distribuição de diâmetro por intensidade (%), volume (%) e número (%) de três medidas de um lote e Gráficos de distribuição de diâmetro por intensidade da média de três lotes (último gráfico da direita) das formulações de NEL (a) NEL_F e (b) NEL_0 e de NE (c) NE_F e (d) NE_0 .

Para as formulações de nanocápsulas (NC) e nanocápsulas de núcleo lipídico (NCL), Figura 6, pode-se observar que as diferentes medidas de um mesmo lote mantiveram o mesmo perfil unimodal, com máximos de intensidade (%), volume (%) e número (%) similares e com mesmo valor de diâmetro entre cada medida. Os resultados demonstram que tanto as suspensões de NC quanto de NCL são colóides cineticamente estáveis não havendo trocas de massas entre as partículas durante a medida realizada (7 varreduras de 10 segundos cada) em temperatura ambiente, logo

após o preparo das formulações. Os gráficos representando a média de três lotes mostraram a excelente reprodutibilidade do método de preparação desses sistemas.

Para as formulações de nanoemulsão (NE) e de nanoemulsão lipídica (NEL), também foi observado um perfil unimodal para as diferentes medidas de um mesmo lote (Figura 7). Entretanto, em relação aos valores de intensidade (%), volume (%) e número (%), observa-se que, embora o mesmo valor de diâmetro pareça ser responsável pelo valor máximo de cada medida, esses não apresentam valores máximos (%) similares independente da composição da formulação. Embora exista diluição do sistema para análise, tais resultados indicam uma maior variação na obtenção dos sistemas emulsionados sem a presença de polímero (NEL e NE). Os gráficos de diâmetro em função da intensidade de luz espalhada (%) representando a média de três lotes mostraram desvios-padrão maiores do que aqueles observados para os sistemas NC e NCL. Esses resultados mostraram que a reprodutibilidade na obtenção de diferentes lotes das NE e das NEL é menor do que a reprodutibilidade entre lotes na obtenção das NC e NCL. Adicionalmente, os dados corroboram achados anteriores de que a presença da parede polimérica em NC e NCL aumenta a estabilidade dos colóides quando comparados, respectivamente, com NE (CALVO e col., 1996) e NEL (JÄGER e col., 2007; JÄGER e col., 2009).

5.3 Medidas de tensão superficial e de viscosidade

Estudos que investigaram quais as características do sistema têm maior influência sobre suas propriedades termodinâmicas apontaram para o diâmetro das partículas/gotículas. Esses estudos indicaram que partículas maiores são mais propensas a fenômenos de aumento de tamanho de partícula (DALE e col., 2005; DALE e col., 2006).

Conforme os resultados de difração de laser mostraram, exceto para a formulação NC_F , cuja formulação correspondente (NE_F) apresentou valores mais elevados de tamanho médio, as formulações de NCL (NCL_F e NCL_0) e a formulação

NC₀ apresentaram valores de tamanho médio ligeiramente superiores aos das suas formulações de nanoemulsão correspondentes, NEL_F, NEL₀ e NE₀, respectivamente.

Sabe-se que o diâmetro final de partícula/gotícula pode estar relacionado com os valores da tensão superficial e viscosidade das fases orgânica e aquosa empregadas nas preparações dos colóides (MOSQUEIRA e col., 2000; PELTONEN e col., 2002; GALINDO-RODRÍGUES e col., 2004). Assim, para investigar as diferenças nos valores de tamanho médio encontradas entre formulações de NCL e NC em relação às formulações de NEL e NE, medidas de tensão superficial e viscosidade das fases orgânicas foram realizadas (Tabela 6). Os valores de tensão superficial ($39,940 \pm 1,962 \text{ mN m}^{-1}$) e viscosidade ($1,04 \pm 0,04 \text{ mPa s}^{-1}$) das fases aquosas são iguais para todas as formulações, uma vez que a mesma composição de fase aquosa foi utilizada para seu preparo.

Tabela 6. Tensão superficial e viscosidade das fases orgânicas das formulações de NCL, NC, NEL e NE. n=3.*

| Formulação | Tensão superficial (mN m^{-1}) | Viscosidade (mPa s^{-1}) |
|------------------|---|-------------------------------------|
| NCL _F | $23,269 \pm 0,047$ | $0,41 \pm 0,03$ |
| NCL ₀ | $23,273 \pm 0,023$ | $0,40 \pm 0,03$ |
| NC _F | $23,215 \pm 0,018$ | $0,40 \pm 0,01$ |
| NC ₀ | $23,232 \pm 0,042$ | $0,38 \pm 0,03$ |
| NEL _F | $23,155 \pm 0,008$ | $0,36 \pm 0,03$ |
| NEL ₀ | $23,172 \pm 0,002$ | $0,35 \pm 0,04$ |
| NE _F | $23,180 \pm 0,017$ | $0,37 \pm 0,04$ |
| NE ₀ | $23,105 \pm 0,058$ | $0,33 \pm 0,01$ |

* Teste-t entre formulações com e sem fosfatidilcolina ou monoestearato de sorbitano e entre nanocápsulas e nanoemulsões correspondentes. ANOVA One-Way para comparações de todas as formulações de nanocápsulas ou de nanoemulsões. $\alpha=0.05$.

Exceto para NC_F e NE_F , as quais não apresentaram diferenças significativas entre si ($P > 0,05$), os valores de tensão superficial foram maiores para as fases orgânicas das formulações de NCL e NC em comparação as fases orgânicas das formulações de NEL e NE correspondentes ($P < 0,05$) (Tabela 6). A comparação múltipla das formulações de cada sistema coloidal não mostrou diferenças significativas ($P > 0,05$). As medidas de viscosidade também mostraram uma tendência a valores mais elevados para as fases orgânicas das formulações de NCL e NC do que para as fases orgânicas das formulações de NEL e NE correspondentes (Tabela 6). Dessa forma, os valores de tamanho médio mais elevados observados para formulações de NCL (NCL_F e NCL_0) em relação à NEL (NEL_F e NEL_0), de NC_0 em relação à NE_0 , assim como de NE_F em relação à NC_0 , mostraram que, para os métodos de preparo utilizados neste trabalho (deposição interfacial de polímero pré-formado e emulsificação espontânea), existe relação entre as propriedades da solução inicial (tensão superficial e viscosidade) e o diâmetro da dispersão final.

Um trabalho anterior havia sugerido que quanto maior a viscosidade da fase orgânica utilizada para preparar nanopartículas por deposição interfacial de polímero pré-formado, maior o diâmetro da partícula final (PELTONEN e col., 2002). Outros trabalhos mostraram que quanto maior a tensão superficial da fase orgânica utilizada para preparar partículas por emulsificação-difusão (POLETTO e col., 2008b; POLETTO e col., 2009) e que quanto maior a tensão superficial e viscosidade da fase orgânica utilizada para preparar partículas por emulsificação-difusão ou por *salting-out* (considerando a mesma fase aquosa) (GALINDO-RODRÍGUES e col., 2004) maior será o diâmetro da partícula/gotícula. Dessa forma, nossos resultados, que mostraram que quanto maior a viscosidade e tensão superficial da fase orgânica, maior o tamanho médio de partícula/gota, estão de acordo com a literatura.

Embora fosse esperado que quanto maior a concentração de tensoativos, menor fosse a tensão superficial do sistema e maior a viscosidade, não foram estabelecidas diferenças significativas entre as séries de cada sistema. Uma hipótese para justificar o resultado é de que a natureza química dos tensoativos é diferente e assim somente a

presença ou não do polímero influenciou significativamente a variação de tensão superficial e de viscosidade.

5.4 Concentração de partículas/gotículas e área total

Outra característica dos sistemas que pode estar relacionada com suas propriedades termodinâmicas é a concentração de partículas da fase dispersa (DALE e col., 2005; DALE e col., 2006). Assim, a determinação da concentração de partículas/gotículas, ou seja, do número de partículas (N) por cm^3 , e da área total do sistema, foi realizada, como uma caracterização adicional, para verificar se a composição da formulação pode estar relacionada com tais valores e, portanto, com as características finais de estabilidade do sistema. A Tabela 7 mostra os valores de N e área total dos sistemas.

Tabela 7. Valores de N e área total do sistema para formulações de NCL, NC, NEL e NE. $n=3$.*

| Formulação | $N \text{ cm}^{-3} (\cdot 10^{12})$ | Área total (cm^2) ($\cdot 10^3$) |
|------------------|-------------------------------------|---|
| NCL _F | $7,06 \pm 0,16^{a**}$ | $9,41 \pm 2,16$ |
| NCL ₀ | $5,93 \pm 0,16^b$ | $8,66 \pm 2,32$ |
| NC _F | $3,98 \pm 0,13^d$ | $6,96 \pm 2,31$ |
| NC ₀ | $5,37 \pm 0,20^c$ | $7,86 \pm 2,87$ |
| NEL _F | $5,11 \pm 0,65^{ab}$ | $6,81 \pm 0,86$ |
| NEL ₀ | $4,68 \pm 0,10^c$ | $6,98 \pm 1,55$ |
| NE _F | $3,27 \pm 0,53^d$ | $5,06 \pm 0,82$ |
| NE ₀ | $6,59 \pm 0,27^a$ | $6,12 \pm 2,51$ |

* Teste-t entre formulações com e sem fosfatidilcolina ou monoestearato de sorbitano e entre nanocápsulas e nanoemulsões correspondentes. ANOVA One-Way para comparações de todas as formulações de nanocápsulas ou de nanoemulsões. $\alpha=0.05$.

** Letras diferentes indicam significância estatística (Teste-Tukey para comparações múltiplas de amostras com diferença significativa entre as médias).

As formulações de NCL (NCL_F e NCL₀) apresentaram maiores valores de N e de área total do que as formulações de NC (NC_F e NC₀) ($P < 0,05$). A mesma relação ($P < 0,05$) foi observada comparando os valores de N e de área total das formulações de NEL (NEL_F e NEL₀) em relação às formulações de NE (NE_F e NE₀).

Considerando cada sistema coloidal (NCL, NC e NEL, NE), as formulações NC_F e NE_F foram as que apresentaram os menores valores de N e área total. Isso seria justificado pela tendência de maiores valores de diâmetro médio que essas formulações apresentaram.

A maior concentração de partículas e/ou área total para as formulações NCL e NEL, ou seja, que contêm monoestearato de sorbitano estaria relacionada com o fato de esse componente encontrar-se disperso no núcleo oleoso de TCC das partículas/gotículas (MÜLLER e col., 2001; POHLMANN e col., 2002; CRUZ e col., 2006b; JÄGER e col., 2009). O volume ocupado pela massa de monoestearato de sorbitano resulta na formação de um maior N , aumentando a área total do sistema. Dessa forma, os resultados podem indicar que o monoestearato de sorbitano encontra-se, pelo menos em parte, disperso no núcleo dos sistemas de NCL e NEL preparados no presente trabalho (constituído por uma mistura de TCC e MCO). Por outro lado, este aumento do N nas formulações contendo monoestearato de sorbitano (NCL e NEL) também pode indicar a formação de outros tipos de partículas, como nanodispersão (estruturas micelares). Um estudo anterior demonstrou que o aumento da concentração de lipídio sólido na formulação leva à formação de nanodispersões desse lipídio concomitantemente com nanocápsulas de núcleo lipídico (JÄGER e col., 2009).

5.5 Calorimetria Exploratória Diferencial

MÜLLER e colaboradores (2001), através de calorimetria exploratória diferencial, verificaram que o monoestearato de sorbitano encontrasse dissolvido no núcleo, o qual formado pela mistura de triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico,

das nanocápsulas de PCL, pois o pico de fusão referente ao monoestearato de sorbitano não é observado nas curvas de DSC de amostras das nanocápsulas.

No presente trabalho, foi utilizada uma mistura entre o filtro solar metoxicinamato de octila e a mistura de triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico. Dessa forma, a análise de DSC foi realizada com o objetivo de determinar as alterações nas propriedades físicas e energéticas dos materiais (PCL, MCO, fosfatidilcolina, monoestearato de sorbitano) quando organizados nos sistemas nanoestruturados de NCL e NC contendo essa mistura como núcleo. Essa análise não foi feita para as formulações de NEL e NE, pois a alteração das propriedades de deformação segundo a presença de monoestearato de sorbitano somente será feita para as formulações de NCL e de NC.

A Figura 8 mostra as curvas de DSC referente ao primeiro ciclo, de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, para as amostras de referência [matérias-primas: fosfatidilcolina (Lipoid 100), polímero (PCL), monoestearato de sorbitano e MCO] e das formulações de NC e de NCL preparadas. A Tabela 8 mostra os valores de temperaturas de fusão ou cristalização, T_m e T_c , respectivamente, e de entalpias de fusão ou cristalização, ΔH_m e ΔH_c , respectivamente, obtidos para as amostras analisadas.

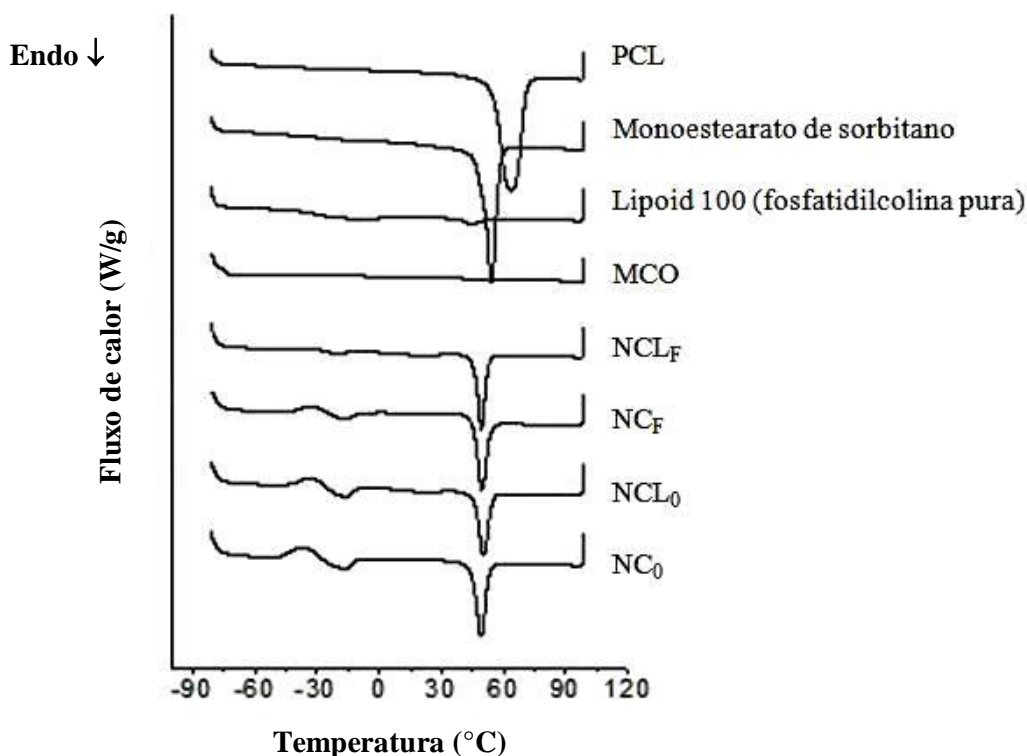


Figura 8. Curvas de DSC de fluxo de calor (W/g) em função da temperatura (°C) referente ao primeiro ciclo endotérmico (de aquecimento) das matérias-primas e das formulações de NC e de NCL.

Analisando a Figura 8, os valores de T_m e ΔH_m , respectivamente, durante o primeiro ciclo de aquecimento para as referências foram 65 °C e 108,10 J/g (PCL), 55 °C e 72,47 J/g (monoestearato de sorbitano) e 46 °C e 4,56 J/g (fosfatidilcolina). Não foi observada T_g durante esse primeiro ciclo de aquecimento para a PCL (matéria-prima). A PCL é um polímero semi-cristalino, que apresenta T_m ao redor de 60 °C, em um primeiro ciclo de aquecimento, e T_g somente observada em um segundo ciclo de aquecimento, ao redor de -60 °C (VOGELSANGER e col., 2003; BARBANTI e col., 2006). Para a fosfatidilcolina pura, uma transição a -36 °C foi observada. Observa-se ocorrência de cristalização-fusão (pico 1 do ciclo 1) nas amostras de NC e de NCL em torno de -15 °C, sendo mais pronunciado nas formulações NC₀ e NCL₀ (Figura 8). A ocorrência de um pico de fusão precedida de cristalização em torno de -15 °C para as

NC e NCL, demonstra a mistura de MCO e TCC na mesma estrutura, pois o triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico normalmente apresenta esse pico por volta de 0 °C (MÜLLER e col., 2001).

Adicionalmente, um pico endotérmico por volta de 50 °C, cuja ΔH_m ficou próxima a 30 J/g, o qual se mostra referente ao polímero, foi determinado para as formulações de NCL e NC (Tabela 8). A formação de um filme de dimensões nanométricas na interface partícula/água levou à diminuição da cristalinidade da PCL. O fato de o pico de fusão referente ao monoestearato de sorbitano não ser observado nas formulações de NCL e de NC sugerindo que este se encontra dissolvido no núcleo das partículas.

Tabela 8. Temperaturas de fusão [T_m (°C)] e cristalização [T_c (°C)] e entalpias de fusão [ΔH_m (J/g)] e cristalização [ΔH_c (J/g)] obtidas por análise de DSC durante os ciclos de aquecimento (ciclo 1 e 2) e resfriamento (ciclo 1) para as amostras de NCL e NC e para as amostras de referência [PCL, monoestearato de sorbitano (MS), fosfatidilcolina (F) e MCO].

| Amostra | Ciclo 1 (Endo) | | | | Ciclo 1 (Exo) | | Ciclo 2 (Endo) | | | |
|------------------|------------------------------|--------------|----------------|--------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|-------|--------------|
| | Pico 1 (cristalização-fusão) | | Pico 2 (fusão) | | | | | | | |
| | T_c | ΔH_c | T_m | ΔH_m | T_m | ΔH_m | T_c | ΔH_c | T_m | ΔH_m |
| PCL | - | - | - | - | 64,77 | 108,10 | 28,43 | 59,35 | 56,93 | 59,14 |
| MS | - | - | - | - | 55,13 | 72,47 | 48,10 | 74,31 | 53,90 | 71,82 |
| F | - | - | - | - | 45,70 | 4,56 | - | - | - | - |
| MCO | - | - | -69,84 | 0,45 | - | - | - | - | - | - |
| NCL _F | -30,58 | 0,76 | -18,09 | 1,07 | 50,37 | 28,04 | 10,65 | 23,38 | 47,33 | 20,26 |
| NCL ₀ | -32,09 | 6,56 | -14,55 | 6,25 | 51,56 | 29,69 | 12,28 | 26,51 | 48,02 | 21,11 |
| NC _F | -31,28 | 4,32 | -13,74 | 4,46 | 50,60 | 31,63 | 8,96 | 21,94 | 47,37 | 23,51 |
| NC ₀ | -35,37 | 9,90 | -14,36 | 8,57 | 50,49 | 32,77 | 8,54 | 24,17 | 47,15 | 26,70 |

5.6 Análises de espalhamento múltiplo de luz

5.6.1 Perfis de BS

Para acessar dados cinéticos de estabilidade física dos sistemas coloidais como a tendência de sedimentação, cremagem, floculação e/ou coalescência dos sistemas, perfis de BS foram obtidos (Figura 9). Tais perfis são apresentados referentes a um período de 10 h a temperatura constante de 25 °C. Os valores de BS foram determinados como a variação do BS (ΔBS) em relação à primeira varredura em função do tempo, uma vez que a transmissão foi nula.

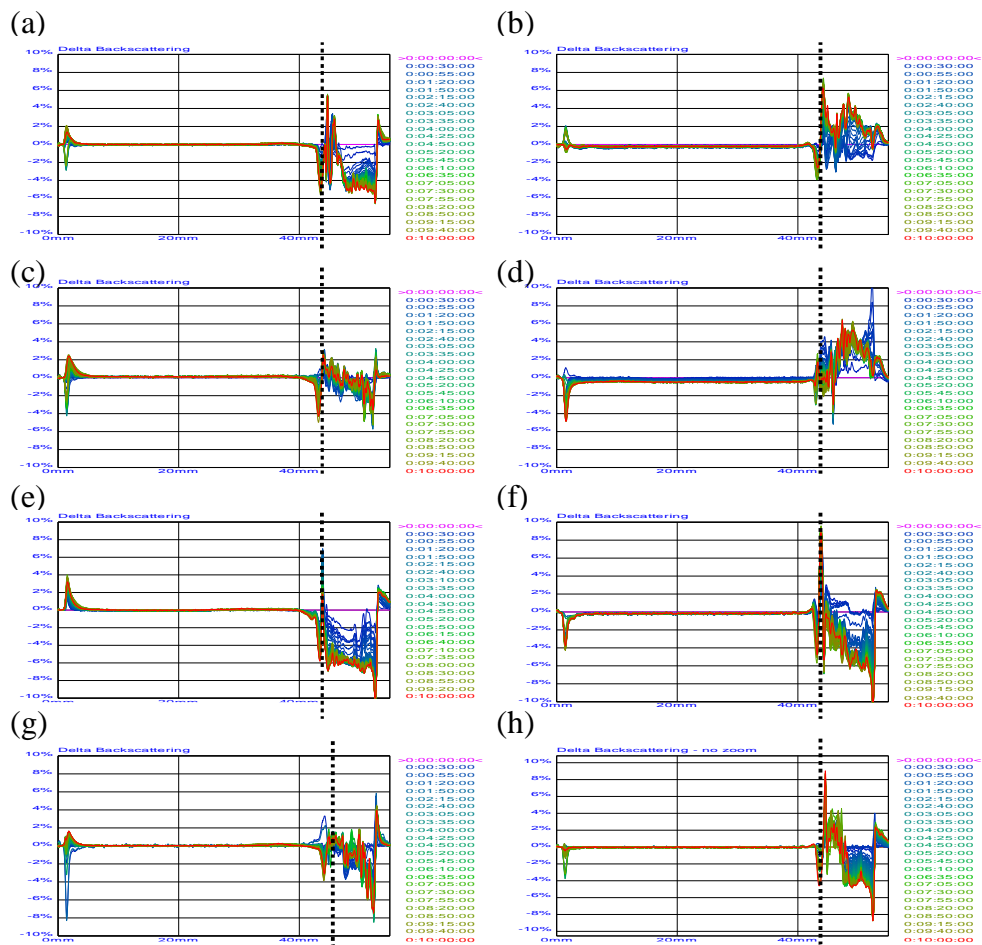


Figura 9. Perfis (um lote) de ΔBS referentes a 10 h de análise (25 °C) para as formulações (a) NCL_F, (b) NEL_F, (c) NCL₀, (d) NEL₀, (e) NC_F, (f) NE_F, (g) NC₀ e (h) NE₀. O eixo horizontal representa a altura (mm) da cubeta. A linha vertical pontilhada representa o menisco da amostra.

Não foram observadas variações consideráveis do sinal de BS no centro dos perfis de ΔBS das formulações de NC e de NCL durante o período do experimento. Por outro lado, para as formulações de NE e de NEL, com exceção de NE_0 , uma leve redução desse sinal no centro das amostras foi observada. Embora essa leve redução não tenha sido muito considerável (CÉLIA e col., 2009), ela sugere que as formulações de NE e NEL têm maior tendência a fenômenos de variação de tamanho de partícula do que as de NC e de NCL.

Para as formulações de NC e de NCL, uma redução do sinal do BS no topo da cubeta foi observada. Por outro lado, para as formulações de nanoemulsão, embora uma redução do sinal de BS tenha sido observada no fundo da amostra, não foi possível visualizar uma tendência única e clara de migração das partículas. A redução do sinal é um indicativo de clarificação na região (MENGUAL e col., 1999a). Assim, esses resultados podem ser explicados pela densidade dos colóides em comparação com a densidade da fase contínua. As nanocápsulas (utilizando NC_0 como exemplo) têm densidade teórica de $1,047 \text{ g cm}^{-3}$, assim elas têm a tendência de sedimentação. Em paralelo, as gotas das nanoemulsões (utilizando NE_0 como exemplo) têm densidade teórica ($1,014 \text{ g cm}^{-3}$) mais próxima da densidade da fase contínua aquosa ($\sim 1,000 \text{ g cm}^{-3}$).

Considerando a nanoescala, os fenômenos de migração e, principalmente, de variação de tamanho de partículas não foram evidentes durante o período de análise. Esses colóides parecem ser cineticamente estáveis por pelo menos 15 dias a uma temperatura ambiente, o que será demonstrado a seguir nos resultados de difração de laser em função do tempo e foi demonstrado para formulações similares na literatura (CALVO e col., 1996; WULFF-PÉREZ e col., 2009).

5.6.2 Método EML-TV

A tendência de fenômenos de variação do número de partículas, seja por processos de coalescência ou de floculação, pode ser determinada através de

parâmetros termodinâmicos das formulações (DALE e col., 2005; DALE e col., 2006). Tais fenômenos de interação interpartícula podem ser acelerados por mudanças na temperatura.

Considerando que o valor BS está relacionado com o tamanho das partículas/gotas (MENGUAL e col., 1999a), a fim de estabelecer uma ordem de estabilidade das formulações coloidais, foi proposto um método inovador, o espalhamento múltiplo de luz em temperatura variável (EML-TV), para a determinação da variação de entalpia padrão e da variação de entropia padrão de sistemas dispersos líquidos ou semi-sólidos. Para isso, o experimento de espalhamento múltiplo de luz foi realizado em um gradiente de temperatura e foi utilizado para determinar a estabilidade física relativa dos sistemas coloidais.

O aumento da temperatura causou um decréscimo uniforme nos valores de BS em todo o centro das amostras. Os valores de BS do ponto central da cubeta (20 mm) foram selecionados para as observações de variação do diâmetro médio aparente de partícula gotícula com o aumento da temperatura.

Para essa análise, a formulação NE_{TCC} foi usada como modelo devido ser necessário uma composição mais simplificada (fase interna formada apenas de TCC e fase externa formada de água e polissorbato 80) para as correções de índice de refração em cada temperatura (Tabela 9). Tal formulação apresentou valores de diâmetro médio, por PCS, de 184 ± 9 nm, PDI de $0,09 \pm 0,08$ e potencial zeta de $-8,68 \pm 0,41$ mV.

Tabela 9. Valores de índice de refração determinados para o TCC e para a fase aquosa das formulações (água MilliQ[®] e polissorbato 80) em diferentes temperaturas.

| T (°C) | Fase dispersa | Fase dispersante |
|--------|---------------|------------------|
| 25 | 1,444 | 1,328 |
| 35 | 1,441 | 1,327 |
| 43 | 1,437 | 1,326 |
| 50 | 1,432 | 1,323 |

Os valores de diâmetro durante a elevação de temperatura foram calculados utilizando o software do equipamento considerando o sinal de *BS*, a fração volumétrica da fase dispersa (1,69%) e os índices de refração, das fases dispersa e dispersante, em cada temperatura (Figura 10).

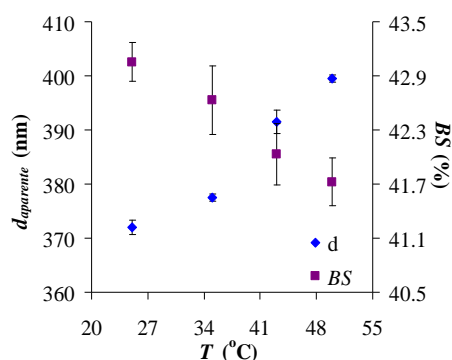


Figura 10. Relação entre *BS* e Diâmetro médio aparente em função da Temperatura (°C) na análise de EML-TV. n=3.

Os resultados mostraram que o aumento gradual da temperatura induz um aumento linear do diâmetro médio aparente de partícula/gota, o qual foi refletido pela diminuição linear dos sinais de *BS* ($r > 0,99$). Esse resultado indica que está ocorrendo uma redução do número de partícula/gota no sistema.

5.6.2.1 Determinação de parâmetros termodinâmicos

5.6.2.1.1 Determinação de parâmetros termodinâmicos: diagramas de van't Hoff

Considerando um processo termodinâmico durante a análise de espalhamento múltiplo de luz empregando um gradiente de temperatura, o sinal de BS na temperatura inicial (BS_i) e o sinal de BS na temperatura subsequente (BS_n) seriam o estado inicial e final, respectivamente, de uma tendência de redução do número de partícula/gota dependente do aumento da temperatura (Figura 11). A constante de equilíbrio final K_f para esse processo seria formada por diferentes constantes de equilíbrio aparentes $K_{i \rightarrow j}$, onde i indica ao estado inicial e j o final, que englobariam, entre outras características do processo, a variação do N de partículas/gotas e a distribuição do tamanho dos agregados em N . Porém, a determinação de $K_{i \rightarrow j}$ para o equacionamento detalhado de K_f é complexa e não será abordada para essa análise experimental. Dessa forma, foi estabelecida uma constante de equilíbrio relativa K_{rel} para o processo, a qual seria dada pela Equação 20.

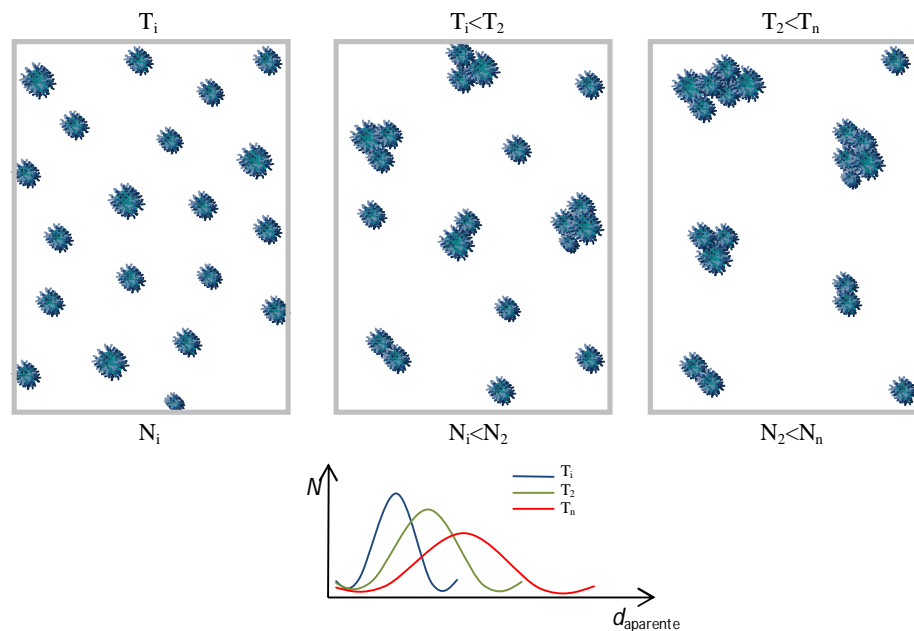


Figura 11. Esquema do processo de redução do número de partículas/gotas (N) induzido pelo aumento de temperatura (T) e da distribuição do diâmetro médio aparente em N .

$$K_{rel} = \frac{N_n}{N_i} = \frac{BS_n}{BS_i}$$

(Equação 20)

onde N_i e N_n correspondem ao número de partículas/gotas na temperatura inicial e final, respectivamente. A equação de van't Hoff (Equação 21) correlaciona a mudança de K em função da variação da temperatura.

$$\ln K = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

(Equação 21)

onde ΔH° (J mol^{-1}) e ΔS° ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) são a variação de entalpia e a variação de entropia nas condições padrão, T (K) é a temperatura absoluta e R ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) é a constante universal dos gases. Portanto, substituindo-se a Equação 20 na Equação 21, obtêm-se a Equação 22 para a construção dos diagramas de van't Hoff (Figura 12).

$$\ln\left(\frac{BS_n}{BS_i}\right) = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

(Equação 22)

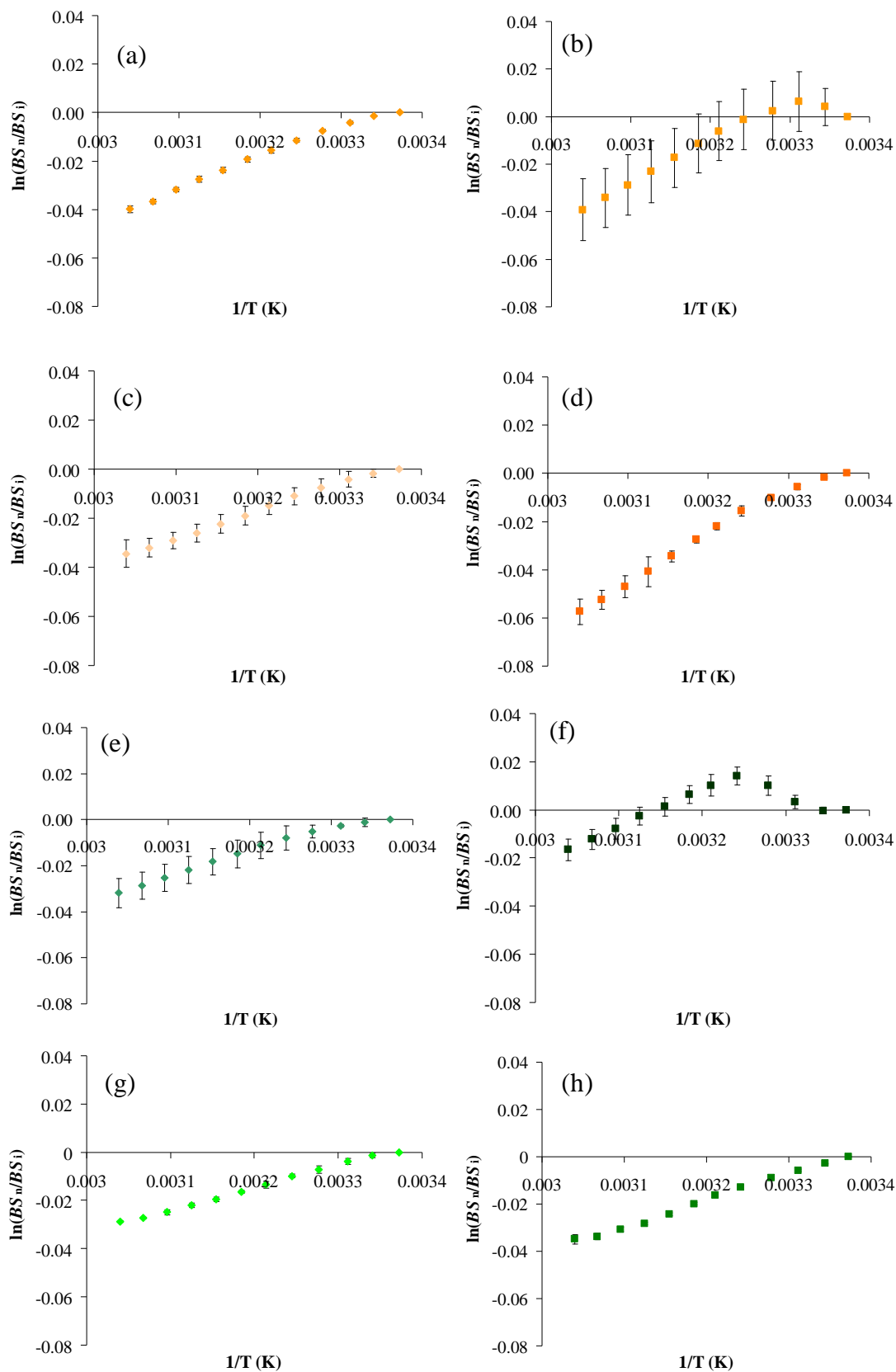


Figura 12. Diagramas de van't Hoff para as formulações de (a) NCL_F , (b) NEL_F , (c) NC_F , (d) NE_F , (e) NCL_0 , (f) NEL_0 , (g) NC_0 e (h) NE_0 . $n=3$.

Esses diagramas demonstraram que os valores de $\ln(BS_n/BS_i)$ diminuíram com o aumento de T para quase todas as formulações. Os valores de $K < 1$ confirmam a redução do número de partícula/gota com o aumento de T . Porém, para as formulações de NEL_F e NEL_0 , observou-se que os valores de $\ln(BS_n/BS_i)$ aumentaram ligeiramente durante a elevação inicial de T , de 296 K a 302 K, para NEL_F e de 296 K a 308 K para NEL_0 , e depois começaram a diminuir com o aumento da T . Tal fato levantou a hipótese de que mais de um fenômeno ocorre simultaneamente para essas formulações e isso poderia ser devido à mistura de partículas com diferentes características.

Assim, somente as porções lineares ($r > 0,99$) dos diagramas foram utilizadas para calcular os valores de ΔH° e ΔS° (Tabela 10). O desvio residual foi muito baixo, indicando uma boa reprodutibilidade dos dados experimentais ($P > 0,05$). A análise estatística dos valores de ΔH° e ΔS° indicou que as diferenças na média dos valores entre as formulações são maiores do que as diferenças entre os lotes de cada formulação ($P < 0,05$).

Tabela 10. Valores de ΔH° (J mol^{-1}) e ΔS° ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$). n=3.*

| Formulação | Região de temperatura (K) | ΔH° | ΔS° |
|------------------|---------------------------|---------------------------------|------------------|
| NCL _F | 296-329 | -1052,28 ± 13,52 ^{a**} | -3,52 ± 0,04 |
| NCL ₀ | 299-329 | -896,80 ± 11,67 ^c | -2,98 ± 0,05 |
| NC _F | 299-329 | -981,05 ± 15,17 ^b | -3,28 ± 0,07 |
| NC ₀ | 296-329 | -771,98 ± 10,68 ^d | -2,59 ± 0,03 |
| NEL _F | 302-329 | -1412,33 ± 23,00 ^{ab} | -4,60 ± 0,07 |
| NEL ₀ | 308-329 | -1255,16 ± 85,00 ^{bc} | -3,95 ± 0,28 |
| NE _F | 299-329 | -1571,96 ± 123,65 ^a | -5,24 ± 0,41 |
| NE ₀ | 299-329 | -944,47 ± 20,88 ^d | -3,17 ± 0,07 |

* Teste-t entre formulações de com e sem fosfatidilcolina ou monoestearato de sorbitano e entre nanocápsulas e nanoemulsões correspondentes. ANOVA One-Way para comparações de todas as formulações de nanocápsulas ou de nanoemulsões. $\alpha=0.05$.

** Letras diferentes indicam significância estatística (Teste-Tukey para comparações múltiplas de amostras com diferença significativa entre as médias).

Os valores negativos de ΔH° e negativos e de baixa magnitude de ΔS° indicaram que o processo de redução do número de partículas é entalpicamente favorável e entropicamente desfavorável. Este resultado está de acordo com um estudo anterior, o qual determinou a ΔH de um processo de agregação de nanopartículas de poliestireno utilizando microcalorimetria (JODÁR-REYES e col., 2001). A redução da entropia do sistema é esperada, pois a agregação leva à diminuição de entropia pela diminuição do número de partículas no sistema.

5.6.2.1.2 Determinação de parâmetros termodinâmicos: reversibilidade do processo

A fim de verificar se o processo investigado era reversível ou irreversível, a análise de EML-TV foi aplicada para a formulação NC₀ com aquecimento e

resfriamento subsequente do sistema. Os valores de $\ln(BS_n/BS_i)$ em função de $1/T$ foram plotados tanto para o aumento (296-329 K) quanto para a redução da temperatura (329-296 K) (Figura 13).

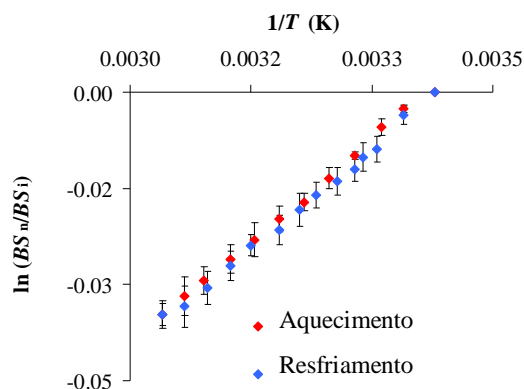


Figura 13. Diagramas de van't Hoff obtidos pelo aquecimento e pelo resfriamento da formulação NC₀. n=3.

Esses diagramas não mostram histerese, ou seja, a seqüência de valores obtidos com o resfriamento passou sobre a seqüência de dados obtidos pelo aumento de temperatura, indicando a reversibilidade do processo. Assim, pode-se concluir que se trata de um fenômeno de floculação reversível. Ainda, este resultado indicou que o método desenvolvido não destruiu a condição inicial do sistema, o que permite, do ponto de vista físico, que a formulação seja reutilizada após análise.

5.6.2.1.3 Determinação de parâmetros termodinâmicos: espontaneidade do processo

Para avaliar a espontaneidade do processo, os valores de ΔG_{floc} foram obtidos a partir da lei clássica da termodinâmica com a equação de *Gibbs* (Equação 14, p. 34) e plotados em função da temperatura (Figura 14).

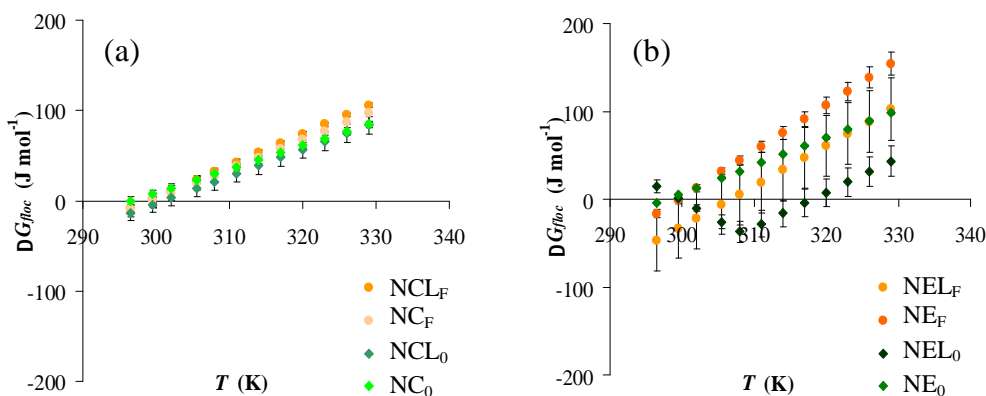


Figura 14. Valores de ΔG_{floc} (J mol^{-1}) plotados em função da temperatura (K) para as formulações (a) de NCL e de NC e (b) de NEL e de NE. $n=3$.

Os gráficos de ΔG_{floc} versus T mostraram inicialmente valores negativos, os quais, durante o aquecimento, tornaram-se positivos. Para as formulações NCL e NC, as temperaturas nas quais essa transição ocorreu foram $298,94 \pm 0,78$ K (NCL_F), $300,96 \pm 3,02$ K (NCL_0), $299,43 \pm 2,42$ K (NC_F) e $296,53 \pm 1,62$ K (NC_0). Entretanto, para as formulações NEL e NE as temperaturas nas quais essa transição ocorreu foram um pouco maiores, sendo $306,87 \pm 7,45$ K (NEL_F), $318,11 \pm 4,09$ K (NEL_0), $299,61 \pm 0,76$ K (NE_F) e $297,94 \pm 0,15$ K (NE_0).

Essa mudança indica que a tendência à floculação é espontânea e entálpicamente governada em baixas temperaturas e, que com o aumento da temperatura, o processo passa a não espontâneo devido a predominância do termo entrópico ($T \cdot \Delta S_{floc}^o$) sob o entálpico (ΔH_{floc}^o) (KUBUROVIC e col., 2002). Tal fato está de acordo com o princípio de *Le Chatelier*, o qual diz que, para um processo exotérmico, o aquecimento favorece o deslocamento do equilíbrio na direção em que o processo é endotérmico (NETZ e GONZÁLEZ ORTEGA, 2002).

Outra observação feita durante esta análise foi que a temperatura de transição, dos valores negativos para positivos de ΔG_{floc} , foi maior para as formulações de NEL, especialmente, para a formulação NEL_0 . Essas formulações haviam apresentado um diagrama de van't Hoff diferenciado das outras formulações. Dessa forma, foi reforçada a hipótese levantada anteriormente de que mais de um fenômeno ocorre

nestas formulações e que isso poderia estar relacionado com a mistura de partículas de diferentes características físico-químicas.

Dessa forma, considerando os menores valores de ΔH_{floc}° (em módulo) como indicativos de uma maior estabilidade do sistema, Figura 15, verificasse que as formulações de NC e NCL apresentaram valores de ΔH_{floc}° menores do que as formulações de NE e NEL correspondentes. Ou seja, as formulações de NC e de NCL são mais estáveis do que as formulações de NE e de NEL correspondentes.

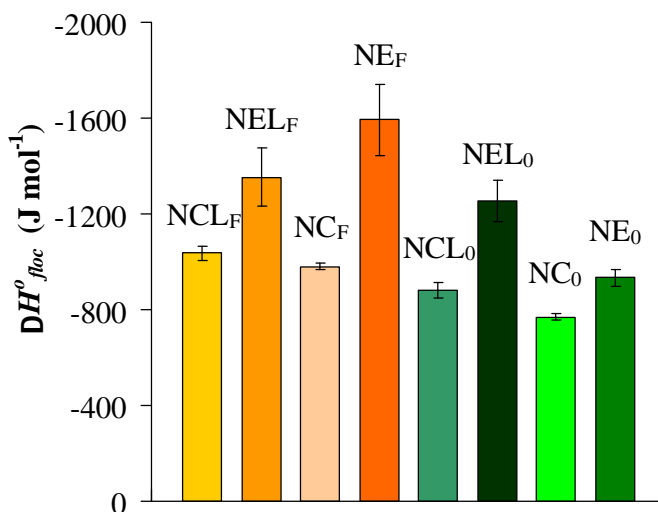


Figura 15. Valores de ΔH_{floc}° para as formulações de NCL, NC, NEL e de NE. n=3.

Ao estabelecer uma ordem dos valores de ΔH_{floc}° para os sistemas de diferente natureza coloidal, para as formulações de NCL, NCL₀ é mais estável que NCL_F, enquanto que, para as formulações de NC, NC₀ é mais estável que NC_F. Da mesma forma, para as formulações de NEL, NEL₀ é mais estável que NEL_F e para as formulações de NE, NE₀ é mais estável que NE_F.

Os resultados de difração de laser mostraram que as formulações NE_F e NE₀ apresentaram os maiores e menores, respectivamente, valores de tamanho médio. Dessa forma, para verificar se houve relação entre tamanho médio de

partícula/gotícula e sua estabilidade termodinâmica, comparações entre essas formulações foram feitas segundo os valores de ΔH_{floc}° . A Figura 14 mostra que a formulação NE_F foi a que apresentou maiores valores de ΔH_{floc}° enquanto a formulação NE₀ apresentou os menores valores, considerando somente formulações de NEL e de NE ($P < 0,05$). Isso mostra que houve relação entre tamanho médio e a estabilidade do sistema. Ou seja, as formulações que apresentaram os maiores valores de tamanho médio são as que têm maior tendência a floculação. O fato de as formulações de NC e de NCL se apresentarem mais estáveis do que as formulações de NE e de NEL correspondentes, embora aquelas possuam tamanho médio maior, demonstra que a presença de polímero atua reduzindo a ΔH_{floc}° do sistema. O resultado corrobora novamente com trabalhos anteriormente descritos, nos quais modelos da estrutura supramolecular de NC e NCL foram propostos (MOSQUEIRA e col., 2000; JÄGER e col., 2007; POLETTTO e col., 2008a).

Para entender a estabilidade de colóides temos de considerar que o principal mecanismo pelo qual um tensoativo estabiliza uma partícula/gotícula não é a redução da tensão interfacial do sistema, mas a introdução de uma barreira mecânica para retardar a destruição do sistema (WEINER, 1996). Para as nanocápsulas, a parede polimérica age como uma barreira mecânica adicional à barreira originada pelos tensoativos fosfatidilcolina e/ou polissorbato 80 para retardar a destruição do sistema. Portanto, os resultados obtidos pela comparação de sistemas coloidais de NC ou NCL com os de NE ou NEL corroboram com estudos anteriores nos quais nanocápsulas se mostraram mais estáveis em suspensão do que nanoemulsões correspondentes (CALVO e col., 1996; SANTOS-MAGALHÃES e col., 2000; SCHAFFAZICK e col., 2007).

Sabe-se que a natureza química de um tensoativo define sua partição no sistema (MOSQUEIRA e col., 2000; POHLMANN e col., 2002; GALINDO-RODRÍGUES e col., 2004) e, conseqüentemente, a estabilidade física da formulação (FESSI e col., 1989; GUTERRES e col., 1995; MOSQUEIRA e col., 2000). Os resultados demonstraram que os sistemas preparados com fosfatidilcolina pura (um tensoativo dipolar) foram os menos estáveis e apresentaram os maiores valores de ΔH_{floc}° .

Portanto, nossos resultados reforçam estudos anteriores que mostraram que a fosfatidilcolina pura não é um bom tensoativo para estabilizar nanocápsulas (MOSQUEIRA e col., 2000). Isso mostra que, o emprego do espalhamento múltiplo de luz em temperatura variada, novo método proposto neste estudo, foi eficaz para a determinação dos parâmetros termodinâmicos dos sistemas coloidais.

Formulações contendo monoestearato de sorbitano, ou seja, nanocápsulas de núcleo lipídico (NCL) e nanoemulsões lipídicas (NEL) apresentaram maiores valores absolutos de área total do sistema em comparação às formulações de mesma natureza coloidal (NC e NE), mas preparadas sem este componente. Dessa forma, para verificar se houve relação entre os valores absolutos de área total do sistema e sua estabilidade termodinâmica, comparações entre essas formulações foram feitas segundo os valores de ΔH_{floc}° .

No sistema de NCL e NC, verificou-se que NCL_F apresentou valores de ΔH_{floc}° superiores aos da NC_F e NCL_0 apresentou valores superiores aos da NC_0 ($P < 0,05$). Ou seja, as formulações de NCL apresentaram valores de ΔH_{floc}° maiores que as formulações de NC. Por outro lado, no sistema de NEL e de NE, embora a formulação NEL_0 tenha apresentado valores de ΔH_{floc}° superiores aos da NE_0 ($P < 0,05$), não se verificou diferença entre os valores das formulações de NEL_F e os de NE_F . Tais observações mostraram que não houve relação entre os valores absolutos de área total e a estabilidade termodinâmica desses sistemas.

Portanto, verificou-se que o comportamento do sistema está relacionado com sua natureza coloidal e com a presença de tensoativos. Entretanto, observou-se que os valores de ΔH_{floc}° foram bastante afetados pelas diferenças de composição dos sistemas (polímero e tipo de tensoativo). Assim, uma análise mais aprofundada sobre o efeito desses componentes foi realizada.

5.7 Experimento de delineamento fatorial

Um desenho fatorial 2^3 foi usado para uma análise mais abrangente dos resultados, avaliando-se o efeito da parede polimérica (X_1) e dos tensoativos: fosfatidilcolina pura (X_2) e monoestearato de sorbitano (X_3), bem como suas interações, sobre os valores de ΔH°_{floc} .

ANOVA foi utilizada para avaliar a significância estatística desses efeitos, bem como de suas interações. Esta significância (com 95% de intervalo de confiança) é representada pela linha vertical exposta no gráfico de Pareto, o qual mostra também a magnitude e a direção, em uma ordem de classificação, dos efeitos padronizados dos fatores sobre os valores da variável resposta (ΔH°_{floc}) (Figura 16). A análise estatística Durbin-Watson foi utilizada para examinar os valores residuais quanto à ordem de execuções experimentais e não indicou correlação de série significativa ($P=0,230$).

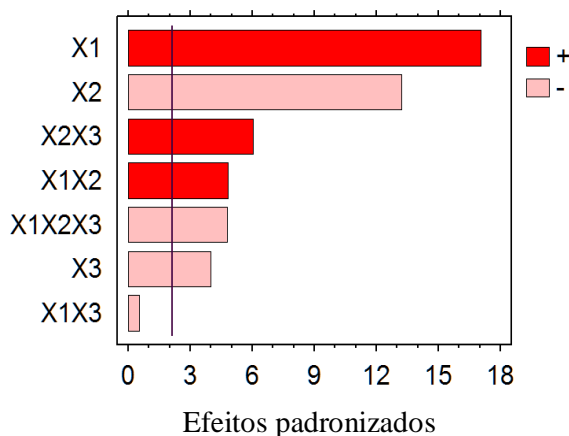


Figura 16. Gráfico de Pareto mostrando a magnitude e a direção dos efeitos das variáveis: parede polimérica (X_1), fosfatidilcolina pura (X_2) e monoestearato de sorbitano (X_3) e suas interações sobre os valores de ΔH°_{floc} .

A partir do gráfico de Pareto pode-se observar que as variáveis X_1 e X_2 , ou seja, a parede polimérica e a fosfatidilcolina pura, são os fatores críticos para a resposta final. A parede polimérica tem efeito positivo sobre os valores de ΔH°_{floc} , reduzindo (em módulo) esses valores (que são negativos), e, portanto, aumenta a estabilidade do

sistema. Por outro lado, a fosfatidilcolina e o monoestearato de sorbitano (X_3) causam efeito negativo sobre os valores de ΔH_{floc}° , aumentando (em módulo) esses valores, e, dessa forma, reduzem a estabilidade do sistema. Entretanto, embora o monoestearato de sorbitano tenha mostrado efeito negativo, a interação entre ele e fosfatidilcolina mostrou, na ausência da parede polimérica, um efeito positivo, indicando um efeito sinérgico sobre a redução (em módulo) dos valores de ΔH_{floc}° e conseqüentemente no aumento da estabilidade do sistema. Não foi encontrada interação X_1X_3 ($\alpha=0,05$). Tais informações indicam que o monoestearato de sorbitano parece não apresentar efeito sobre os valores de ΔH_{floc}° e, desta forma, a estabilidade do sistema.

A relação entre os valores de ΔH_{floc}° observados e preditos pela regressão linear (Tabela 11) mostraram um bom ajuste aos dados visto que o coeficiente de determinação ajustado para os graus de liberdade (R_{aj}^2) foi de 96,45%. A análise estatística dos valores de resposta, em termos de padrão residual (probabilidade normal), também foi realizada e demonstrou que os dados são normalmente distribuídos (Figura 17).

Tabela 11. Valores de efeitos estimados e padronizados dos fatores e de suas interações sobre a variável resposta (ΔH_{floc}°) e significância estatística (valores de P) do delineamento fatorial.

| Fatores | Efeito estimado | Efeito padronizado | Coeficiente de regressão | P |
|-------------|---------------------|--------------------|--------------------------|--------|
| Constante | - | - | -1110,75 | - |
| X_1 | $370,45 \pm 45,13$ | 17,48 | 185,22 | 0 |
| X_2 | $-287,30 \pm 45,13$ | -13,58 | -143,65 | 0 |
| X_3 | $-86,78 \pm 45,13$ | -4,10 | -43,39 | 0,0013 |
| X_1X_2 | $105,03 \pm 45,13$ | 4,95 | 52,51 | 0,0003 |
| X_2X_3 | $130,98 \pm 45,13$ | 6,20 | 65,49 | 0 |
| $X_1X_2X_3$ | $-104,18 \pm 45,13$ | -4,93 | -52,09 | 0,0003 |

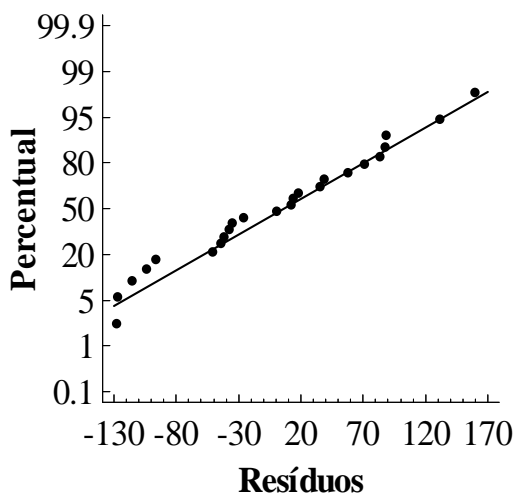


Figura 17. Gráfico de probabilidade normal dos resíduos.

Observando a equação obtida por regressão linear dos dados do delineamento fatorial 2^3 , Equação 23, verifica-se que existe uma constante, cujo coeficiente de regressão é $-1110,75 \text{ J mol}^{-1}$ e valores de coeficiente de regressão dos fatores e de suas interações. Tais valores nos mostram o quanto os fatores vão modificar o valor desta constante, quando estiverem ou não presentes, resultando em maiores ou menores valores de ΔH_{floc}° .

$$\Delta H_{floc}^\circ = -1110,75 + (185,23 \cdot X_1) - (143,65 \cdot X_2) - (43,39 \cdot X_3) + (52,51 \cdot X_1 \cdot X_2) + (65,49 \cdot X_2 \cdot X_3) - (52,09 \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot X_3)$$

(Equação 23)

Uma formulação NCL contendo 50% da concentração de monoestearato de sorbitano foi preparada (NCL_{0,50}) e analisada pelo método EML-TV para obter os valores de ΔH_{floc}° . O valor previsto pela equação do modelo de regressão linear foi $-810,58 \text{ J mol}^{-1}$ enquanto que o valor experimental foi $-834,39 \text{ J mol}^{-1}$. Esse resultado indicou que o modelo de regressão foi preditivo já que o valor obtido experimentalmente foi semelhante ao previsto pelo modelo.

Portanto, com os dados e informações obtidos até o momento é possível ordenar as formulações de NCL, NC e de NEL, NE segundo os valores de ΔH_{floc}° . Essa ordem, dos maiores para os menores valores de ΔH_{floc}° seria:

$$NCL_F > NC_F > NCL_0 > NC_0$$

e

$$NE_F > NEL_F > NEL_0 > NE_0$$

Conforme discutido anteriormente, tal ordem parece ter relação com a estabilidade do sistema, pois se sabe que as formulações de nanocápsulas com fosfatidilcolina provavelmente são mais instáveis (apresentaram maiores valores de ΔH_{floc}°) do que aquelas sem este componente e, o mesmo ocorreria para as nanoemulsões. Também é possível dizer que nanocápsulas são mais estáveis que suas nanoemulsões correspondentes.

Entretanto, não é possível classificar todas as formulações e dizer quais seriam estáveis e quais seriam instáveis. Se fossemos considerar o valor da constante obtida na equação de regressão linear do modelo fatorial que considera os três fatores como o valor termodinâmico que nos daria esta informação, ao ordenar todas as formulações segundo os valores de ΔH_{floc}° teríamos que as formulações de NCL e de NC com fosfatidilcolina seriam mais estáveis do que quase todas as formulações de NEL e de NE, inclusive NEL_0 , que não tem este componente, pois apresentaram valores de ΔH_{floc}° menores do que $-1110,75 \text{ J mol}^{-1}$.

Conforme mencionado anteriormente, dados da literatura mostram que fosfatidilcolina não é um bom tensoativo para estabilizar o sistema de nanocápsulas (MOSQUEIRA e col., 2000). Dessa forma, tal classificação não é coerente. Sistemas com natureza coloidal diferente devem ter limites de estabilidade diferentes, pois a energia necessária para manter um sistema polimérico e um não-polimérico difere.

Portanto, um delineamento fatorial 2^2 foi realizado para os sistemas NCL e NC e outro para os sistemas NEL e NE. A regressão linear dos dados de ambos os

delineamentos mostrou um bom ajuste ($R^2_{aj} = 99,16\%$ para NCL e NC e $R^2_{aj} = 94,35\%$ para NEL e NE). Entretanto, observa-se que as equações obtidas para cada sistema, Equação 24 (NCL e NC) e Equação 25 (NEL e NE), possuem valores de constante diferentes. A equação 24 apresentou uma constante de $-925,53 \text{ J mol}^{-1}$, enquanto que este valor foi de $-1295,98 \text{ J mol}^{-1}$ para a equação 25.

$$\Delta H^\circ_{floc} = -925,53 - (91,14 \cdot X_2) - (49,01 \cdot X_3) + (13,40 \cdot X_2 \cdot X_3)$$

(Equação 24)

$$\Delta H^\circ_{floc} = -1295,98 - 196,16 \cdot X_2 - 37,77 \cdot X_3 + 117,58 \cdot X_2 \cdot X_3$$

(Equação 25)

Ao utilizar os valores dessas constantes, cada qual para seu sistema, como o valor que limitaria entre a estabilidade ou instabilidade termodinâmica, poderíamos, considerando somente as diferenças entre os valores de ΔH°_{floc} que se mostraram estatisticamente significativas, ordenar todas as formulações e classificá-las quanto à sua estabilidade. Ao fazer isso teríamos que as formulações preparadas com fosfatidilcolina são mais instáveis do que as formulações preparadas sem esse componente. Portanto, as formulações NEL_0 e NE_0 são mais estáveis do que as formulações NCL_F e NC_F . A classificação de todas as formulações em ordem crescente de estabilidade termodinâmica seria:

$$NE_F < NEL_F < NC_F < NCL_F < NEL_0 < NE_0 < NCL_0 < NC_0.$$

Comparando os valores de obtidos pelo método EML-TV e os valores previstos pelas equações obtidas pelos diferentes delineamentos, observa-se que os valores obtidos e os previstos pelas três equações foram similares mostrando que qualquer das equações poderia ser utilizada para a previsão dos valores (Tabela 12). Entretanto, somente a equação do fatorial 2^3 engloba os três fatores.

Tabela 12. Valores experimentais obtidos pelo método EML-TV e valores previstos pelas equações de regressão dos modelos fatoriais. Os gráficos de contorno obtidos encontram-se em anexo (ANEXO 2).

| Formulação | Valores | | | |
|---------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Experimentais | | Calculados | |
| | ΔH°_{floc} | ΔH°_{floc} | ΔH°_{floc} | ΔH°_{floc} |
| NCL _F | -1052,28 ± 13,52 | -1046.66 ± 47,54 | -1052.29 ± 6,70 | - |
| NCL ₀ | -896,80 ± 11,67 | -986.68 ± 47,54 | -896.79 ± 6,70 | - |
| NC _F | -981,05 ± 15,17 | -891.18 ± 47,54 | -981.07 ± 6,70 | - |
| NC ₀ | -771,98 ± 10,68 | -777.60 ± 47,54 | -771.96 ± 6,70 | - |
| NEL _F | -1412,33 ± 23,00 | -1417.94 ± 47,54 | - | -1412.33 ± 39,74 |
| NEL ₀ | -1255,16 ± 85,00 | -1566.32 ± 47,54 | - | -1255.17 ± 39,74 |
| NE _F | -1571,96 ± 123,65 | -1260.78 ± 47,54 | - | -1571.96 ± 39,74 |
| NE ₀ | -944,47 ± 20,88 | -938.84 ± 47,54 | - | -944.47 ± 39,74 |
| NCL ₀₋₅₀ | -810.58 | -834.39 ± 47,54 | -834.37 | - |

Com isso, conclui-se que a parede polimérica apresenta-se como o fator essencial para a estabilidade do sistema. Entretanto, a presença concomitante de alguns componentes, no caso a fosfatidilcolina, pode comprometer essa estabilidade. Dessa forma, para comparar sistemas com diferente natureza coloidal, quando mais de um fator é alterado, o valor que determina a estabilidade termodinâmica de cada sistema deve ser considerado.

5.8 Estudos de densidade

Recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma formulação com composição “otimizada” para reduzir a formação de outras partículas, de diferente

organização estrutural, no preparo de suspensões de nanocápsulas (JÄGER, 2008). A mistura de diferentes partículas, como nanocápsulas e nanoemulsões, prejudicaria a análise do efeito da parede polimérica na estabilidade física do sistema. Dessa forma, as concentrações de componente oleoso e de monoestearato de sorbitano utilizadas para preparar as formulações do presente trabalho foram reduzidas a metade das usualmente empregadas. Assim, para identificar a presença de outras estruturas, a densidade das partículas/gotículas das formulações foi analisada através de gradiente de sílica coloidal formado após centrifugação isopínica.

Ainda, durante o desenvolvimento do método EML-TV, verificou-se que a relação entre o logaritmo natural da constante de equilíbrio e a temperatura no diagrama de van't Hoff da formulação NEL₀ mostrou mudança de inclinação durante a elevação da temperatura. Ainda, observou-se que essa formulação apresentou a transição dos valores de ΔG_{floc} negativos para positivos em função do aumento de temperatura somente em temperaturas maiores. Dessa forma, a hipótese de que diferentes fenômenos ocorrem simultaneamente nessa formulação devido à mistura de partículas com características termodinâmicas diferentes, foi levantada. Para verificar a validade dessa hipótese, estudos de gradiente de densidade foram realizados. Formulações de nanoesferas, lipossomas e nanodispersão foram preparados para fins comparativos. A Figura 18 mostra uma imagem ilustrativa da posição das bandas de densidade dessas formulações e também a posição das bandas e valores de densidade dos marcadores (beads).

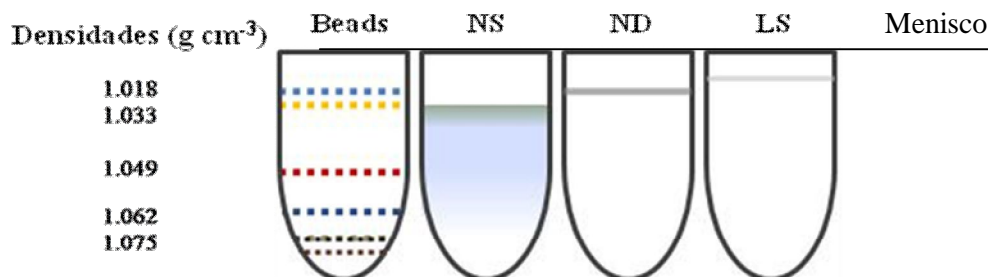


Figura 18. Valores de densidade dos marcadores (Beads) e Ilustração das bandas de densidade para as formulações de nanoesferas (NS), nanodispersão (ND) e lipossomas (LS). O menisco, nestas ilustrações, é representado pelo topo do tubo. Os valores de densidade de cada formulação encontram-se me anexo (ANEXO 3).

As partículas de nanoesferas, lipossomas e nanodispersão apresentaram valores de densidade de $1,035 \text{ g cm}^{-3}$ a $1,091 \text{ g cm}^{-3}$, $1,022 \text{ g cm}^{-3}$, e $1,024 \text{ g cm}^{-3}$, respectivamente. Os estudos de densidade das formulações de NCL, NC e NEL e NE mostraram a presença de uma única faixa de densidade para esses sistemas, exceto para a formulação NEL_0 (Figura 19), para a qual duas bandas foram claramente visualizadas.

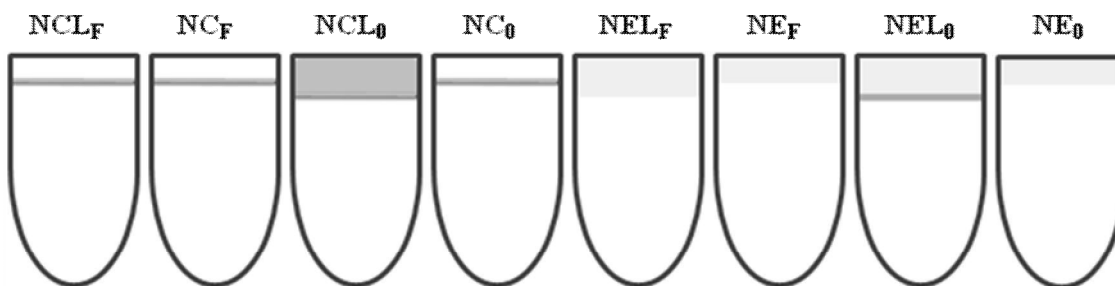


Figura 19. Ilustração das bandas de densidade para as formulações de nanocápsulas e nanoemulsões. O menisco, nestas ilustrações, é representado pelo topo do tubo. Os valores de densidade de cada formulação encontram-se me anexo (ANEXO 3).

Para a formulação NEL_0 , a banda que mostrou densidades de $1,013 \text{ g cm}^{-3}$ a $1,022 \text{ g cm}^{-3}$ refere-se a nanoemulsão lipídica. A segunda faixa, localizada logo abaixo, é referente à nanodispersão ($1,024 \text{ g cm}^{-3}$) conforme demonstrado anteriormente (POHLMANN e col., 2008). Como nanodispersão é um sistema

altamente dinâmico (RIEGER, 1996), as estruturas desse sistema podem desintegrar e reformular aleatoriamente e constantemente. Assim, a hipótese de que a formulação NEL_0 é composta por uma mistura de partículas parece válida.

Ao contrário das outras formulações de NCL e NC, que apresentaram banda estreita de densidade, a formulação NCL_0 apresentou uma banda alargada, que foi de $1,013 \text{ g cm}^{-3}$ a $1,026 \text{ g cm}^{-3}$. A formulação NEL_0 apresentou intervalo de densidade de $1,013 \text{ g cm}^{-3}$ a $1,024 \text{ g cm}^{-3}$ enquanto a formulação NE_0 apresentou densidade entre $1,013 \text{ g cm}^{-3}$ a $1,022 \text{ g cm}^{-3}$. Desse modo, sugere-se a presença de gotículas de NEL_0 concomitantemente às nanocápsulas de núcleo lipídico na formulação NCL_0 .

Outra observação é de que as amostras das formulações contendo monoestearato de sorbitano (considerando as formulações que apresentaram banda única) mostraram-se mais densas do que as sem este componente. O fato das formulações contendo fosfatidilcolina não terem mostrado claramente mais do que uma banda de densidade não descarta a possibilidade de mistura de partículas para estas formulações, pois os lipossomas, que poderiam ser apresentados para esta formulação, devido à presença de fosfatidilcolina, apresentaram valor de densidade sobreposto aos apresentados por estas formulações. Dessa forma, o aumento do número de partículas pela presença de lipossomas não pode ser descartado.

5.9 Validação do método EML-TV

Para validar o método desenvolvido, um estudo da estabilidade física em tempo real foi feito para determinar uma ordem de estabilidade das formulações e compará-la a ordem obtida pelo ordenamento dos valores de ΔH_{floc}° . Dessa forma, as formulações foram analisadas por difração de laser, observação macroscópica e espalhamento múltiplo de luz, logo após o preparo e durante ou após um determinado período de armazenamento.

Adicionalmente, para verificar se estaria havendo alguma relação entre estabilidade química e física, os valores de teor, expresso em percentual de MCO e de pH foram acompanhados durante 90 dias de armazenamento das formulações.

5.9.1 Difração de laser

Essa técnica foi utilizada para determinar os valores de tamanho médio e de SPAN e para avaliar a distribuição de tamanho das formulações.

Os valores de tamanho médio (Figura 20) e de SPAN (Tabela 13), obtidos por difração de laser, foram acompanhados durante um período de 90 dias. A análise dos valores de tamanho médio mostrou que, após 45 dias, os valores de tamanho médio aumentaram, principalmente para as formulações contendo fosfatidilcolina ($P < 0,05$).

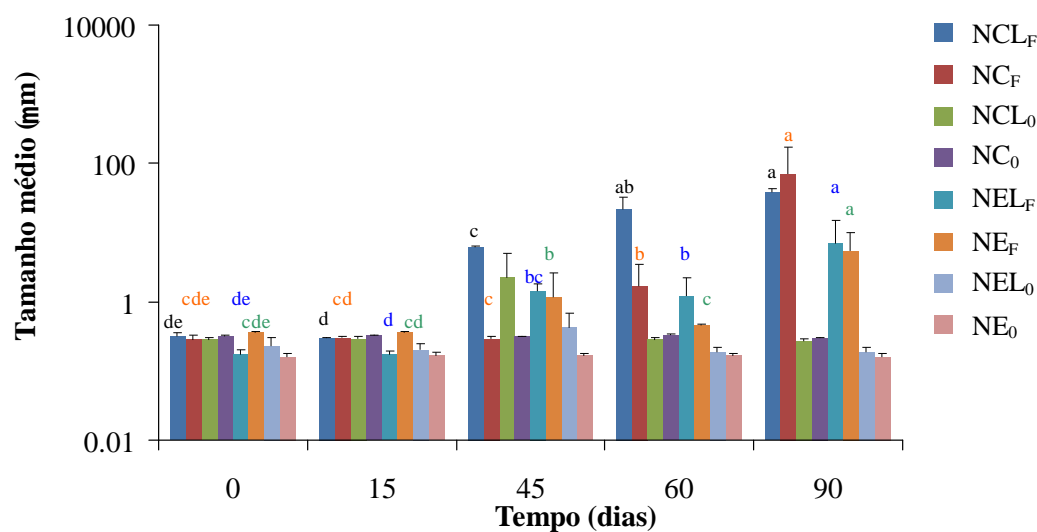


Figura 20. Gráfico mostrando o acompanhamento do valor de tamanho médio de partícula (μm) em função do tempo (dias) para as formulações de NCL, NC, NEL e NE.

* ANOVA One-Way para comparações de todas as formulações de nanocápsulas ou de nanoemulsões. $\alpha=0,05$.

** Letras diferentes indicam significância estatística (Teste-Tukey para comparações múltiplas de amostras com diferença significativa entre as médias).

Comparando NCL e NEL, observa-se que não houve variações nos valores de tamanho médio para as formulações NCL₀ e NEL₀ durante os 90 dias de análise, enquanto para ambas as formulações NCL_F e NEL_F esses valores de tamanho médio começaram a aumentar após 45 dias. Por outro lado, comparando NC e NE, não se observaram variações dos valores de tamanho médio para as formulações NC₀ e NE₀, enquanto que para as formulações NC_F e NE_F, um aumento dos valores foi observado após 45 dias para NE_F e somente após 60 dias para NC_F. Ainda, os valores de SPAN aumentaram, especialmente, para NCL_F e NE_F.

Tabela 13. Valores de SPAN em função do tempo (90 dias) para as formulações de NCL, NC, NEL e NE.*

| Formulação | Tempo (dias) | | | | |
|------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | 0 | 15 | 45 | 60 | 90 |
| NCL _F | 1,34 ± 0,17 ^{de} | 16,41 ± 21,55 ^d | 23,76 ± 2,98 ^c | 38,19 ± 32,92 ^{ab} | 11,24 ± 12,34 ^a |
| NCL ₀ | 1,26 ± 0,13 | 1,15 ± 0,17 | 1,31 ± 0,04 | 1,31 ± 2,75 | 1,42 ± 0,07 |
| NC _F | 1,34 ± 0,01 ^{cde} | 1,17 ± 0,18 ^{cd} | 1,89 ± 29,65 ^c | 23,54 ± 16,04 ^b | 14,04 ± 0,59 ^a |
| NC ₀ | 1,14 ± 0,07 | 1,16 ± 0,14 | 1,31 ± 0,01 | 1,31 ± 0,13 | 1,28 ± 0,01 |
| NEL _F | 1,44 ± 0,09 ^{de} | 1,55 ± 0,24 ^d | 2,00 ± 0,36 ^{bc} | 2,00 ± 0,14 ^b | 3,77 ± 1,65 ^a |
| NEL ₀ | 1,30 ± 0,36 | 1,47 ± 0,11 | 3,12 ± 0,28 | 1,55 ± 0,07 | 1,55 ± 0,14 |
| NE _F | 0,81 ± 0,06 ^{cde} | 0,83 ± 0,05 ^{cd} | 3,60 ± 1,41 ^b | 3,77 ± 0,86 ^c | 19,59 ± 14,46 ^a |
| NE ₀ | 1,50 ± 0,12 | 1,52 ± 0,13 | 1,54 ± 0,02 | 1,48 ± 0,14 | 1,46 ± 0,14 |

* Teste-t entre formulações de com e sem fosfatidilcolina ou monoestearato de sorbitano e entre nanocápsulas e nanoemulsões correspondentes. ANOVA One-Way para comparações de todas as formulações de nanocápsulas ou de nanoemulsões. $\alpha=0.05$.

** Letras diferentes indicam significância estatística (Teste-Tukey para comparações múltiplas de amostras com diferença significativa entre as médias).

O acompanhamento dos valores de SPAN para NCL e NC em função do tempo mostrou que tais valores tendem a aumentar após 45 dias, especialmente para as

formulações contendo fosfatidilcolina (NCL_F e NC_F). Em paralelo, o mesmo é observado para as formulações de NEL e NE contendo fosfatidilcolina (NEL_F e NE_F).

Análise de distribuição de tamanho em volume (%) das formulações foi realizada após cinco meses (150 dias) de armazenamento e comparada com a obtida logo após seu preparo (Figura 21). As formulações foram analisadas após este período para que os fenômenos de instabilidade pudessem ser mais claramente visualizados.

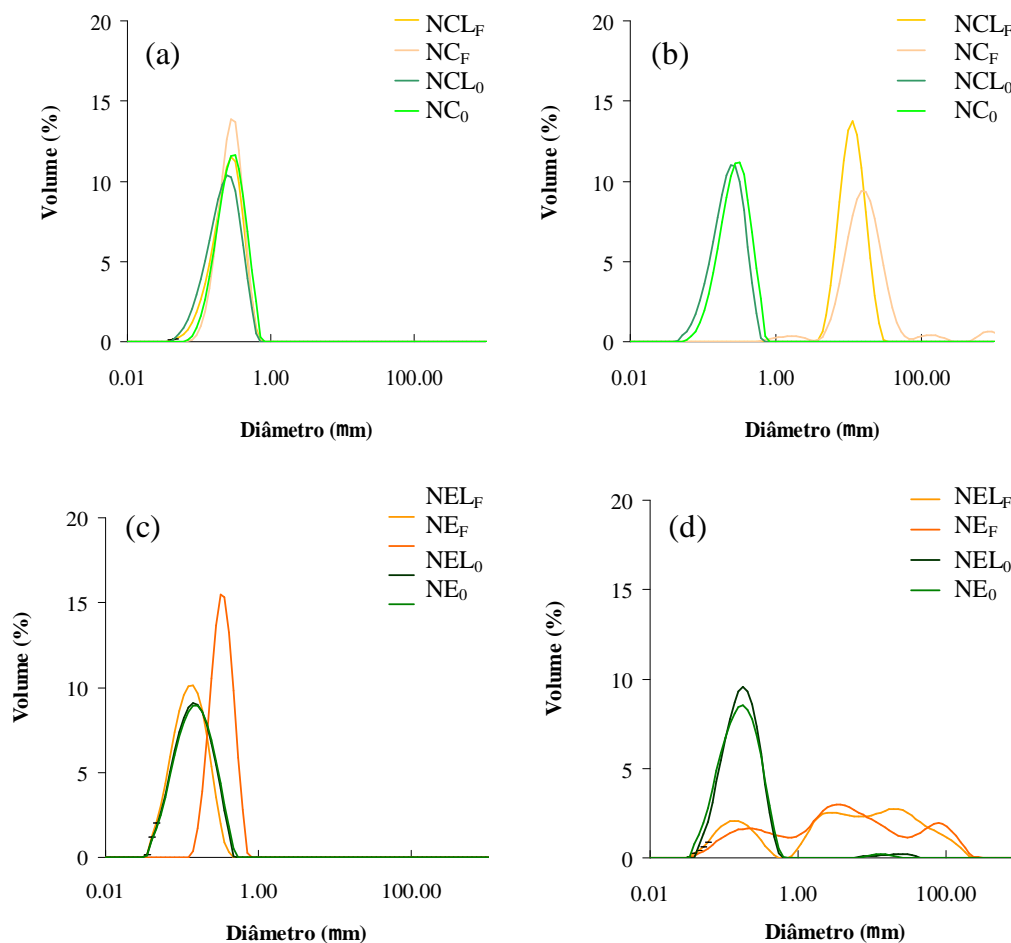


Figura 21. Gráficos das distribuições de diâmetro (μm) em volume obtidos por difração de laser para as formulações de NCL e NC (a) após o preparo e (b) após cinco meses de armazenamento e de NEL e NE (c) após o preparo e (d) após cinco meses de armazenamento.

Para as formulações NCL e NC, é observado nos gráficos das distribuições de tamanho, antes e após o armazenamento, que ocorrem mudanças da escala nanométrica para micrométrica nas formulações contendo fosfatidilcolina (NCL_F e NC_F). O mesmo é observado para as formulações NEL e NE antes e após o armazenamento.

Comparando as formulações de NCL e NC (NCL_F e NC_F) e NEL e NE (NEL_F e NE_F) contendo fosfatidilcolina, é possível observar que as formulações NCL_F e NC_F ainda apresentaram distribuição monomodal após 5 meses de armazenamento. O mesmo não foi verificado para as formulações NEL_F e NE_F para as quais distribuições polimodais são visualizadas.

5.9.2 Observação macroscópica

Análise quanto ao aspecto visual das formulações, foi realizada para as suspensões de NCL e NC após cinco meses de armazenamento (Figura 22). Essa análise somente foi realizada para as formulações de NCL e NC, pois, devido à diferença de densidade entre as fases dispersa e dispersante, conforme já demonstrado nos perfis de ΔBS (25 °C, 10 h), os fenômenos podem ser melhor visualizados para esse sistema.

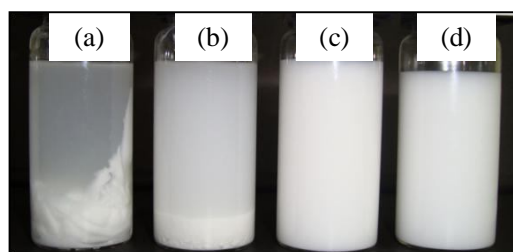


Figura 22. Análise visual das formulações NCL e NC após cinco meses (150 dias) de armazenamento, onde (a) NCL_F , (b) NC_F , (c) NCL_0 e (d) NC_0 .

A imagem possibilitou claramente visualizar que apenas as formulações contendo fosfatidilcolina, NCL_F e NC_F , apresentaram fenômenos de instabilidade. Estes fenômenos são aumento do tamanho de partícula seguido de sedimentação. Além disso, é possível observar que, entre as formulações contendo esse componente, este fenômeno foi mais pronunciado para NCL_F .

5.9.3 Espalhamento múltiplo de luz

Análises de espalhamento múltiplo de luz foram realizadas em determinados intervalos durante um período de 90 dias de armazenamento das formulações.

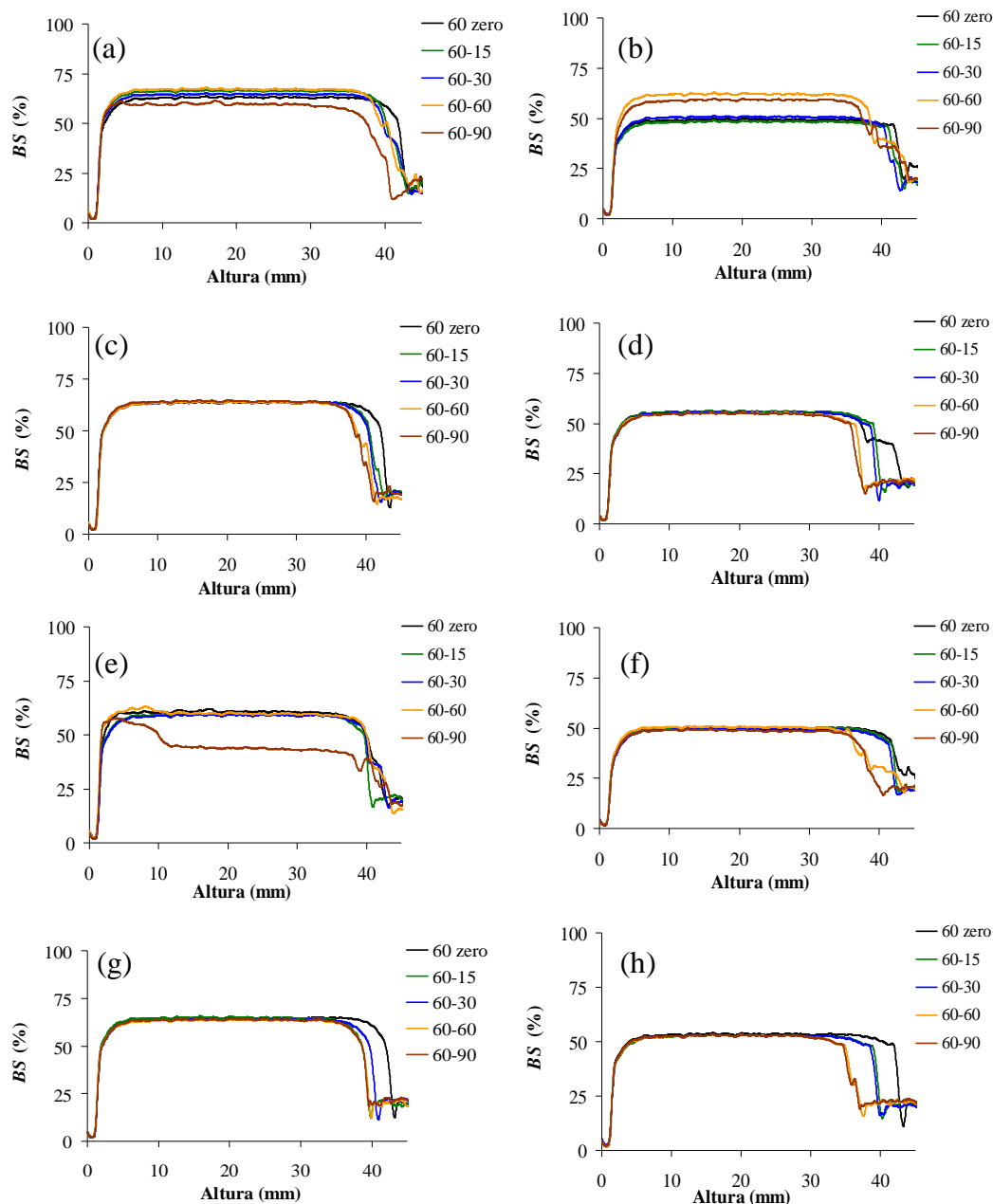


Figura 23. Relação entre a última varredura de Perfis de BS (%) versus tempo (1 h, 1 varredura a cada 5 min), realizados após 0, 15, 30, 60 e 90 dias do preparo das formulações de (a) NCL_F , (b) NEL_F , (c) NCL_0 , (d) NEL_0 , (e) NC_F , (f) NE_F , (g) NC_0 e (h) NE_0 . O menisco delimitasse ao redor de 44 mm.

Através da análise dos perfis de BS (Figura 23) observa-se que as formulações contendo fosfatidilcolina, NCL_F , NC_F , NEL_F e NE_F , apresentaram variações no centro da cubeta após 45 dias, onde, primeiramente o sinal de BS aumenta e depois diminui

em relação ao dia zero. Em temperatura constante, a redução inicial indica o aumento do tamanho de partícula ainda na ordem de nanômetros enquanto que a posterior redução indica o aumento do tamanho de partícula para a escala de micrometros (MENGUAL e col., 1999a; MENGUAL e col., 1999b). Para as outras formulações, também se observam alterações do sinal, mas somente no topo da cubeta, a partir de 45 dias. As formulações NCL₀ e NC₀ são as que tendem a apresentar menores variações no sinal de *BS*.

Assim, através dessas análises foi possível concluir, após 45 a 60 dias, que as formulações contendo fosfatidilcolina são mais instáveis. Adicionalmente, a formulação NCL_F é a mais instável entre as formulações NCL e NC e a formulação NE_F é a mais instável entre as formulações de NEL e de NE.

5.9.4 Estudos de estabilidade química

Para verificar se estaria havendo alguma relação entre a estabilidade química com a estabilidade física, o estudo da estabilidade química foi realizado segundo a variação dos valores de pH e de teor de substância ativa em função do tempo. Para isso foi necessário utilizar uma substância ativa que tivesse absorção no UV-vis (para ser quantificada), não sofresse liberação do sistema em função do tempo e que estivesse totalmente encapsulada.

Como modelo de substância ativa foi utilizado o filtro solar químico metoxicinamato de octila (MCO) que, devido ao seu aspecto e alta lipofilia, faz parte do núcleo oleoso do sistema (ALVAREZ-ROMÁN e col., 2001; ALVAREZ-ROMÁN e col., 2004; JIMENÉZ e col., 2004; WEISS-ANGELI e col., 2008). O método analítico utilizado para as determinações de teor de MCO apresentou regressão linear significativa com $r > 0,99$ ($P < 0,05$, $\alpha = 0,05$). Não ocorreram desvios da linearidade ($P > 0,05$, $\alpha = 0,05$). Os limites de detecção e quantificação foram 0,77 $\mu\text{g/mL}$ e 2,33 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A precisão intermediária e a repetibilidade mostraram valores de desvio-padrão relativo $< 5\%$. A taxa de recuperação de MCO apresentada

foi de $109,71 \pm 4,21$ % (ponto $5 \mu\text{g/mL}$), $110,72 \pm 3,01$ % (ponto $10 \mu\text{g/mL}$) e $107,14 \pm 1,67$ % (ponto $30 \mu\text{g/mL}$).

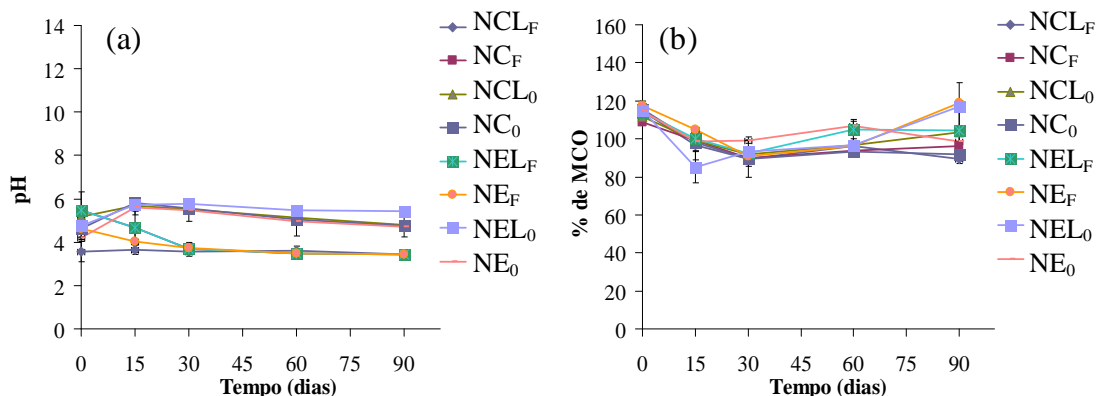


Figura 24. Medidas de (a) pH e (b) % de MCO para as formulações de NCL, NC, NEL e NE.

As medidas de pH, Figura 24a, das formulações de nanocápsulas e nanoemulsão mostraram uma leve redução dos valores, nos primeiros 15 dias, somente para as formulações NC_F, NEL_F e NE_F. Entretanto, como para as outras formulações durante toda a análise, tais valores permaneceram constantes após esse decréscimo inicial.

As medidas de % de MCO (Figura 24b) mostraram uma leve alteração dos valores comparando os valores obtidos em 0 e 90 dias ($P < 0,05$) para quase todas as formulações. Isso só não foi observado para a formulação NC₀ ($P > 0,05$). O MCO é um filtro solar químico que é sensível a luz, apresentando fotoisomerização de *E-p*-metoxicinamato de octila para *Z-p*-metoxicinamato de octila (PATTANAARGSON e LIMPHONG, 2001). Um estudo que avaliou a fotodegradação desta substância verificou que esta ocorre somente quando este é exposto à luz. Quando está protegido da luz, não apresentou degradação durante um mês de armazenamento em temperaturas de 4, 25 e 60 °C. Entretanto, uma breve exposição à luz, já foi capaz de reduzir sua absorção inicial e mostrar o acúmulo do produto de degradação (PATTANAARGSON e LIMPHONG, 2001). Portanto, a leve alteração observada

para os valores de % de MCO poderia ser devido a certo grau de degradação deste componente.

Em suma, tais resultados não indicam que existiu uma relação direta entre o início do aparecimento dos fenômenos de instabilidade física e a ocorrência de instabilidade química dos componentes da formulação.

5.9.5 Classificação das formulações

Como foi possível verificar com os resultados de estabilidade física obtidos pela análise a longo prazo, os quais são mostrados no fluxograma da Figura 25, chegar a uma ordem de estabilidade física real das formulações só foi possível através da combinação dos resultados obtidos por diferentes técnicas de análise. Ainda, foi necessário entre 90 a 150 dias para obter informações conclusivas sobre a classificação dessas formulações segundo sua estabilidade física.

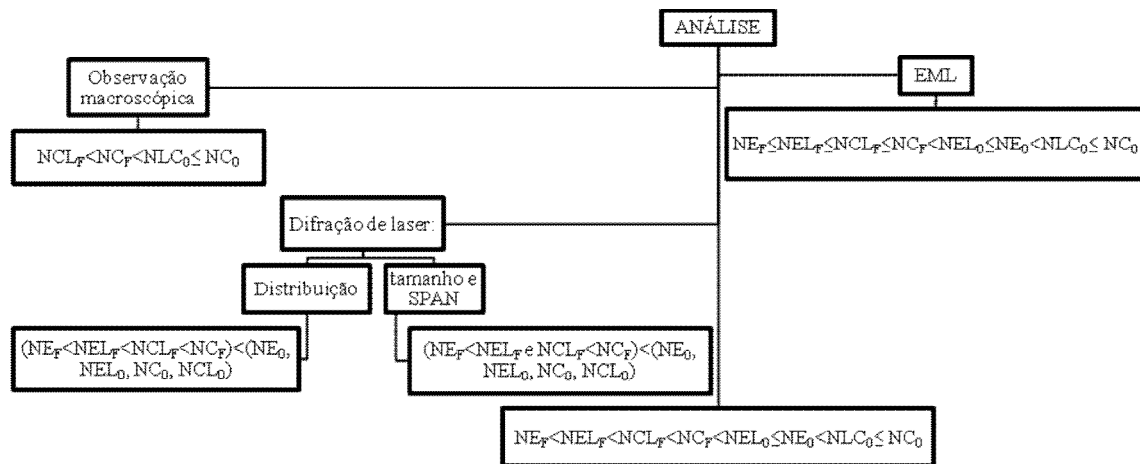


Figura 25. Ordem crescente (da esquerda para direita) de estabilidade física das formulações obtida através da combinação dos resultados da análise das formulações a longo prazo por diferentes técnicas de análise.

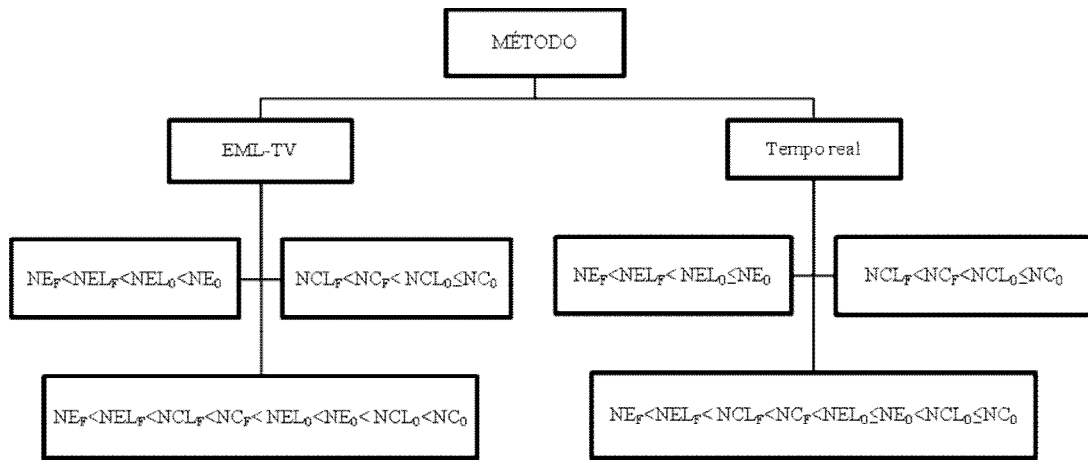


Figura 26. Ordens (crescente) de estabilidade das formulações obtidas pelo método EML-TV (através do ordenamento dos valores de ΔH°_{floc}) e pelo estudo de estabilidade em tempo real.

Colocando em ordem de estabilidade, NEL, NE, NCL, NC e os quatro sistemas juntos, foi possível verificar que a ordem de estabilidade proposta pelo método EML-TV desenvolvido, obtida através do ordenamento dos valores de ΔH°_{floc} (do maior para o menor valor em módulo, como sendo ordem crescente de estabilidade), foi a mesma que aquela determinada em tempo real (Figura 26).

Tal fato valida a utilização do método proposto como método de determinação da estabilidade inicial para a seleção de formulações com as vantagens de: não ser destrutível e manter a condição inicial do sistema (não necessita de pré-tratamento), o que possibilita que a amostra seja reutilizada; ser de extremamente rápida execução, pois sua duração é menor do que a de qualquer outra técnica conhecida; e, possibilita obter valores quantitativos para fins comparativos de estabilidade utilizando apenas uma técnica de análise.

Levando em consideração informações da literatura, a ordem de estabilidade apresentada pelas formulações era esperada. Os sistemas com fosfatidilcolina apresentaram valores de potencial zeta similares àqueles sem este componente, o que indica pouca influência do mecanismo de estabilização eletrostática nos sistemas

preparados. Essa baixa variação de potencial zeta comparada com outros relatos de nanocápsulas preparadas com tensoativos à base de fosfatidilcolina (MOSQUEIRA e col., 2000) é a diferença de pureza dessa matéria-prima. No presente estudo, foi relatado que nanocápsulas preparadas com Epikuron 200[®] (fosfatidilcolina>99%) apresentam menores valores de potencial zeta, e que assim, a estabilidade dos sistemas preparados com Epikuron 170[®] seria devido ao ácido fosfático, impureza do Epikuron 170[®], que contribui para o aumento do potencial zeta.

As estreitas distribuições de tamanho, após preparação, podem indicar que o fenômeno de *Ostwald ripening* seja bastante reduzido para os sistemas coloidais estudados. Isso sugere que não houve grande influência desse fenômeno sobre a ocorrência de fenômenos de instabilidade nas formulações.

A presença de fosfatidilcolina diminuiu a estabilidade dos sistemas. Um estudo anterior verificou, pela combinação das técnicas de gradiente de densidade e microscopia eletrônica de transmissão, que existe a presença concomitante de lipossomas quando nanocápsulas são preparadas com Epikuron 170[®] (MOSQUEIRA e col., 2000). Os estudos de gradiente de densidade realizados no presente trabalho não foram capazes de informar da presença dessas estruturas devido à sobreposição de bandas de densidade. Dessa forma, pode-se supor que lipossomas estejam presentes nas formulações preparadas com este componente e esses poderiam ser os principais responsáveis pela instabilidade dessas formulações.

Portanto, considerando os resultados apresentados, o principal mecanismo de estabilidade das formulações preparadas neste trabalho seria a repulsão estérica devido à presença de polissorbato 80 (NCL, NC, NEL e NE) (JÄGER e col., 2009), bem como a barreira mecânica introduzida pela parede polimérica (NCL e NC).

5.10 Estudo da deformação das nanocápsulas

MÜLLER e colaboradores (2001), baseados em resultados obtidos por DSC, estabeleceram um modelo de organização estrutural para nanocápsulas onde o

monoestearato de sorbitano estaria disperso no núcleo lipofílico de mistura de triacilglicerol de cadeias médias dos sistemas preparados com PCL e polissorbato 80, que estaria estabilizando essas partículas. Assim, essas nanocápsulas foram consideradas nanocápsulas de núcleo lipídico. POHLMANN e colaboradores (2002), por espectroscopia de correlação de fótons, propuseram que, no caso das nanoesferas, o monoestearato de sorbitano estaria disperso na matriz polimérica. Tais resultados foram reafirmados pelas análises de espalhamento de raios-X a baixo ângulo, realizadas por CRUZ e colaboradores (2006b), para nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão contendo monoestearato de sorbitano.

JÄGER e colaboradores (2009) verificaram que a liberação do éster etílico de indometacina, o qual se encontra disperso no núcleo das partículas de NCL (CRUZ e col., 2006a), tornava-se mais lenta com o aumento da concentração de monoestearato de sorbitano na formulação. Isso mostra que a dispersão de um lipídeo líquido e um lipídeo sólido no núcleo das partículas propicia que o controle de liberação não seja exclusivamente um atributo da parede polimérica das nanocápsulas, como acontece para as partículas propostas por FESSI e colaboradores (1989). MONTASSER e colaboradores (2002) e MOSQUEIRA e colaboradores (2005), devido a estudos de AFM, sugeriram que as nanocápsulas, por serem vesículas poliméricas, não teriam a mesma rigidez que as nanoesferas, estruturas matriciais.

Considerando o exposto, uma hipótese foi levantada: a presença de monoestearato de sorbitano alteraria o grau de rigidez das nanocápsulas (Figura 27). Assim, foram preparadas quatro formulações de nanocápsulas no presente trabalho, duas contendo monoestearato de sorbitano (NCL_F e NCL_0) e duas sem este componente (NC_F e NC_0).

Os resultados de turbidimetria mostraram que o número de partícula por cm^3 é maior para as formulações contendo monoestearato de sorbitano (NCL_F e NCL_0). Os resultados de DSC mostraram que tanto as formulações de NCL quanto as formulações de NC apresentam redução similar de cristalinidade e somente um pico de fusão, o qual pareceu ser referente ao polímero. Ainda, através do gradiente de densidade,

verificou-se que essas formulações eram mais densas e uma única faixa de densidade foi visualizada para tais formulações. Tais resultados demonstraram que o monoestearato de sorbitano encontra-se, pelo menos em parte, dentro das partículas.

Os estudos demonstraram que formulações preparadas sem fosfatidilcolina (NCL_0 e NC_0) são termodinamicamente mais estáveis. Portanto, tais formulações foram selecionadas para o estudo da deformação das nanocápsulas.

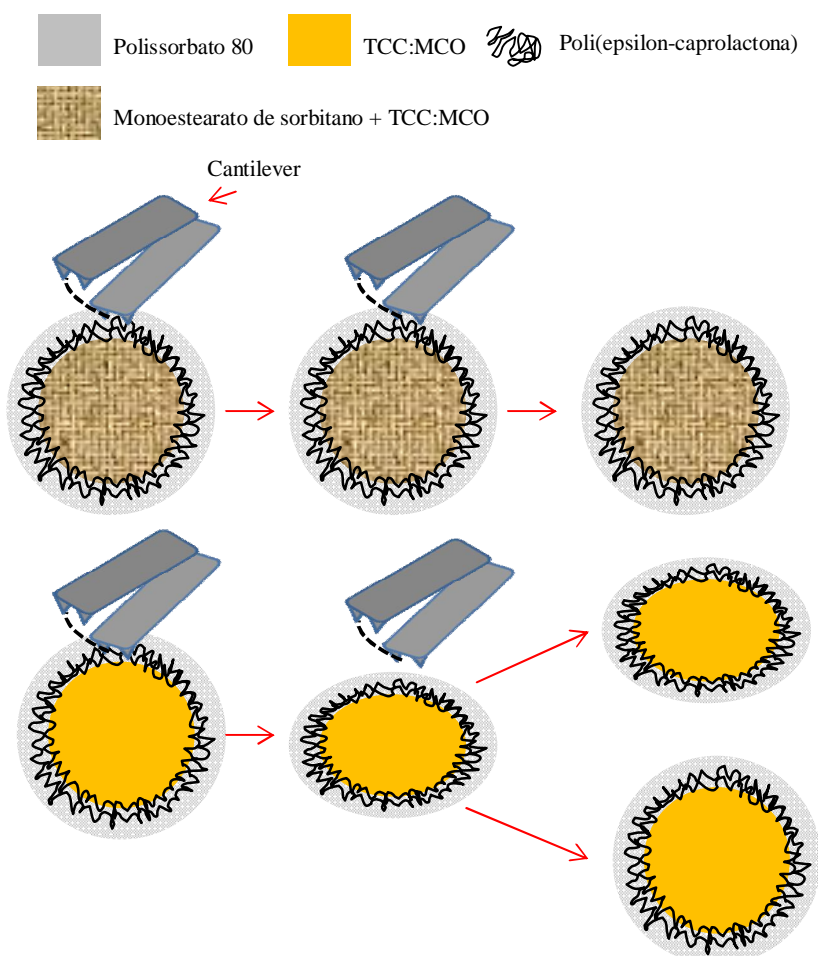


Figura 27. Ilustração dos possíveis perfis de deformação das partículas de NCL e NC após a aplicação de uma força.

As formulações foram primeiramente analisadas por AFM no modo *tapping* para verificar a disposição das partículas sob o substrato escolhido, o formato,

diâmetro e altura das mesmas. Na Figura 28 é possível verificar que as partículas NC_0 (Figura 28a e Figura 28c) e NCL_0 (Figura 28b e Figura 28d) apresentam formato esférico, com diâmetro em torno de 200 nm e altura superior a 100 nm.

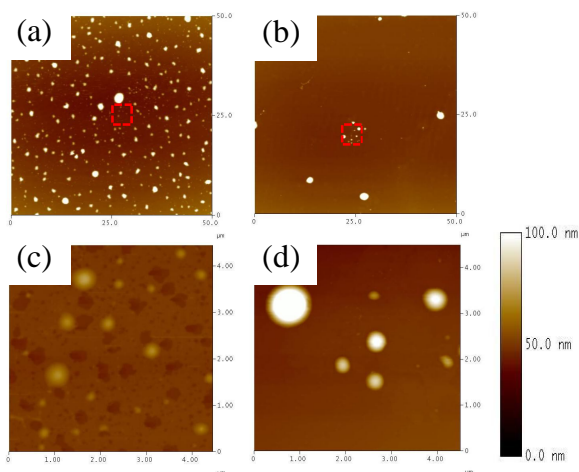


Figura 28. Imagens de AFM no modo *tapping* das formulações NC_0 e NCL_0 . Em (a) e (c) temos NC_0 , em $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ e em $4,5\ \mu\text{m} \times 4,5\ \mu\text{m}$, respectivamente. Em (b) e (d) temos NCL_0 , em $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ e em $4,5\ \mu\text{m} \times 4,5\ \mu\text{m}$, respectivamente. Os quadrados vermelhos mostram a área de zoom de 50 para $4,5\ \mu\text{m}$.

Adicionalmente, durante estas análises no modo *tapping*, ao procurar a melhor preparação para a amostra, foi possível verificar que as partículas tendem a se agregar no substrato utilizado (mica), Figura 29a e Figura 29c, pois o diâmetro e altura apresentado por algumas partículas eram muito superiores aos esperados. Com o aumento da diluição do sistema para o preparo da amostra de análise, foi possível diminuir a presença desses agregados, Figuras 29c e Figura 29d, o que possibilitou uma melhor análise dos sistemas. Entretanto, o mais interessante foi poder observar a camada ao redor e entre as partículas que também reduz com o aumento da diluição utilizada para o preparo da amostra. Tal camada provavelmente seja o polissorbato 80, tensoativo que estabiliza o sistema. Na imagem de fase (Figura 29b), a mesma cor escura indica que essa camada que está entre e ao redor (na superfície) das partículas é do mesmo material (mesma “maciez”).

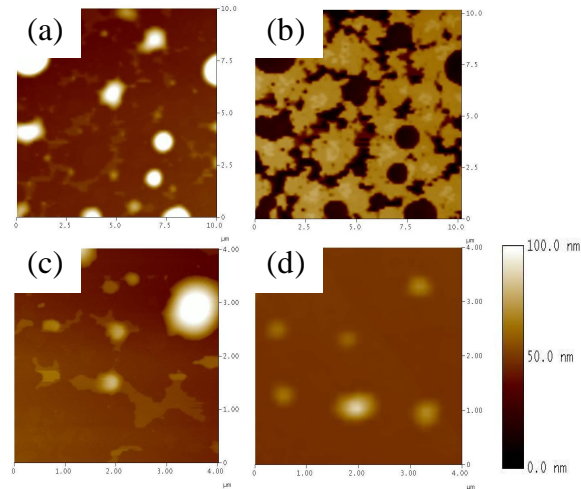


Figura 29. Imagens de AFM no modo *tapping* da formulação NC_0 . Em (a) imagem de topografia e (b) imagem de fase, em $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$, da formulação NC_0 com diluição de 100x para preparo da amostra mostrando o material que está entre as partículas é o mesmo que as recobre. Em (c) diluição de 100x para o preparo da amostra e (d) diluição de 500x para o preparo da amostra da formulação NC_0 , em $4\ \mu\text{m} \times 4\ \mu\text{m}$, mostrando que com o aumento da diluição os agregados diminuem e o material, polissorbato 80, que recobre e fica entre as partículas diminui de concentração passando só a recobrir as partículas.

Para a análise de rigidez, foi utilizado o modo contato, aplicando o procedimento de *Force Volume*. Após a obtenção das curvas de força, os dados extraídos foram analisados por um programa baseado em um modelo teórico para a obtenção dos dados de elasticidade, Informações qualitativas foram obtidas através das imagens de *Deflection slope approach* fornecidas por este tratamento. As imagens obtidas por essa análise estão expostas na Figura 30 e fornecem informações quanto ao grau (ou inclinação) da deflexão que o cantilever faz ao aproximar-se da amostra.

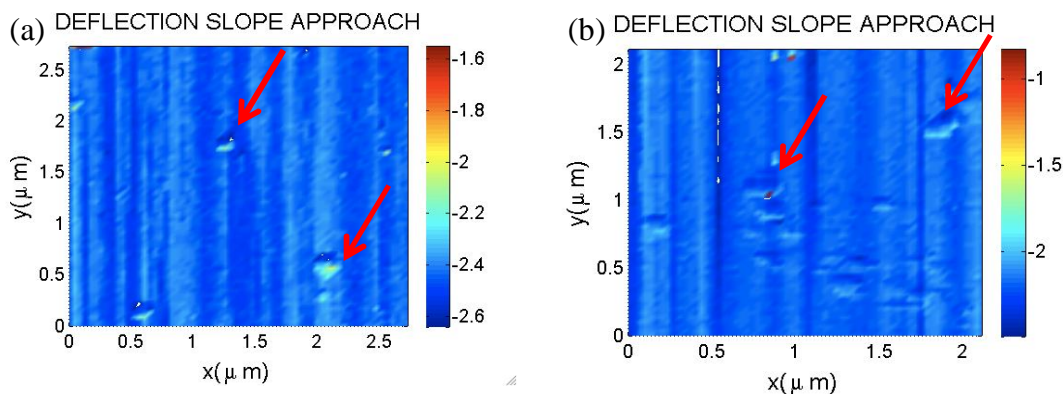


Figura 30. Imagens de *Deflection slope approach* para as partículas (a) NC₀ e (b) NCL₀. A barra mostra o grau de inclinação da deflexão do cantilever. As setas vermelhas apontam as partículas.

Na Figura 30, a barra representa a inclinação do cantilever, ou seja, quanto mais escura a tonalidade de azul, maior foi a inclinação do cantilever e mais rígida é a amostra. Observa-se que na Figura 30a, a tonalidade de azul é mais escura sob o substrato do que sob a partícula, enquanto que na Figura 30b a mesma tonalidade de cor é observada sob o substrato e sob as partículas. Tal resultado confirmou, pelo menos qualitativamente, que as nanocápsulas de núcleo lipídico, NCL₀, ou seja, com monoestearato de sorbitano, são mais rígidas do que as partículas sem este componente, NC₀.

Portanto, as formulações de NCL, contendo monoestearato de sorbitano, poderiam ser utilizadas, por exemplo, para encapsular ativos que devam atuar em camadas mais superficiais da pele, pensando na via cutânea, por exemplo. Tal permanência das NCL em camadas mais superficiais da pele já foi observada em experimentos *ex vivo* (ALVES e col., 2007; PAESE, 2008). Por outro lado, as partículas sem este componente (NC) ou, ainda sem polímero (NE), poderiam ser utilizadas para encapsular ativos que devam atuar em camadas mais profundas da pele.

5.11 Relação entre estabilidade física e rigidez das nanocápsulas

No início do trabalho, foi levantada a hipótese de que nanocápsulas contendo monoestearato de sorbitano seriam mais estáveis do que aquelas contendo fosfatidilcolina ou sem monoestearato de sorbitano devido ao aumento da viscosidade do núcleo e rigidez do sistema. A presença de monoestearato de sorbitano no núcleo das partículas mostrou resultar em aumento da rigidez do sistema. Entretanto, embora NCL_0 tenha demonstrado ser mais estável que NC_F , não foram observadas diferenças de estabilidade entre NCL_0 e NC_0 . Além disso, NCL_F foi mais instável que NC_F .

Os resultados indicaram que a estabilidade termodinâmica do sistema coloidal não teve relação com o aumento da viscosidade e rigidez do núcleo, causada pela presença de monoestearato de sorbitano. A parede polimérica mostrou ser principal fator para a obtenção de sistemas com grande estabilidade termodinâmica.

6. CONCLUSÕES

- As formulações de NCL e NC mostraram tendência a apresentar valores de tamanho médio ($D_{[4,3]}$) maiores que suas NEL e NE correspondentes, fato que mostrou estar relacionado com os maiores valores de tensão superficial e de viscosidade das fases orgânicas das formulações de NCL e NC. Desta forma, as propriedades físico-químicas das soluções iniciais utilizadas para preparar as formulações coloidais mostraram ter relação com as características finais do sistema;
- A avaliação da estabilidade relativa em função do tempo, por espalhamento múltiplo de luz, para as formulações de NCL, NC e de NEL, NE mostrou fenômenos de migração de partículas esperados para esses sistemas e indicou que os sistemas analisados tendem a ser cineticamente estáveis por certo período de tempo;
- O novo método desenvolvido (espalhamento múltiplo de luz em temperatura variada, EML-TV) foi capaz de fornecer parâmetros termodinâmicos do processo de floculação de sistemas coloidais;
- O método desenvolvido é útil como método de determinação da estabilidade termodinâmica de formulações coloidais com as vantagens: de não ser destrutivo, de não necessitar de pré-tratamento, mantendo o sistema intacto e possibilitando que a amostra seja reutilizada; de ser de execução extremamente rápida, com duração menor (< 1 h); de ser mais rápido do que qualquer outra técnica conhecida; e ainda, de obter valores quantitativos para fins comparativos de estabilidade utilizando apenas uma técnica de análise. Isso representa uma potencial vantagem de tempo e custos durante o período de desenvolvimento de um produto;
- O novo método para a determinação de parâmetros termodinâmicos de sistemas dispersos permitiu comparar quantitativamente formulações usando desenhos fatoriais, assim como estabelecer um valor de referência da variação de entalpia padrão para se prever a estabilidade a longo prazo, a partir de uma análise de 1 h em EML-TV;

-
- Verificou-se que o valor de referência da variação de entalpia padrão para se prever a estabilidade a longo prazo difere conforme a natureza coloidal (NCL, NC ou NEL, NE);
 - Foi possível determinar que o polímero aumenta quantitativamente a estabilidade dos sistemas dispersos por estar localizado na interface partícula-água. Ou seja, foi demonstrado, pela primeira vez, o efeito quantitativo da presença da parede polimérica na estabilidade de dispersões coloidais submicrométricas;
 - A presença de fosfatidilcolina prejudica consideravelmente a estabilidade do sistema coloidal, mesmo na combinação com monoestearato de sorbitano;
 - O estudo qualitativo de deformação das NCL e NC indicou que as nanocápsulas de núcleo lipídico, NCL, que contêm monoestearato de sorbitano, são mais rígidas do que as NC, que são preparadas sem este componente. E, ainda, mesmo que o núcleo de NCL seja mais rígido do que o núcleo de NC, o monoestearato de sorbitano não influenciou significativamente a estabilidade termodinâmica das NCL ou NEL em comparação com NC ou NE, comparada com a estabilidade que a parede polimérica propiciou para os sistemas NCL e NC comparados com NEL e NE.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRIDIS, P.; HOLZWARTH, J. F.; HATTON, A. T. Thermodynamics of droplet clustering in percolating AOT water-in-oil microemulsions. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 99, p. 8222-8232, 1995.

ALLÉMANN, E., GURNY, R.; DOELKER, E. Drug-loaded nanoparticles-preparation methods and drug targeting issues. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 39, p. 173-191, 1993.

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. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 53-62, 2004a.

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

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.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Degradação acelerada de suportes de poli(ϵ -caprolactona) e poli(d,l-ácido láctico-co-ácido glicólico) em meio alcalino. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 2, p. 141-148, 2006.

BARRATT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 3, p. 163-171, 2000.

BORDES, C.; SNABRE, P.; FRANCES, C.; BISCANS, B. Optical investigation of shear- and time-dependent microstructural changes to stabilized and depletion-flocculated concentrated latex sphere suspensions. **Powder Technology**, v. 130, p. 331-337, 2003.

BORGIA, S. L.; REGEHLY, M.; SIVARAMAKRISHNAN, R.; MEHNERT, W.; KORTING, H. C.; DANKER, K.; RÖDER, B.; KRAMER, K. D.; SCHÄFER-KORTING, M. Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement-correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and piezoelectric spectroscopy. **Journal of Controlled Release**, v. 110, p. 151-163, 2005.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 631-651, 2002.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. A. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules and nanoemulsions, as ocular drug carrier. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, p. 530-536, 1996.

CELIA, C.; TRAPASSO, E.; COSCO, D.; PAOLINO, D.; FRESTA, M. TurbiscanLab[®] Expert analysis of the stability of ethosomes[®] and Ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. **Colloids & Surfaces B**, 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.

CRUZ, L.; SCHAFFAZICK, S. R.; COSTA, T. D.; SOARES, L. U.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Physico-Chemical characterization and *in vivo* evaluation of indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules by PCS, TEM, SAXS, interfacial alkaline hydrolysis and antiedematogenic activity. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, p. 3154-3162, 2006a.

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

DALE, P. J.; KIJLSTRA, J.; VINCENT, B. Adsorption of non-ionic surfactants on hydrophobic silica particles and the stability of the corresponding aqueous dispersions. **Langmuir**, v. 21, p. 12250-12256, 2005.

DALE, P. J.; KIJLSTRA, J.; VINCENT, B. The temperature stability of single and mixed emulsions stabilized by nonionic surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemistry and Engineering Aspects**, v. 291, p. 85-92, 2006.

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

GALINDO-RODRÍGUEZ, S.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 8, p. 1428-1439, 2004.

GALLARDO, M.; COURRAZE, G.; DENIZOT, B.; TREUPEL, L.; COUVREUR, P.; PUISIEUX, F. Study of the mechanisms of formation of nanoparticles and nanocapsules of polyisobutyl-2-cyanoacrylate. **International Journal of Pharmacy**, v. 100, p. 55-64, 1993.

GREGORY, J. Monitoring particle aggregation processes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147-148, p. 109-123, 2009.

GUTERRES, S. S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. Poly(D,L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 79, p. 57-63, 1995.

HILL T. L. Thermodynamics of small systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 36, n. 12, p. 3182-3197, 1962.

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. **Controle da liberação do éster etílico de indometacina a partir de nanocápsulas poliméricas através da variação da concentração do monoestearato de sorbitano**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008 - xvi, 113 p.: il.

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

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, 2004.

JÓDAR-REYES, B.; MARTÍN-RODRÍGUEZ, A.; ORTEGA-VINUESA, J. L. An enthalpic analysis on the aggregation of colloidal particles studied by microcalorimetry. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 237, p. 6-10, 2001.

KIM, H-S.; PARK, W-I.; KANG, M.; JIN, H-J. Multiple light scattering measurement and stability analysis of aqueous carbon nanotube dispersions. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 69, p. 1209-1212, 2008.

KUBUROVI, M.; URI, S.; JOVOVI, A.; KARAN, M. Effect of temperature on a free energy and equilibrium constants during dry flue gas desulphurisation chemical reactions. **Thermal Science**, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2002.

LBOUTOUNNE, H.; FAIVRE, V.; FALSON, F.; PIROT, F. Characterization of transport of chlorhexidine-loaded nanocapsules through hairless and wistar rat skin. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 17, p. 176-182, 2004.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery: a review. **Sciences Techniques et Pratiques Pharmaceutiques**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.

LOPES, E. C.; POHLMANN, A. R.; BASSANI, V.; GUTERRES, S. S. Polymeric colloidal systems containing ethionamide: preparation and physico-chemical characterization. **Pharmazie**, v. 55, p. 527-530, 2000.

LUPPI, B.; CERCHIARA, T.; BIGUCCI, F.; BASILE, R.; ZECCHI, V. Polymeric nanoparticles composed of fatty acids and polyvinylalcohol for topical application of sunscreens. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 407-411, 2004.

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

MENGUAL, O.; MEUNIER, G.; CAYRÉ, I.; PUECH, K.; SNABRE, P. TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurements for concentrated emulsion and suspension instability analysis. **Talanta**, v. 50, p. 445-456, 1999b.

MERTINS, O.; SCHNEIDER, P. H.; POHLMANN, A. R.; DA SILVEIRA, N. P. Interaction between phospholipids bilayer and chitosan in liposomes investigated by ³¹P NMR spectroscopy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 294-299, 2010.

MEUNIER, G. Turbiscan MA1000, a new concept in stability analysis of concentrated colloidal dispersions (emulsions, suspensions, foams, gels). **Cosmetics and Toiletries Manufacture Worldwide**, p. 256-266, 1996.

MONTASSER, I.; FESSI, H.; COLEMAN, A. W. Atomic force microscopy imaging of novel type of polymeric colloidal nanostructures. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 54, p. 281-284, 2002.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, 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**, v. 89, n. 5, p. 614-626, 2000.

MOSQUEIRA, V. C. F.; LEITE, E. A.; BARROS, C. M.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S. Polymeric nanostructures for drug delivery: characterization by atomic force microscopy. **Microscopy and Microanalysis**, v. 11, p. 36-39, 2005.

MU, L.; SEON, P-H.; ANG, S-H.; FENG, S-S. Study on surfactant coating of polymeric nanoparticles for controlled delivery of anticancer drug. **Colloid and Polymer Science**, v. 283, p. 58-65, 2004.

MÜLLER, C. R.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; DALLA COSTA, T.; PESCE DA SILVEIRA, N.; DE LUCCA FREITAS, L.; GUTERRES, S. S. Spray-

dried diclofenac-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres. preparation and physicochemical characterization. **Pharmazie**, v. 56, p. 864–867, 2001.

NETZ, P. A.; GONZÁLES-ORTEGA, G. **Fundamentos da físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

NIWA, T.; TAKEUCHI, H.; HINO, T.; KUNOU, N.; KAWASHIMA, Y. Preparation of biodegradable nanospheres of water soluble and insoluble drugs with D,L-lactide: glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. **Journal of Controlled Release**, v. 25, p. 89-98, 1993.

OLVERA-MARTINEZ, B. I.; CAZARES-DELGADILLO, J.; CALDERILLA-FAARDO, S. B.; VILLALOBOS-GARCIA, R.; GANEM-QUINTANAR, A.; QUINTANAR-GUERRERO, D. Preparation of polymeric nanocapsules containing octyl methoxycinnamate by the emulsification-diffusion technique: Penetration across the stratum corneum. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, p. 1552-1559, 2005.

PACHECO, D. P.; MANRIQUE, Y. J.; MARTINEZ, F. Thermodynamic study of the solubility of ibuprofen and naproxen in some ethanol plus propylene glycol mixtures. **Fluid Phase Equilibria**, v. 262, p. 23-31, 2007.

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

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.

PELTONEN, L.; KOISTINEN, P.; KARJALAINEN, M.; HÄKKINEN, A.; HIRVONEN, J. The effect of cosolvents on the formulation of nanoparticles from low-molecular-weight poly(l)lactide. **AAPS PharmSciTech**, v. 3, n. 4, p. 1-7, 2002.

PERTOFT, H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 44, p. 1-30, 2000.

PIZZINO, A.; CATTE, M.; VAN HECKE, E.; SALAGER, J-L.; AUBRY, J-M. On-line light backscattering tracking of the transitional phase inversion of emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemistry and Engineering Aspects**, v. 338, p. 148-154, 2009.

PIZZINO, A.; RODRIGUEZ, M. P.; XUEREB, C.; CATTE, M.; VAN HECKE, E.; AUBRY, J-M.; SALAGER, J-L. Light backscattering as an indirect method for detecting emulsion inversion. **Langmuir**, v. 23, p. 5286-5288, 2007.

POHLMANN, A. R. ; MEZZALIRA, G.; VENTURINI, C. G.; CRUZ, L.; Bernardi, A.; JÄGER, E.; Battastini, A. M. O.; SILVEIRA, N. P.; 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.

POHLMANN, A. R.; CRUZ, L.; MEZZALIRA, G.; SOARES, L. U.; DA SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S. Structural model of polymeric nanospheres containing indomethacin ethyl ester and in vivo antiedematogenic activity. **International Journal of Nanotechnology**, v. 4, p. 454-467, 2007.

POHLMANN, A. R.; SOARES, L. U.; CRUZ, L.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S. Alkaline hydrolysis as a tool to determine the association form of indomethacin in nanocapsules prepared with poly(ϵ -caprolactone). **Current Drug Delivery**, v. 1, p. 103-110, 2004.

POHLMANN, A. R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; DA SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 16, p. 305-312, 2002.

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

POLETTI, 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, 2008a.

POLETTI, 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.

PORRAS, M.; SOLANS, C.; GONZÁLEZ, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Properties of water-in-oil (W/O) nano-emulsions prepared by a low-energy emulsification method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemistry and Engineering Aspects**, v. 324, p. 181–188, 2008.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, n. 12, p. 1113-1128, 1998.

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.

RIEGER, M. M. Surfactants. In: Lieberman, H. A., Rieger, M. M., Banker, G. S. (Ed.). **Pharmaceutical dosage forms: disperse systems**, Ed. 2; New York: Marcel Dekker, 1996; v. 3, cap. 6, p. 211-286.

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p. 85-94, 2003.

SAHOO, S. K.; LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discovery Today**, v. 8, p. 1112-1123, 2003.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M. W.; CAETANO, M. N. P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, p. 71-80, 2000.

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

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanocapsules, nanoemulsion and nanodispersion containing melatonin: preparation, characterization and stability evaluation. **Pharmazie**, v. 62, p. 354-360, 2007.

SHAHIWALA A, MISRA A. Studies in topical application of niosomally entrapped nimesulide . **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, p. 220-225, 2002.

SHAW, D. J. **Introduction to Colloid and Surface Chemistry**. 4^a Ed. Oxford: Butterworth/Heinemann, 1992.

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

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

SOARES, L. U. **Estudo cinético da hidrólise do éster etílico de indometacina associado a nanopartículas de poli(epsilon-caprolactona)**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

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.

TEIXEIRA, H. F.; MARTINI, E.; SILVEIRA, A. M.; DUBERNET, C. Preparação e caracterização de nanoemulsões contendo oligonucleotídeos antisense através da técnica de emulsificação espontânea. **Caderno de Farmácia**, v. 18, n. 2, p. 89-93, 2002.

THOURTON, J. Force Curves. In: THOURTON, J (Ed.). **Scanning Probe Microscopy Training Notebook, Veeco Metrology Group**, p. 37, Agosto, 1998.

VANDERHOFF, J. W. Theory of colloids. In: Lieberman, H. A., Rieger, M. M., Banker, G. S. (Ed.). **Pharmaceutical dosage forms: disperse systems**, Ed. 2; New York: Marcel Dekker, 1996, v. 3, cap. 4, p. 91-152.

VAUTHIER, C.; DUBERNET, C.; FATTAL, E.; PINTO-ALPHANDRY, H.; COUVREUR, P. Poly(alkylcyanocrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 519-548, 2003.

VOGELSANGER, N.; FORMOLO, M. C.; PEZZIN, A. P. T.; SCHNEIDER, A. L. 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(epsilon-caprolactona): obtenção e estudo da miscibilidade. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 359-365, 2003.

WEINER, N. Introduction. In: Lieberman, H. A., Rieger, M. M., Banker, G. S. (Ed.). **Pharmaceutical dosage forms: disperse systems**, Ed. 2; New York: Marcel Dekker, 1996; v. 3, cap. 1, p. 1-15.

WEISS-ANGELI, V. **Desenvolvimento e caracterização de formulações fotoprotetoras contendo nanocápsulas**. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

WEISS-ANGELI, V.; POLETTO, F. S.; 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.

WULFF-PÉREZ, M.; TORCELLO-GÓMEZ, A.; GÁLVEZ-RUÍZ, M. J.; MARTÍN-RODRÍGUEZ, A. Stability of emulsions for parenteral feeding: Preparation and characterization of o/w nanoemulsions with natural oils and Pluronic f68 as surfactant. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1096-1102, 2009.

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.

ZATTONI, A.; PICCOLOMINI, E. L.; TORSI, G.; RESCHIGLIAN, P. Turbidimetric detection method in flow-assisted separation of dispersed samples. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 6469-6477, 2003.

Quadro 1. Estruturas químicas dos componentes utilizados para a preparação das partículas.

| | |
|---|--|
| Metoxicinamato de octila | |
| Fosfatidilcolina | |
| Polissorbato 80 | |
| Monoestearato de Sorbitano | |
| Poli(epsilon-caprolactona) | |
| Triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico | |

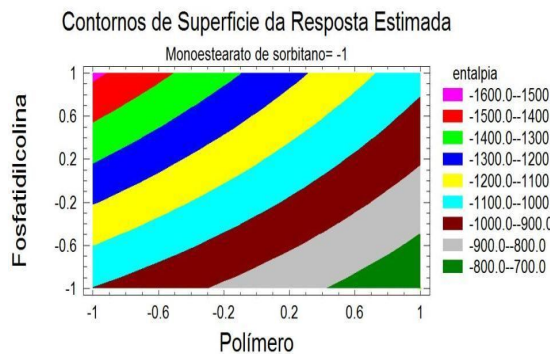


Figura 31. Gráfico de contorno do delineamento fatorial 2^3 .

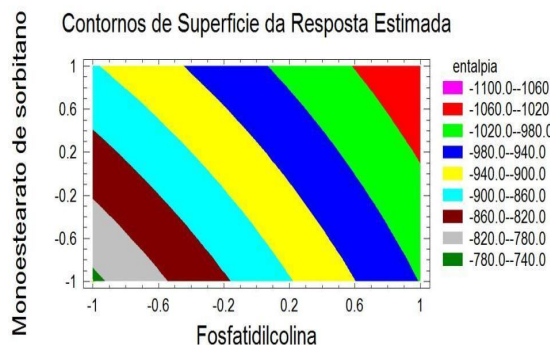


Figura 32. Gráfico de contorno do delineamento fatorial 2^2 para o sistema polimérico (nanocápsulas).

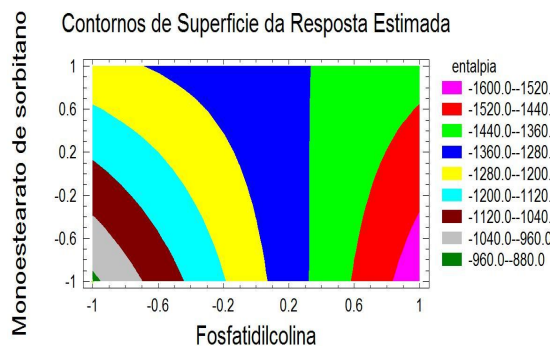


Figura 33. Gráfico de contorno do delineamento fatorial 2^2 para o sistema não-polimérico (nanoemulsões).

Tabela 14. Densidades (g cm^{-3}) das formulações de nanocápsulas e nanoemulsões, assim como das formulações de nanoesferas (NS), lipossomas (LS) e nanodispersão (ND) obtidos por gradiente de densidade.

| Formulação | Densidade (g cm^{-3}) |
|----------------|----------------------------------|
| NCL_F | 1,024 |
| NCL_0 | 1,013-1,026 |
| NC_F | 1,025 |
| NC_0 | 1,022 |
| NEL_F | 1,013-1,024 |
| NEL_0 | 1,013-1,022 + 1,024-1,026 |
| NE_F | 1,013-1,022 |
| NE_0 | 1,013-1,022 |
| LS | 1,022 |
| ND | 1,024 |
| NS | 1,035-1,091 |