

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MACROMOLÉCULAS PROFESSORA ELOISA MANO – IMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
POLÍMEROS

FLORA FERREIRA DUARTE DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
POLI(ÁCIDO LÁCTICO) CONTENDO VITAMINA E COMO AGENTE
ANTIOXIDANTE.**

Rio de Janeiro

2017

FLORA FERREIRA DUARTE DE OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
POLI(ÁCIDO LÁCTICO) CONTENDO VITAMINA E COMO AGENTE
ANTIOXIDANTE.

Dissertação submetida ao Instituto de Macromoléculas
Professora Eloisa Mano da Universidade Federal do
Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia
de Polímeros.

Orientador: Prof. Maria Inês Bruno Tavares

Co-orientador: Prof. Mariana Sato de Souza de
Bustamante Monteiro

Rio de Janeiro

2017

CIP - Catalogação na Publicação

F48d FERREIRA DUARTE DE OLIVEIRA, FLORA
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOPARTÍCULAS DE POLI(ÁCIDO LÁCTICO) CONTENDO
VITAMINA E COMO AGENTE ANTIOXIDANTE. / FLORA
FERREIRA DUARTE DE OLIVEIRA. -- Rio de Janeiro,
2016.
61 f.

Orientadora: Maria Inês Bruno Tavares.
Coorientadora: Mariana Sato de Souza de
Bustamante Monteiro.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Instituto de Macromoléculas
Professora Eloisa Mano, Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Polímeros, 2016.

1. Envelhecimento cutâneo. 2. Nanopartículas de
PLA. 3. Método emulsão-difusão. I. Bruno Tavares,
Maria Inês, orient. II. Sato de Souza de
Bustamante Monteiro, Mariana, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Folha de aprovação

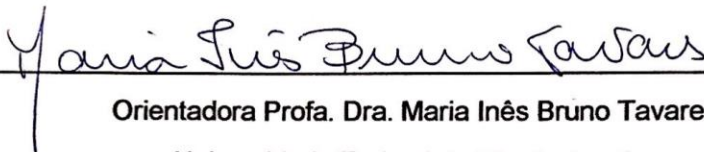
FLORA FERREIRA DUARTE DE OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
POLI(ÁCIDO LÁTICO) E VITAMINA E COMO ANTIOXIDANTE

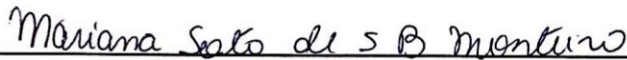
Dissertação submetida ao Instituto de Macromoléculas
Professora Eloisa Mano da Universidade Federal do Rio de
Janeiro como parte dos requisitos para obtenção do grau de
mestre em Ciências, em Ciência e Tecnologia de Polímeros

Aprovado em 22 de fevereiro de 2017

BANCA EXAMINADORA

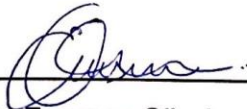

Orientadora Profa. Dra. Maria Inês Bruno Tavares

Universidade Federal do Rio de Janeiro



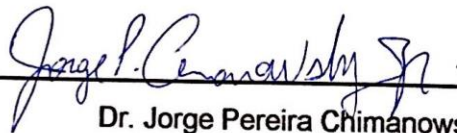
Orientadora Profa. Dra. Mariana Sato de Souza de Bustamante Monteiro

Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio de Janeiro



Prof. Dr. Emerson Oliveira da Silva

Universidade Federal do Rio de Janeiro



Dr. Jorge Pereira Chimanowsky Junior

Universidade Federal do Rio de Janeiro



Dr. Paulo Sergio Rangel Cruz da Silva

Universidade Federal do Rio de Janeiro

*Dedicado à minha avó que sempre
insiste em dizer que tudo que
queremos está ao nosso alcance.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus, porque sem Ele, eu não teria sido forte o suficiente para discernir a minha vocação e fugir do óbvio para conquistar tudo que conquistei na minha vida.

Agradeço à minha família que, mesmo não sendo da área acadêmica, sempre fazem o máximo para entender o que isso significa para mim. Especialmente aos meus pais, agradeço todo o suporte em todos os planos e investimentos para chegar onde estou. À minha irmã, agradeço pela parceria e companhia nas idas e vindas da Cidade Universitária.

Agradeço também aos meus tantos amigos que sempre me impulsionam e me encorajam a seguir a direção que manda meu coração, além de comemorarem junto comigo todos os momentos de vitória e estarem também do meu lado nos momentos não tão fáceis de encarar.

Não pode faltar minha gratidão aos meus amigos do IMA, que me acompanharam nesses dois anos de mestrado. Verônica, Paulo, Jorge, Zé, Amanda, Maria Clara, Luiz Felipe, Thiago, Mari, Dudu e Roberto. Entre os inúmeros almoços no refeitório, troca conhecimento nos laboratórios, entre as análises feitas, artigos compartilhados vocês marcaram presença na minha passagem de mestrado no IMA. Anna e Elton, além disso tudo, adquiriram muitas pulseiras nesses 2 anos.

O meu agradecimento especial à Lívia e ao Max que foram os que me acompanharam mais de perto e não mediram esforços para sempre colaborar muito positivamente, não só com o meu desempenho acadêmico, mas também como grandes amigos presentes no meu dia-a-dia. Lívia, eu aprendi muito com você, mas o que mais me marcou foi seu jeito sempre carinhoso e super ético dentro do instituto. Você é um grande exemplo para mim.

Meu imenso agradecimento à minha orientadora Maria Inês, que se coloca sempre à disposição dos seus alunos para ajuda-los. Não é qualquer um que desempenha a função de orientador com tanto amor como você, professora. Obrigada pela oportunidade de trabalharmos juntas e por sempre acreditar no meu potencial. Eu aprendi muito sobre tudo com você.

Também agradeço à minha co-orientadora Mariana Sato que, com a formação de farmacêutica em comum à minha, me iluminou as ideias para abordar esse trabalho também do ponto de vista farmacêutico. Muito obrigada pela grande ajuda que você

me ofereceu nesse trabalho, em todas as caracterizações que fizemos na Faculdade de Farmácia.

Aproveito para agradecer também ao IME e ao LADEG, que abriram suas portas para que eu pudesse realizar caracterizações em suas dependências.

Ainda agradeço pela CAPES e CnPQ pelo apoio financeiro.

RESUMO

A pele é o órgão de maior extensão do corpo humano e desempenha funções fundamentais para o nosso organismo como um todo. A aplicação de antioxidantes tópicos é uma estratégia de evitar o envelhecimento cutâneo, protegendo o corpo da ação de radicais livres gerados no processo de envelhecimento. As nanopartículas poliméricas são um exemplo de nanocarreadores que podem ser aplicados em formulações antienvhecimento para melhorar a ação destes ativos na pele. O objetivo foi preparar nanopartículas poliméricas de Poli(ácido láctico) com o tensoativo Poloxamer PF68 e o ativo antioxidante vitamina E pelo método emulsão-difusão e avaliar as características térmicas, tamanho e a morfologia das nanopartículas obtidas. Para tal, foi preparado um sistema puro e outro com vitamina E a fim de comparar do efeito do princípio ativo nas nanopartículas. Além disso, foram comparados os sistemas em suspensão e os liofilizados. As técnicas utilizadas para a caracterização das partículas foram: Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Análise termogravimétrica (TGA), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Difração de Raio-X (XRD), Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).

Palavras chave: Envelhecimento cutâneo, nanopartículas de PLA, método emulsão-difusão.

ABSTRACT

The skin is the largest organ of the human body and performs fundamental functions for our organism as a whole. The application of topical antioxidants is a strategy to prevent skin aging by protecting the body from the action of free radicals generated in the aging process. Polymeric nanoparticles are an example of nanocarriers that can be applied in anti-aging formulations to enhance the action of these active substances on the skin. The objective was to prepare polymeric nanoparticles of Poly(lactic acid) with the Poloxamer PF68 as surfactant and the antioxidant active vitamin E, by the emulsion-diffusion method and to evaluate the thermal characteristics, size and morphology of the nanoparticles obtained. It was prepared with a pure system and another with vitamin E to observe the effect of the active compound on the nanoparticles. In addition, suspension systems and the lyophilizates were compared. The techniques used to characterize the particles were: Infrared Spectroscopy by Fourier Transform (FTIR), Thermogravimetric Analysis (TGA), Differential Scanning Calorimetry (DSC), X-ray Diffraction (XRD), Dynamic Light Scattering), Scanning Electron Microscopy (SEM).

Key words: skin aging, PLA nanoparticles, emulsion-diffusion method

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das estruturas cutâneas da pele

Figura 2: Figura esquemática da epiderme.

Figura 3: Figura esquemática da Derme

Figura 4: Figura esquemática da Hipoderme

Figura 5: Processo de Senescência celular

Figura 6: Envelhecimento intrínseco x envelhecimento extrínseco

Figura 7: Estrutura química do α -tocoferol

Figura 8: Exemplos de nanocarreadores usados para veículos de liberação

FÍGURA 9: Vias de penetração cutânea

Figura 10: Diferentes morfologias de partículas

Figura 11: Esquema representativo da regularidade das cadeias poliméricas de PCL, D-PLA e D, L-PLA e a difusão da água pelas mesmas

Figura 12: Esquema geral de obtenção de nanopartículas

Figura 13: Esquema do método emulsão-difusão

Figura 14: Ilustração da evaporação do solvente

Figura 15: Ilustração do método de emulsão-difusão

Figura 16: Difratoograma de Raio-X dos sistemas e polímeros puros

Figura 17: Termogramas dos componentes puros e dos sistemas desenvolvidos

Figura 18: dTGs dos sistemas desenvolvidos

Figura 19: Calorimetria diferencial de varredura dos polímeros e dos sistemas.

Figura 21: Gráficos de distribuição de tamanhos de partícula dos sistemas. (A) Sistema puro em suspensão; (B) Sistema puro liofilizado; (C) Sistema com vitamina E em suspensão; (D) Sistema com vitamina E liofilizado.

Figura 22: Micrografias dos agregados de partículas: (A) sistema puro; (B) sistema com vitamina E

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Funções e mudanças com a idade dos componentes e sistemas da pele

Tabela 2: T_{onset} , T_{peak} e resíduo dos componentes puros e dos sistemas

Tabela 3: Graus de cristalinidade calculados por DSC

Tabela 4: espectros FTIR da Vitamina E da literatura e utilizado na dissertação

Tabela 5: espectros FTIR do PLA literatura e utilizado na dissertação

Tabela 6: espectros FTIR do Poloxamer literatura e utilizado na dissertação

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivos Gerais.....	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3.	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Pele	16
3.1.1	Funções E Constituição.....	16
3.1.2	Envelhecimento Cutâneo.....	20
3.2	Formulações Antienvhecimento	23
3.3	Nanotecnologia Em Cosméticos	26
3.3.1	Nanopartículas Poliméricas	29
3.3.2	Método Emulsão – Difusão.....	30
3.3.3	Liofilização.....	34
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	Materiais.....	35
4.2	Equipamentos:	35
4.3	Método	35
4.4	Caracterização Dos Sistemas	38
4.4.1	Difração de Raios-X (XRD).....	38
4.4.2	Análise Termogravimétrica (TGA).....	38
4.4.3	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	38
4.4.4	Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	39
4.4.5	Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	39
4.4.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)	39
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40

5.1	Difração de Raios-X - XRD.....	40
5.2	Análise Termogravimétrica (TGA)	41
5.3	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	43
5.4	Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	46
5.5	Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).....	49
5.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (FEG-SEM).....	51
6.	CONCLUSÃO	51
7.	SUGESTÕES	52
	REFERÊNCIAS.....	53

1. INTRODUÇÃO

Os produtos cosméticos são definidos como todas as substâncias ou formulações destinadas a aplicação nas diferentes partes superficiais do corpo humano, visando a sua limpeza, melhorar o seu odor e sua proteção (COHEN-LETESSIER, 2008; EPSTEIN, 2009; LODÉN, 2014). Porém, nos últimos anos ocorreu o desenvolvimento de novas formulações cosméticas, que desempenham algum grau de ação fisiológica, sendo denominadas de cosmecêuticos. Dessa forma, os cosmecêuticos são produtos cosméticos capazes de realizar uma ação farmacológica, como por exemplo: as formulações antienvelhecimentos, que são produtos cosméticos que interferem em aspectos fisiológicos da pele. (COHEN-LETESSIER, 2008; EPSTEIN, 2009; RAMOS-E-SILVA *et al.*, 2013).

A perceptível ânsia da sociedade pela aparência jovem gera uma busca por métodos e intervenções que tem como objetivo retardar e amenizar sinais de envelhecimento, que vem crescendo rapidamente (RAMOS-E-SILVA *et al.*, 2013), aumentando a procura por produtos cosméticos e cosmecêuticos que atuam contra o envelhecimento e tornando este um mercado em ascensão.

O processo de envelhecimento cutâneo pode ocorrer de duas formas: o envelhecimento intrínseco e o extrínseco. O intrínseco ocorre naturalmente, sendo resultado de fatores cronológicos. Já o extrínseco ocorre pela ação de agressores ambientais, radiação ultravioleta (UV), por exemplo, que causam o envelhecimento prematuro e também é conhecido como fotoenvelhecimento (MUKHERJEE *et al.*, 2011).

A radiação UV é absorvida pela pele e gera radicais livres, tais como espécies reativas de oxigênio (EROs), que causam danos oxidativos a moléculas e estruturas celulares. Apesar da pele ter os antioxidantes naturais, eles podem não ser suficientes, para combater o excesso de radicais livres que podem ser gerados pela exposição crônica a radiação UV. Todo dano não reparado corretamente gera, excesso de radicais livres, modificações na pele, que podem gerar rugas, diferentes pigmentações na pele, irregularidades na sua superfície dentre outros sinais clínicos do envelhecimento cutâneo (PALMER, 2010; MUKHERJEE *et al.*, 2011).

Para proteger a pele das ações nocivas dos EROs são necessárias diversas medidas, como fazer uso de filtros solares, os quais protegem a pele contra a radiação UV, e a utilização de produtos tópicos que contenham antioxidantes, para impedir e

auxiliar no reparo de danos oxidativos, mantendo-se a pele mais saudável (PALMER, 2010).

Para veicular esses antioxidantes é preciso estudar sobre os meios que tornam possível a ação destes agentes exógenos na pele. A nanotecnologia traz uma nova perspectiva para esta área em face das novas possibilidades de materiais com características particulares como veículos promissores de ativos, sendo assim é uma grande aliada nesse quesito. No caso da aplicação de matrizes carreadoras, ela é muito utilizada para promover liberação diferenciada de fármacos, além de proteção de moléculas lábeis, entre outros. Entretanto, as desvantagens também existem, como os poucos estudos toxicológicos, alto custo, possíveis produtos de degradação indesejados (STEVANOVI; USKOKOVI, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo deste estudo foi encapsular vitamina E em nanopartículas de PLA pela técnica de emulsão-difusão e caracterizar o sistema obtido com a finalidade de avaliar possível aplicação em formulação cosmética antienvhecimento.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter nanopartículas de PLA pelo método emulsão-difusão;
- Encapsular a vitamina E no sistema
- Caracterizar as partículas obtidas quanto ao seu tamanho, morfologia, cristalinidade e propriedades térmicas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

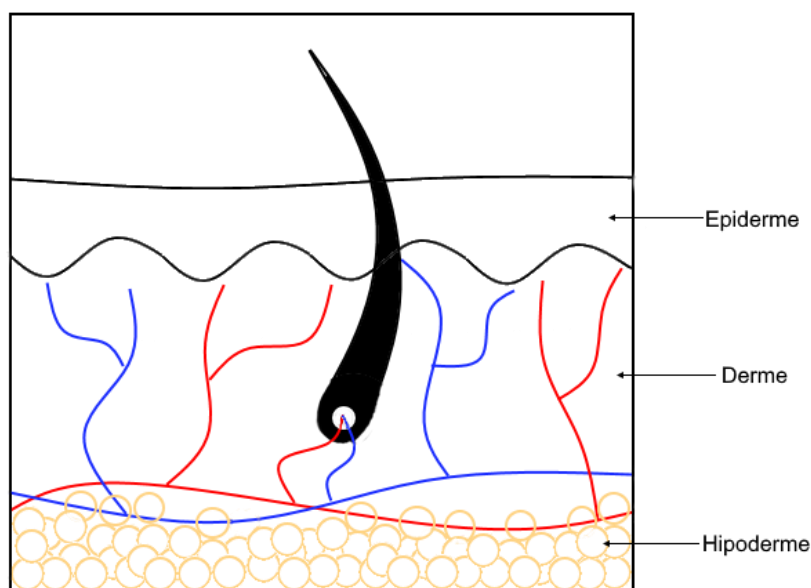
3.1 Pele

3.1.1 Funções E Constituição

A pele é o órgão de maior extensão do nosso corpo e desempenha funções fundamentais para o nosso organismo como um todo. Dentre essas funções podemos citar: barreira protetora contra ações mecânicas, químicas, invasão de patógenos e radiação ultravioleta (UV); barreira contra perda d'água, regulação de temperatura, sistema de desintoxicação através da descamação da pele, sistema de defesa primário, é um órgão sensorial e define a aparência (DELAMBRA *et al.*, 2008; KILPATRICK-LIVERMAN *et al.*, 2009).

A pele é dividida em 3 camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme. Conforme ilustrado na Figura 1, a epiderme é a porção superior, não é vascularizada sua composição consiste em camadas de células epiteliais que vão se diferenciando à medida que são deslocadas para camadas mais externas da pele; já a derme, é uma camada menos rica em células, quando comparada à epiderme, vascularizada e composta por diversos tipos de fibras que garantem a força estrutural da pele (DELAMBRA *et al.*, 2008; NAYLOR *et al.*, 2011).

Figura 1: Representação esquemática das estruturas cutâneas da pele



Fonte: elaborado pelo autor

A epiderme (Figura 2) é a camada mais superior da pele e os tipos celulares que a compõe são os queratinócitos, os melanócitos, células de Langerhans e células de Mekel. Cada uma delas possui uma função específica.

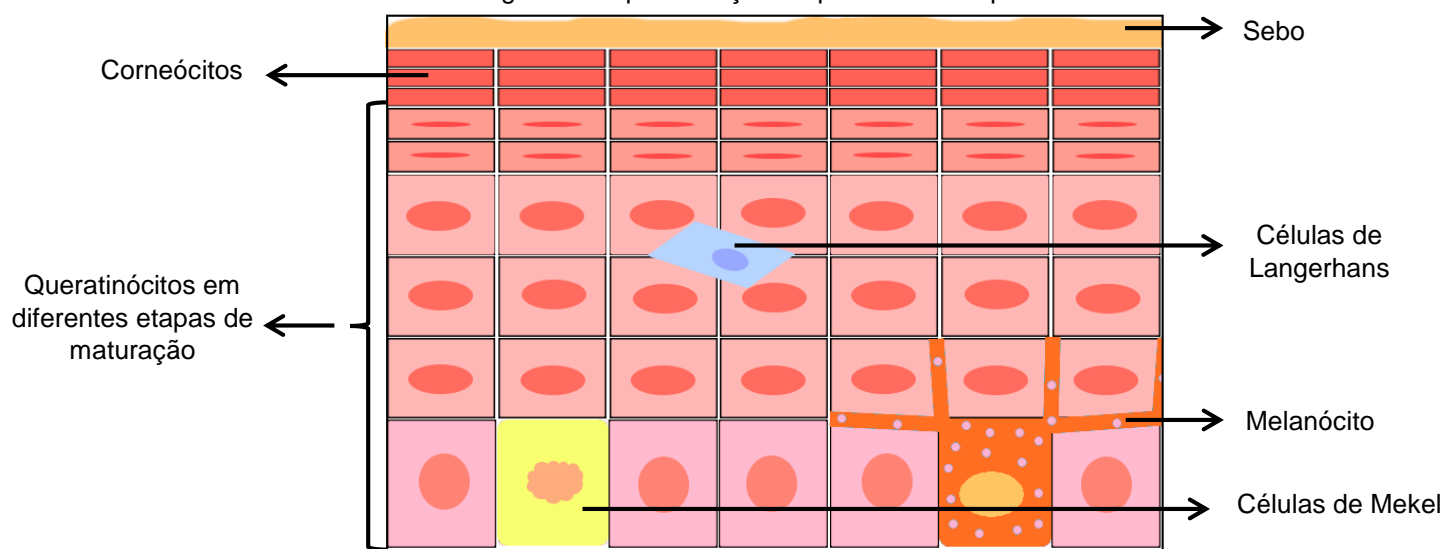
Os queratinócitos são as células mais abundantes e são eles os principais componentes da barreira epitelial. As células da camada basal são mitoticamente ativas e ficam aderidas à membrana basal, que separa a derme da epiderme. Essas se multiplicam e uma delas segue o caminho de diferenciação (na morfologia, na forma, na polaridade) que vai ocorrendo à medida que vão se deslocando para a camada mais superior da epiderme. Depois da camada basal vem à camada espinhosa, em seguida a granular e por último o estrato córneo. As células quando chegam nessa última camada entram no processo de morte celular e são conhecidas como corneócitos. Elas perdem suas organelas e seu núcleo, cessando toda sua atividade metabólica e transcripcional e sua matriz é preenchida por densos filamentos

de queratina, formando a camada da pele que fica em contato com o ambiente (DELAMBRA *et al.*, 2008).

Os melanócitos estão distribuídos regularmente na camada basal, e tem como função produzir melanina e transportá-la para os queratinócitos, sendo então os responsáveis pelo tom natural da pele. A melanina é uma proteína, encontrada como pigmento, dentro dos melanócitos, sendo o principal agente contra efeitos deletérios induzidos por raios UV (DELAMBRA *et al.*, 2008; MARESCA *et al.*, 2015).

As células de Langerhans são as responsáveis por reconhecer e eliminar antígenos que ultrapassam a barreira epidérmica. Geralmente, elas se localizam na camada espinhosa da epiderme (DELAMBRA *et al.*, 2008). As células de Mekel estão localizadas na camada basal, e são mecanoreceptores (DELAMBRA *et al.*, 2008).

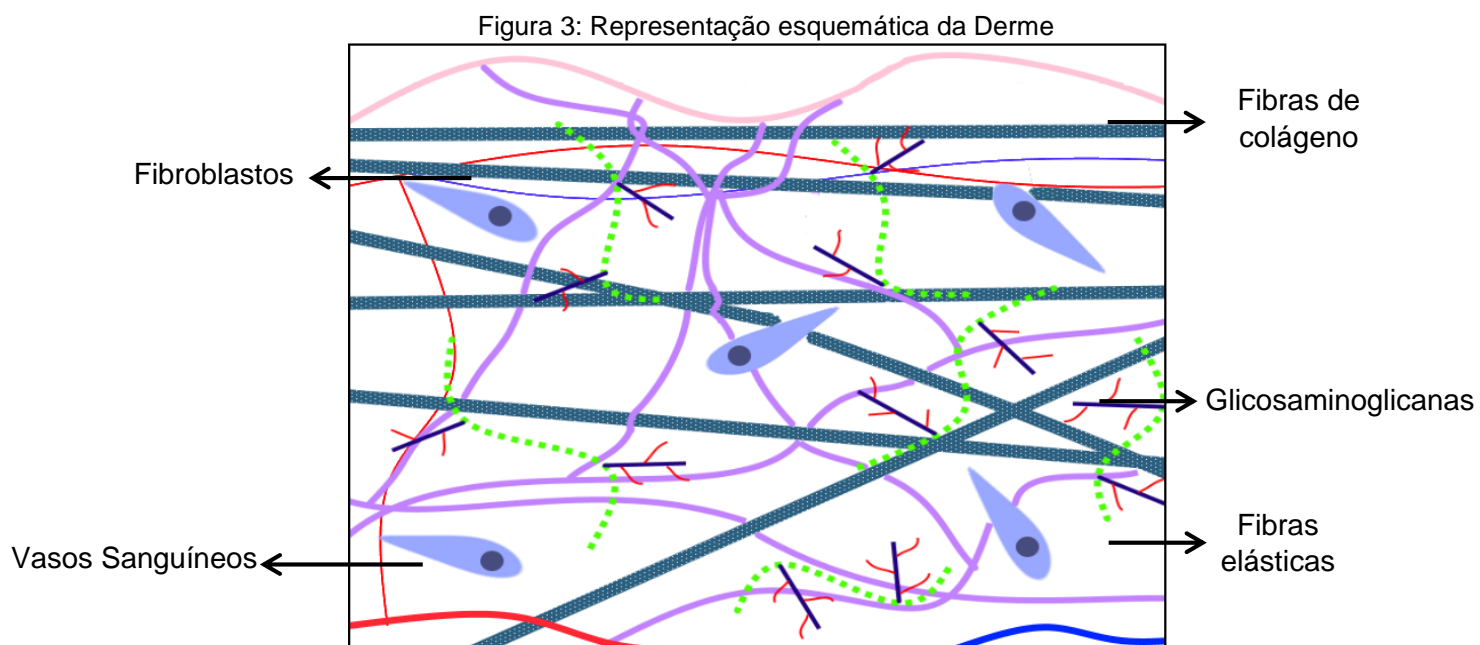
Figura 2: Representação esquemática da epiderme



Fonte: elaborado pelo autor

A derme (figura 3) se localiza abaixo da epiderme e ambas interagem formando a estrutura da pele. Ela pode ser dividida em 3 camadas: camada papilar, sub-papilar e reticular. É composta de diversos tipos celulares, nervos e vasos sanguíneos e pelos apêndices epidérmicos, como por exemplo, as glândulas sebáceas e sudoríparas. Além disso, sua maior parte é de tecido conjuntivo amorfo e componentes fibrosos e filamentosos, que formam a matriz extracelular (ECM). As camadas papilares e subpapilares são flexíveis, possuem finas fibras de colágeno, fibras elásticas, sendo rica em água. A camada reticular é mais rígida, pois as fibras de colágeno são mais espessas e se conectam entre si por fibras elásticas, formando uma rede mais complexa (DELAMBRA *et al.*, 2008; KUWAZURU *et al.*, 2007).

Dessa forma, a derme confere à pele a sua força estrutural e robustez, auxiliando em funções como proteção mecânica, estímulo sensorial e regulação térmica (DELAMBRA *et al.*, 2008). O principal constituinte celular da derme são os fibroblastos.



Fonte: elaborado pelo autor

Os fibroblastos são os responsáveis por produzir e organizar os componentes da matriz extracelular (ECM) da derme, que são as estruturas que conferem diversas características fundamentais para as funções da pele, são elas as fibras de colágeno, fibras elásticas e proteoglicanas e glicoproteínas. (NAYLOR *et al.*, 2011).

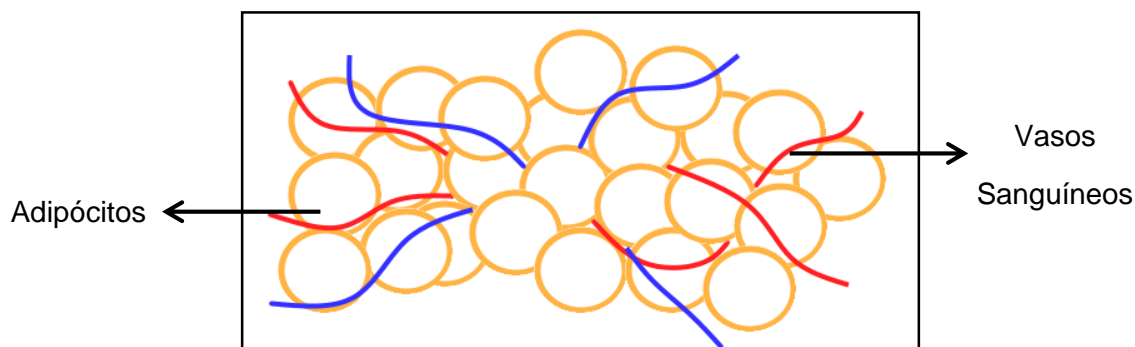
As fibras colágenas correspondem a 70% da massa seca da pele (BAUMANN, 2007). Responsáveis por conferir força tensil à pele, através de suas fibras com excelentes características de resistência mecânica. Dentre os diferentes tipos de fibras colágenas existentes na derme, os colágenos I e II são os mais abundantes (NAYLOR *et al.*, 2011).

As fibras elásticas são responsáveis pela capacidade da pele de deformar e, depois, se recolher para o estado anterior (NAYLOR *et al.*, 2011).

Por fim, as glicosaminoglicanas desempenham a função de manter a hidratação da pele, por serem cadeias polissacarídicas que possuem a capacidade de se ligar a um volume de água 1000 vezes maior que o seu. O principal componente dessa classe é o ácido hialurônico (BAUMANN, 2007; NAYLOR *et al.*, 2011).

A última camada da pele é a hipoderme (Figura 4). Ela é a camada subcutânea, composta por células gordurosas que auxiliam nas funções de termorregulação, armazenamento e provisionamento de energia e proteção mecânica (DELAMBRA *et al.*, 2008).

Figura 4: Figura esquemática da Hipoderme



Fonte: elaborado pelo autor

3.1.2 Envelhecimento Cutâneo

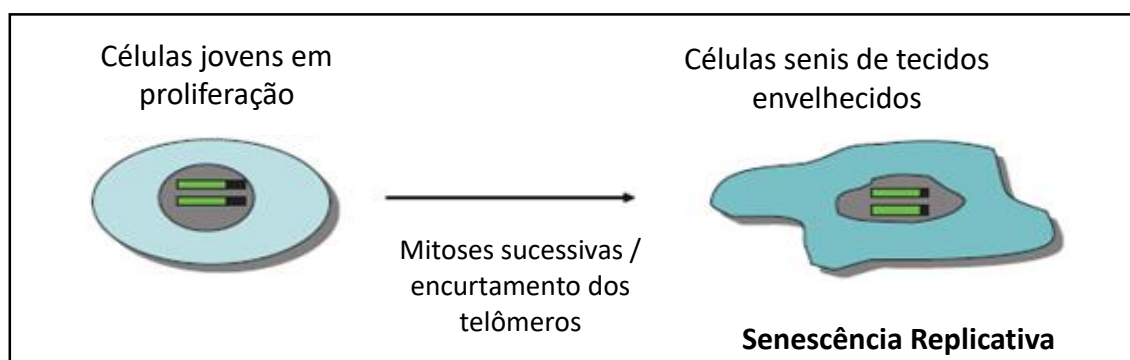
Muitos são os sinais clínicos do envelhecimento cutâneo, que conferem uma aparência envelhecida, como a perda de elasticidade da pele, a irregularidade na sua superfície, a flacidez, o aparecimento de rugas, entre outros (TAKUR *et al.*, 2008). O processo é multifatorial e ocorre por 2 caminhos simultâneos: um é o envelhecimento intrínseco, que é inevitável e se dá pelas alterações genéticas cronológicas, na qual a renovação das células da pele se torna mais lenta, entrando em um quadro conhecido como senescência celular; e outro é o envelhecimento extrínseco, que é regido por fatores externos, como raios ultravioletas, poluição, estilo de vida, hábito de fumar etc. Todos esses fatores fazem com que alterações se manifestem na pele, causando a aparência envelhecida (NAYLOR *et al.*, 2011; BAUMANN, 2007).

O principal motivo do envelhecimento intrínseco, segundo diversos pesquisadores, é o encurtamento dos telômeros, que ocorre com o avanço da idade (DELAMBRA *et al.*, 2008; ROCHETTE *et al.*, 2010; BAUMANN, 2007; RAMOS-E-RAMOS-E-SILVA *et al.*, 2013). Os telômeros são sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA) presentes na porção final de cada cromossomo das células, e sua erosão é resultante de processos contínuos de replicação, sendo considerado um “relógio” interno de envelhecimento. Na senescência replicativa (Figura 5) é observado tanto o encurtamento dos telômeros quanto uma mudança de

morfologia celular (BAUMANN, 2007; DELAMBRA *et al.*, 2008; RAMOS-E-SILVA *et al.*, 2013).

Além disso, os telômeros são estruturas sensíveis a agentes externos, como, por exemplo, radiação ultravioleta UV, apresentando-se 7 vezes mais sensíveis que qualquer outra região da fita de DNA. Esse fato pode levar a senescência celular prematura (Figura 5), onde há mudança na morfologia da célula (DELAMBRA *et al.*, 2008; ROCHETTE *et al.*, 2010). Quando uma célula entra em senescência é reparado por enzimas chamadas telomerasas, e a permanência dessas estruturas nos cromossomos aumenta o período de vida celular (BAUMANN, 2007; RAMOS-E-SILVA *et al.*, 2013). Porém não é clara a presença dessas enzimas em todas as células do corpo, contudo, essas enzimas já foram encontradas em queratinócitos basais e no bulbo dos folículos pilosos, mas parece não estarem presentes nos fibroblastos

Figura 5: Processo de Senescência celular



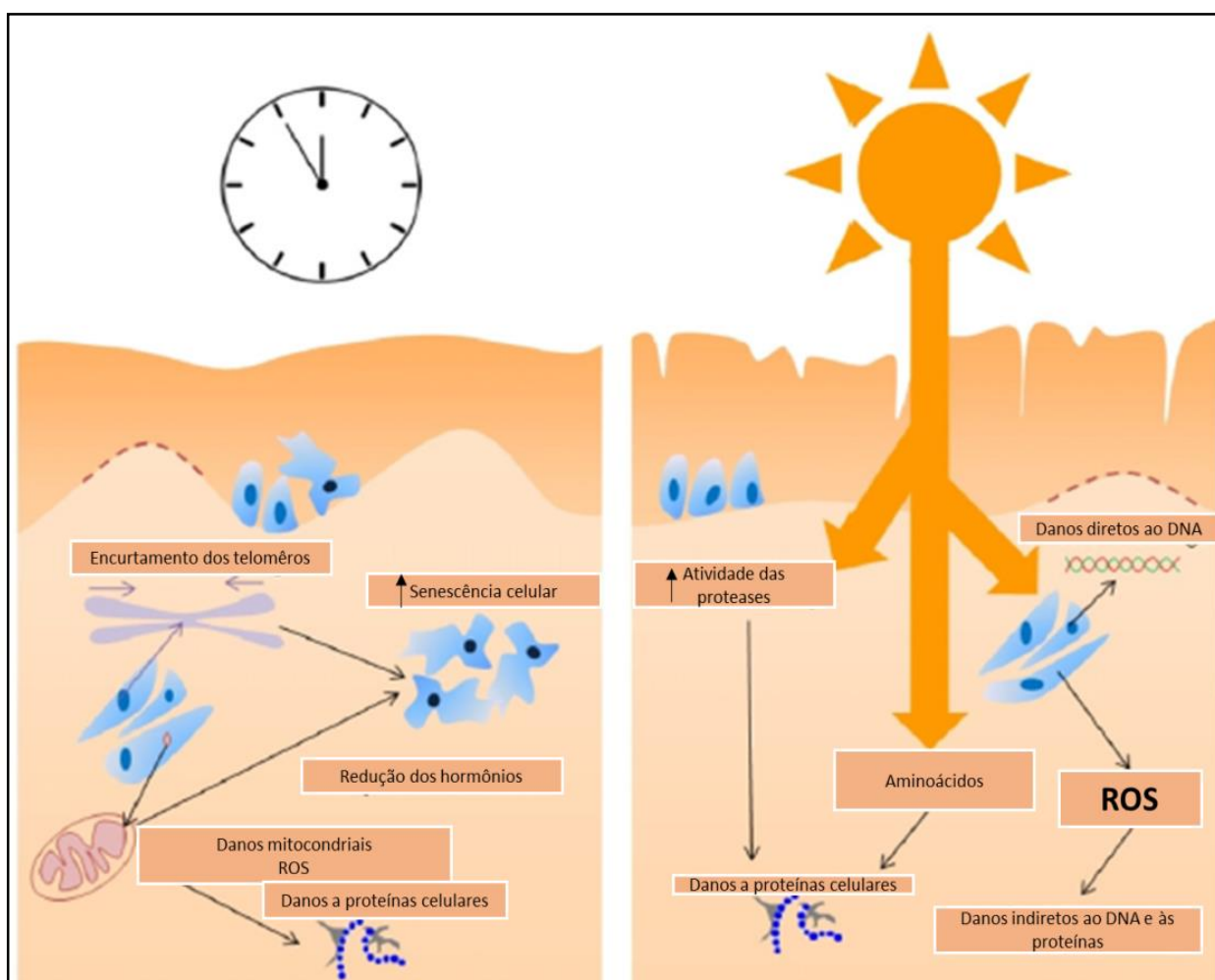
Fonte: BUCKINGHAM, 2011

Além do encurtamento dos telômeros, ainda existem outros fatores relacionados ao envelhecimento intrínseco, como a etnia, que está relacionada a diferentes pigmentações da pele, variações anatômicas, diferentes espessuras da pele dependendo da região do corpo, e mudanças hormonais, como por exemplo, na menopausa na qual a pele se torna mais fina e menos hidratada (RAMOS-E-SILVA *et al.*, 2013). Por outro lado, o envelhecimento extrínseco é algo controlável, já que é resultante de fatores externos, tanto do meio ambiente como do estilo de vida. Porém, uma exposição crônica não controlada a esses fatores pode causar o envelhecimento precoce. A principal causa do envelhecimento extrínseco é a exposição aos raios UV do sol, mas outras causas também devem ser consideradas como o hábito de fumar,

consumo excessivo de álcool, dieta, qualidade do sono, poluição, entre outros (RAMOS-E-SILVA et al., 2013; BAUMANN, 2007)

A Figura 6 ilustra a diferença entre esses dois tipos sinérgicos de envelhecimento cutâneo, usando como exemplo o processo de envelhecimento dos fibroblastos. A esquerda da Figura 6 vê-se o processo de envelhecimento intrínseco, onde ocorre o encurtamento dos telômeros e o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), resultantes dos danos do DNA mitocondrial. Além disso, a senescência celular pode dar origem a células com uma capacidade de proliferação reduzida, com fenótipo diferente, alterando a produção da matriz extracelular (ECM). Já no lado direito da Figura 5 observa-se o fotoenvelhecimento extrínseco, com danos no DNA dos fibroblastos e com danos diretos às proteínas da ECM, causando o envelhecimento precoce (NAYLOR *et al.*, 2011).

Figura 6: Envelhecimento intrínseco x envelhecimento extrínseco



Fonte: adaptado de NAYLOR et al., 2011

As consequências desses processos de envelhecimento são citadas na tabela 1.

Tabela 1: Funções e mudanças com a idade dos componentes e sistemas da pele

Célula/componente/sistema	Função	Mudança com idade
Queratinócitos	Diversas já citadas	Diminuição na proliferação e diferenciação, sinalização, função de barreira
Melanócitos	Síntese de pigmento para proteção UV	Diminuição do número de melanócitos
Células de Langerhans	Apresentação antigênica	Diminuição na quantidade e função imune
Fibroblastos	Síntese e degradação da ECM	Diminuição a quantidade de fibroblastos
Colágeno	Componente da ECM	Diminuição da biossíntese
Elastina	Componente da ECM	Diminuição a biossíntese
Inibidores de metaloproteínas	Protege quebra de colágeno e elastina	Diminuição da função
Vascularização dérmica	Termoregulação	Perda estrutural
Gordura subcutânea	Termoregulação e depósito de energia	Perda estrutural
Sistema endócrino – vit. D	Proteção UV e homeostase do cálcio	Diminuição da produção
Sistema endócrino – estrogênio	Aumenta a vascularização e espessura da pele, melhora a quantidade e qualidade do colágeno.	Diminuição da produção
Sistema nervoso	Sensações, termorregulação	Diminuição da inervação da face e diminui tolerância ao frio

(Fonte: adaptado de RABE *et al.*, 2006)

3.2 Formulações Antienvelhecimento

Existem diferentes estratégias para prevenção e amenização dos sinais do envelhecimento cutâneo. No caso das rugas, um dos sinais mais aparentes que os

consumidores buscam tratar, elas são resultado de alterações na camada dérmica, mais especificamente alterações em 3 estruturas chave: colágeno, elastina e ácido hialurônico. Muitos dos produtos comercializados hoje em dia visam ação nessas estruturas, porém é muito complexo se obter sucesso na administração de formulações cosméticas topicamente aplicadas, pois seus princípios ativos nem sempre conseguem atingir as camadas mais profundas pele. Sendo assim, a prevenção do envelhecimento extrínseco é ainda a melhor escolha quando comparada à estratégia de amenizar os sinais já existentes (BAUMANN, 2007).

A exposição aos raios UV e outros fatores externos do dia-a-dia causa danos diretamente no núcleo das células, formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ainda outros radicais livres, que promovem a oxidação de ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e outras estruturas presentes no local onde é formado, além de interagir com fatores de transcrição intracelulares que controlam informações genéticas do DNA e RNA. A pele possui antioxidantes naturais que combatem os radicais livres, porém nem sempre isso é o suficiente para evitar todos os danos formados. Por mais que seja impossível reverter os fatores genéticos associados ao envelhecimento intrínseco, as alterações resultantes do envelhecimento extrínseco podem ser evitadas ou retardadas (BURKE, 2008; PALMER, 2010).

A ação exacerbada dos radicais livres constantemente formados, geralmente resultado de uma exposição crônica às radiações UV, leva ao estresse oxidativo, que é uma condição na qual ocorre um desequilíbrio entre a formação dos radicais livres e a capacidade do sistema biológico de neutralizá-los imediatamente ou de reparar os danos causados imediatamente. Com isso, esses danos se acumulam e começam a surgir sinais de uma aparência envelhecida da pele, como por exemplo, rugas, manchas escuras, textura ressecada e perda de elasticidade (BURKE, 2008; PALMER, 2010).

Para que a condição do estresse oxidativo, principal causador do envelhecimento extrínseco, seja prevenida, existem algumas medidas possíveis que podem ser tomadas, são elas: evitar exposição ao sol pelo uso de protetores solares, evitar a prática de fumar e poluição, ter uma dieta rica em frutas e legumes, e fazer uso de suplementos antioxidantes orais ou tópicos (BAUMANN, 2007).

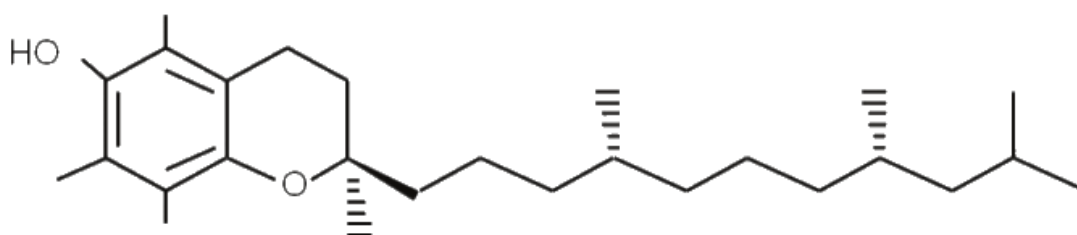
O uso de filtros solares é essencial, porém não é suficiente. A aplicação de antioxidantes tópicos é uma estratégia de suplementação, já que o poder natural do corpo de combater essas espécies reativas não é intensa o bastante. Não só esses

antioxidantes evitam novos danos de ocorrer, como também revertem os já existentes (BURKE, 2008; PALMER, 2010). Por conta disso, muitos dos produtos antienvhecimento possuem em sua formulação algum componente antioxidante.

São muitos os antioxidantes utilizados em formulações cosméticas antienvhecimento, podendo ser eles de origem natural ou sintética, por exemplo vitamina C e E, co-enzima Q10, selênio, ácido ferúlico, chá verde, *Aloe Vera*, idebenona, picnogenol, *Camellia sinensis* L., dentre outros (BURKE, 2008; MUKHERJEE *et al.*, 2011.)

A vitamina E é um conhecido agente antioxidante com efeito de neutralização de radicais livres. Na natureza existem 8 compostos que podem ser denominados como vitamina E, são eles os β -, α -, γ - e δ -tocoferóis e tocotrienóis, porém o mais abundante, mais potente e mais explorado não só em pesquisas, mas também comercialmente, é o α -tocoferol, que é o princípio ativo utilizado neste estudo (YENILMEZ *et al.*, 2011; KHAYATA *et al.*, 2012; NEGRETTO *et al.*, 2013).

Figura 7: estrutura química do α -tocoferol

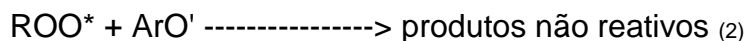
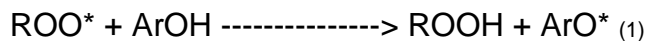


A vitamina E é frequentemente utilizada em produtos de cuidado com pele, tanto por sua capacidade umectante quanto pelo combate ao envelhecimento cutâneo por possuir uma poderosa ação antioxidante (NEGRETTO *et al.*, 2013).

A ação de neutralização de radicais livres pelo α -tocoferol ocorre nos compartimentos lipofílicos do corpo, visto a característica hidrofóbica da sua estrutura. Portanto, a defesa mais específica realizada por este composto é contra a peroxidação lipídica, que pode ocorrer nas membranas celulares das células da pele, que está diretamente exposta a ambientes pró-oxidativos (radiação UV, poluentes, etc) (YENILMEZ *et al.*, 2011).

Uma molécula de α -tocoferol é capaz de neutralizar 2 radicais peroxidil, responsáveis pela iniciação de oxidação lipídica, o que protege a membrana celular e retarda o processo de envelhecimento cutâneo (KHAYATA *et al.*, 2012).

Ingold e colaboradores demonstraram o poder como terminador de cadeia medindo a constante da taxa de inibição das reações em cadeia pela vitamina E de radicais livres, pela auto oxidação mediada por radicais em cadeia de estireno, no qual a extração do hidrogênio é o fator limitante da reação (MCCAY, 1985).



A liberação de ativos na pele por produtos tópicos é um desafio por conta das características de barreira do estrato córneo que tem como consequência deposição dos princípios ativos na superfície da pele e sua baixa estabilidade, sobretudo das vitaminas, por direta exposição à radiação UV. Por isso, a técnica de encapsulação de princípios ativos é comumente utilizada na área de cosmetologia e dermatologia (YENILMEZ *et al.*, 2011).

A vitamina E é um ativo instável, pela sua fácil degradação por oxidação, por isso, sua encapsulação oferece diversas vantagens, como por exemplo: evita-se que o ativo esteja em contato direto com os tecidos de aplicação, o que culmina em menor chance de irritação no local de aplicação, proteção da vitamina E de fatores ambientais aos quais ela é sensível (exposição à luz, calor e oxigênio) (YENILMEZ *et al.*, 2011; NEGRETTO *et al.*, 2013).

Todavia, não é apenas com a ação do princípio ativo que devemos nos preocupar. Os produtos destinados à aplicação na pele têm sua ação em diferentes locais do tecido e o sucesso de sua aplicação depende de sua atividade e sua concentração no alvo. Além disso, sua eficiência também deve ser significativa, pois se o ativo for apresentado ao corpo em um veículo não adequado ou em uma concentração errada, ele não consegue desempenhar sua função corretamente (LODÉN, 2014).

3.3 Nanotecnologia Em Cosméticos

A nanotecnologia é uma ciência em ascensão dada a sua multidisciplinaridade, que oferece aplicações em diversas áreas. Uma das áreas mais exploradas é a de aplicações biomédicas. Para esse tipo de aplicação esses dispositivos em nano escala são desenvolvidos para interagirem com células e tecidos a nível molecular de forma que não era possível anteriormente (SILVA, 2004).

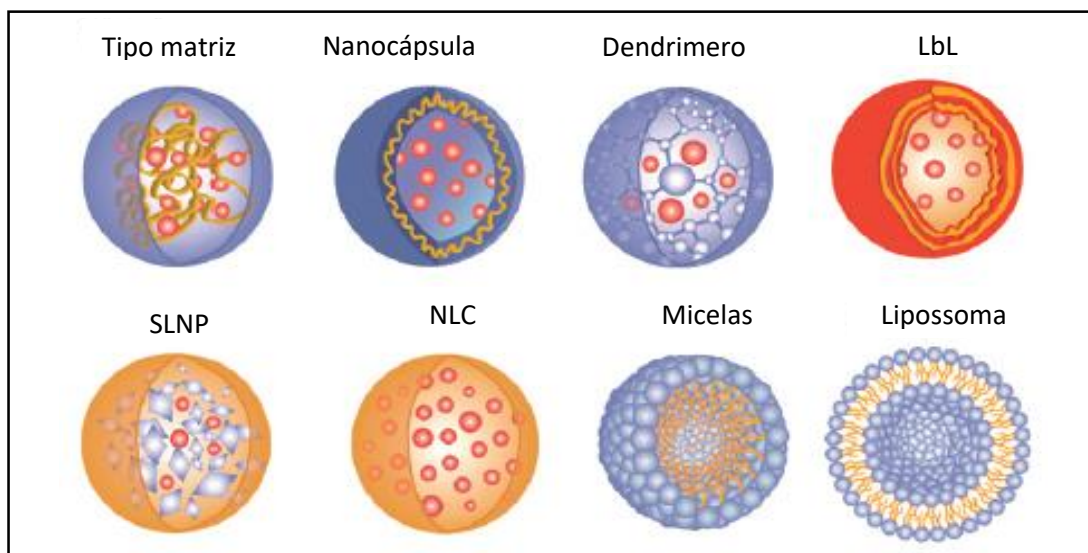
A indústria de cosméticos realiza grandes investimentos na área de nanotecnologia, já que partículas na nanoescala oferecem propriedades diferenciadas

aos produtos quando comparadas as de escalas maiores, como por exemplo: cores mais intensas, qualidade de acabamento, penetração mais profunda na pele, efeitos mais duradouros, entre outros (RAJ *et al.*, 2012).

Os processos de transportes biológicos são influenciados pelos atributos físico-químicos nos nanocarreadores, tais como seu tamanho, formato, flexibilidade, ligantes para reconhecimento em receptores biológicos. Dentro do contexto de formulações cosméticas, esses nanocarreadores são utilizados como um princípio ativo (TiO₂, ZnO em filtros solares por exemplo), como veículo para liberação de um ativo ou como um aditivo de formulação, podendo veicular vitaminas, antioxidantes, filtros químicos UV, substâncias anti-acne e antienvhecimento, dentre outros (ELSABAHY *et al.*, 2012; MIHRANYAN *et al.*, 2012). Segundo Nasir (2010), partículas até 1000nm são capazes de penetrar na pele íntegra saudável.

As possibilidades de sistemas nanoestruturados para aplicações cosméticas são diversas e podemos citar: as nanopartículas e nanocápsulas poliméricas, as nanocápsulas de múltiplas camadas (LbL), nanopartículas lipídicas (sendo esses lipídeos sólidos - SLNP ou líquidos - NLC), nanoemulsões, nanocristais, micelas, dendrímeros, lipossomas, dentre outros, como mostra a Figura 8.

Figura 8: Exemplos de nanocarreadores usados como veículos de liberação

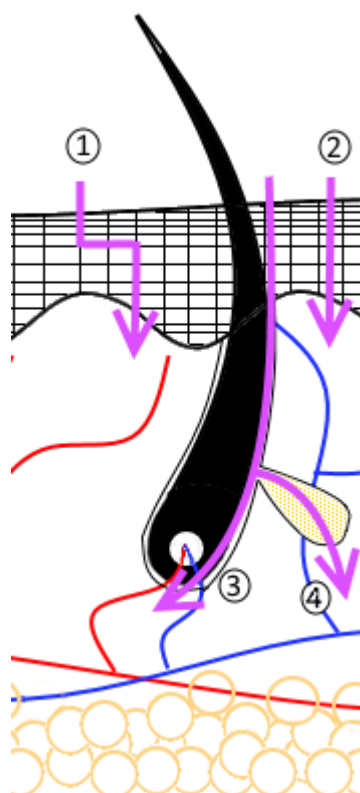


Fonte: MIHRANYAN *et al.*, 2012.

Os nanosistemas e os ativos podem penetrar na pele por 3 vias: transcelular (através das células), intercelular (pelos espaços entre as células) e via apêndices cutâneos, como folículos pilosos e glândulas sebáceas, como mostra a Figura 9.

O estrato córneo possui características lipofílicas, e representa a principal barreira à penetração, e é seguido de outras camadas da epiderme que contém diferentes polaridades, mas em geral é um ambiente mais aquoso. Portanto, para que a penetração seja possível até camadas mais profundas, a nanopartícula tem que ser compatível com todos os compartimentos os quais ela passará. Ou seja, suas características de tamanho, lipofilicidade e carga são importantes fatores a serem levados em consideração (SCHNEIDER *et al.*, 2009; MIHRANYAN *et al.*, 2012).

Figura 9: Vias de penetração na pele íntegra



Fonte: adaptado de SCHAFFAZICK *et al.*, 2003

Entretanto, ainda existem poucas informações disponíveis sobre a penetração dos produtos contendo nanotecnologia na pele, e mesmo já existindo uma imensa quantidade de produtos no mercado, os potenciais riscos para a saúde humana e do meio ambiente ainda não foram vastamente estudados (SCHNEIDER *et al.*, 2009; FORLONI, 2012).

Contudo, o desenvolvimento de carreadores de princípios ativos, na escala nanométrica, é interessante pois permite um sistema de liberação modificada, no qual o carreador serve como um depósito de ativo que é liberado lentamente no tecido alvo, mantendo um nível constante. Isso é vantajoso do ponto de vista terapêutico, uma vez que, pode aumentar a eficácia terapêutica, minimizando as concentrações

de ativo no local de ação, reduzindo o número de administração do ativo, seja para fins terapêuticos ou cosméticos, aumentando a adesão do paciente (PAPAKOSTAS *et al.*, 2011).

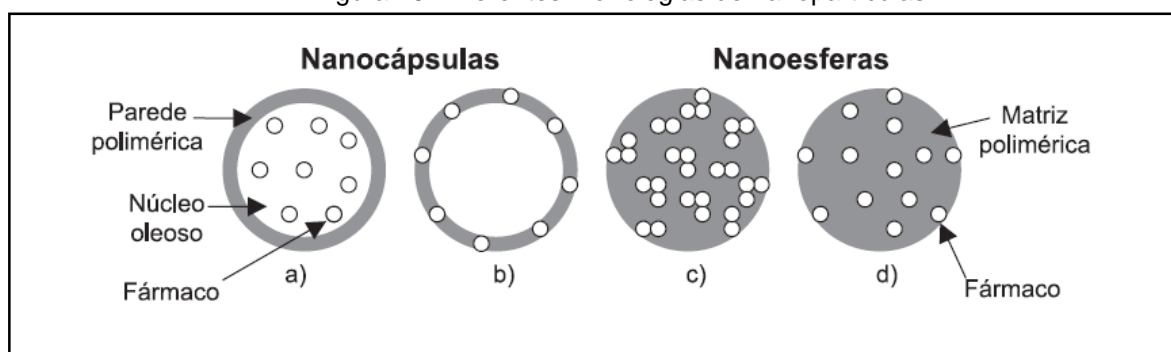
3.3.1 Nanopartículas Poliméricas

As nanopartículas poliméricas são estruturas complexas, produzidas a partir de diversos tipos de polímeros ou copolímeros, por ligação cruzada ou revestimento superficial. As suas propriedades físico-químicas podem ser seletivamente modificadas, aumentando sua estabilidade e alterando o perfil de liberação de ativos, podendo se atingir uma liberação sustentada (PAPAKOSTAS *et al.*, 2011).

A utilização das nanopartículas na área biomédica pode ser muito vantajosa por diversos motivos e dentre eles, pode-se pontuar: (a) polímeros são agentes capazes de modular a liberação do ativo, promovendo uma cinética de liberação modificada; (b) o tamanho das nanopartículas sendo próximo ao das moléculas biológicas pode permitir a integração com unidades celulares; (c) as nanopartículas podem proteger e estabilizar formulações com compostos lábeis (SIMONE *et al.*, 2008).

As nanopartículas podem se apresentar como nanoesferas ou nanocápsulas (Figura 10). As nanocápsulas possuem o centro oleoso e uma membrana polimérica e, geralmente, são estabilizadas por tensoativos. Já as nanoesferas são compostas por uma matriz polimérica que contém os componentes ativos. Uma distribuição de tamanhos estreita e monomodal é crucial para garantir a qualidade nanotecnológica. Elas possuem algumas vantagens quando comparadas a formulações convencionais como aumento de solubilidade, maior absorção de ativos, boa estabilidade, biodegradabilidade e boa tolerabilidade. (GUTERRES *et al.*, 2007; POLLETO *et al.*, 2011; MONTENEGRO, 2014).

Figura 10: Diferentes morfologias de nanopartículas



Essas partículas podem ser desenvolvidas com polímeros de fonte natural ou sintética. Existem alguns polímeros naturais que podem ser usados em cosméticos como a celulose, quitosana, entre outros. A vantagem é a baixa toxicidade desse tipo de material. Se tratando de polímeros sintéticos para aplicação biomédica, inclusive para aplicação tópica, é importante que polímero seja biocompatível e biodegradável. Dentre os eles, os mais utilizados são o poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido lático – co – glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), dentre outros (MIHRANYAN *et al.*, 2012).

Apesar das nanopartículas poliméricas estarem recebendo atenção diferenciada devido a sua versatilidade, existe a preocupação com a citotoxicidade e acumulação de nanopartículas, um olhar especial está sendo dado aos polímeros biodegradáveis. (PAPAKOSTAS *et al.*, 2011; ELSABAHY *et al.*, 2012).

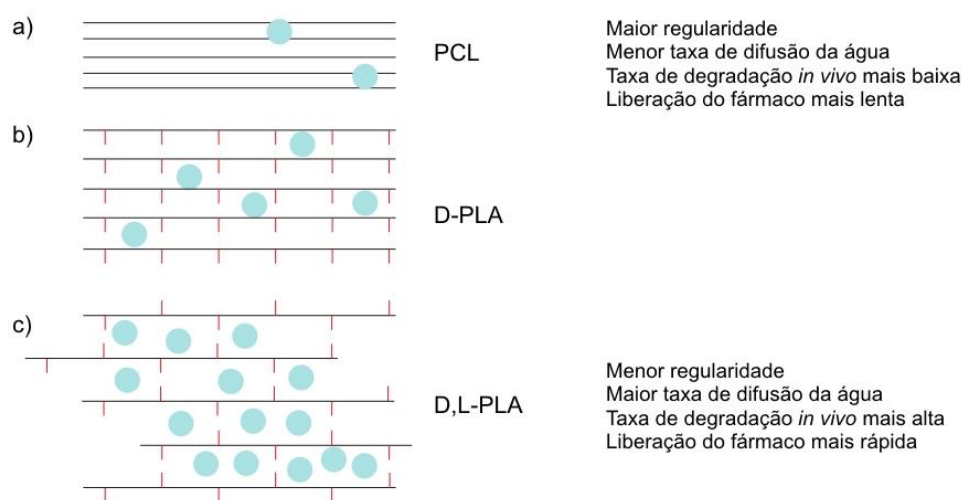
Outro fator importante a ser considerado no desenvolvimento das nanopartículas são as características físico-químicas dos polímeros. Por exemplo, a figura 11 mostra a influência da cristalinidade na permeabilidade à água de 3 polímeros: PCL, D-PLA e D, L-PLA. Pode ser observado que, quando os polímeros são mais cristalinos, existe uma maior regularidade em suas cadeias e, com isso, a taxa de difusão de água é menor, e a taxa de degradação *in vivo* também é menor, conferindo uma liberação do ativo mais lenta. Já quando se opta pela utilização de polímeros mais amorfos, com cadeias menos regulares, existem mais espaços vazios para uma maior difusão da água, o que aumenta a taxa de degradação *in vivo* e a liberação do fármaco é mais rápida (SIMONE *et al.*, 2008).

Também é possível modular a cinética liberação do ativo e a sua eficácia por meio de alterações químicas na partícula, as quais podem promover reconhecimento biológico, melhorar a biodistribuição, bioadesão, melhores perfis de biocompatibilidade e biodegradabilidade. Além disso, diferentes métodos de obtenção produzem partículas de tamanhos, estrutura, morfologia, superfícies diferentes, influenciando as suas propriedades. Portanto, a escolha do polímero, do fármaco, dos adjuvantes e do método de obtenção é crucial para obter um tipo de sistema específico para uma determinada aplicação.

3.3.2.Método Emulsão – Difusão

Existem vários métodos de preparação de partículas poliméricas. Quando se compara técnicas de obtenção de partículas a partir da polimerização de monômeros

Figura 11: Esquema representativo da regularidade das cadeias poliméricas de PCL, D-PLA e D, L-PLA e a difusão da água pelas mesmas



Fonte: TAVARES, 2016.

com a utilização de polímeros pré-formados, esta última é mais vantajosa, pois os parâmetros são mais fáceis de controlar e costuma ter maior rendimento. As técnicas já descritas nesse contexto são: emulsificação-*evaporação* do solvente, por deslocamento do solvente, por *salting-out* e por difusão do solvente (SOUTO *et al.*, 2012).

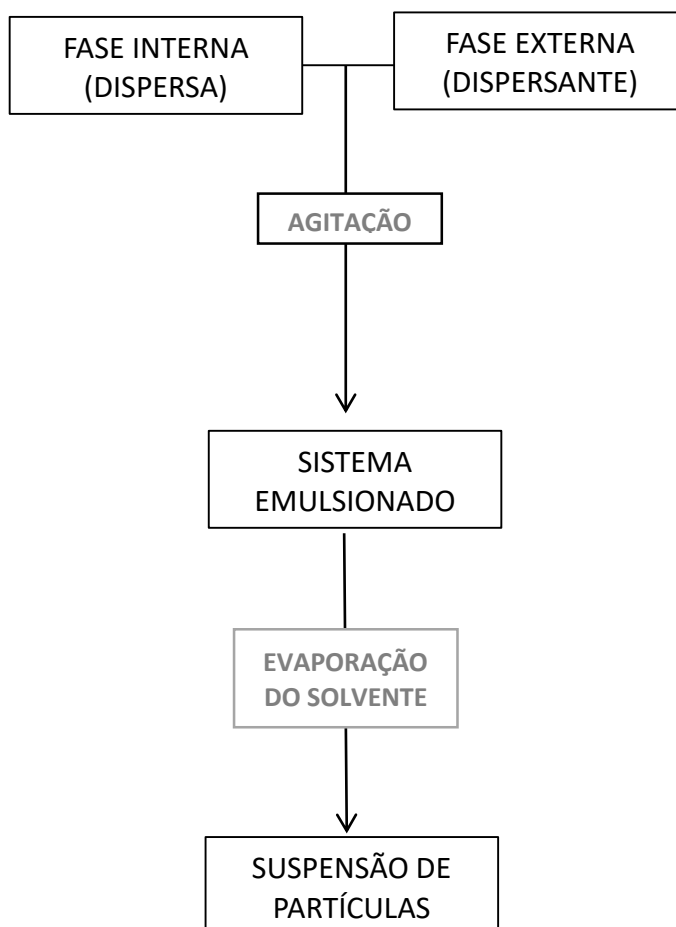
Esse método consiste em obter as nanopartículas a partir de um sistema emulsionado. Um sistema emulsionado é formado por duas fases líquidas imiscíveis, onde a fase interna está em menor concentração, e a externa está em maior concentração, estabilizado por uma molécula anfifílica, um tensoativo. O tensoativo é capaz de reduzir a tensão superficial das fases, tornando possível a dispersão de gotículas da fase interna na fase externa. Nesse método, os solventes utilizados como uma das fases e os tensoativos podem ser tóxicos, portanto, sua escolha deve ser feita com cuidado de acordo com a aplicação desejada (GOU *et al.*, 2011).

Esse método pode ser dividido em 2 etapas: a primeira consiste na preparação de um sistema emulsionado, onde as gotículas da fase interna são o *template* através do qual as nanopartículas serão formadas. Na segunda etapa ocorre a *evaporação* do solvente das gotículas e, conseqüente, precipitação do polímero que antes estava dissolvido nele, ocasionando a formação das partículas, como mostra o Figura 12 (ANTON *et al.*, 2008; VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; GIRAUD *et al.*, 2013).

Com a evaporação do solvente da fase interna é formada uma suspensão de partículas poliméricas. A estabilidade dessa suspensão pode ser afetada por diversos fatores, porém partículas em tamanhos submicrons tendem a sedimentar mais lentamente, o que confere uma maior estabilidade. Todavia é possível que ocorra agregação das partículas, reduzindo a sua estabilidade (GUTERRES *et al.*, 1995).

Outro fator importante a ser considerado é que o tamanho e a morfologia das partículas obtidas são similares ao das gotículas pós-evaporação do solvente. Segundo Galindo-Rodriguez e colaboradores (2004), isso sugere que cada partícula formada corresponde a uma gotícula da emulsão, e o tamanho da gotícula é determinante na definição do tamanho da partícula. Para se obter gotículas menores e, conseqüentemente, partículas menores muitas vezes é necessária a utilização de agitação mecânica de alta energia, para aumentar o cisalhamento da fase interna, porém, pode aumentar o custo do processo (GOU *et al.*, 2011).

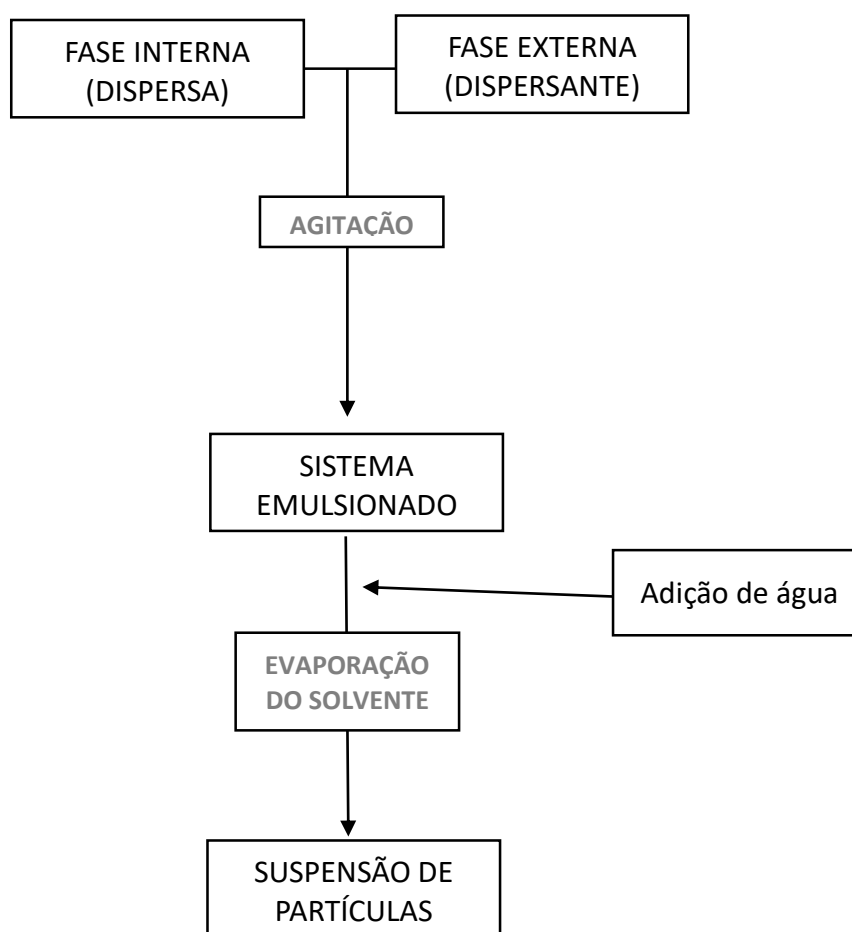
Figura 12: Esquema geral de obtenção de nanopartículas



Fonte: Elaborado pelo autor

No esquema geral de obtenção de nanopartículas, o sistema é composto por uma fase aquosa e uma fase orgânica. A fase aquosa é formada por água e tensoativo, já a fase orgânica por um solvente orgânico, o polímero e o fármaco. Essas duas fases são misturadas, sob agitação, o que gera uma emulsão resultante. Em seguida, para a fase de evaporação do solvente, se adiciona mais água ao sistema, de forma que ele fique mais diluído. Após a evaporação, se obtém uma suspensão de nanopartículas sólidas em água.

Figura 13: Esquema do método emulsão-difusão

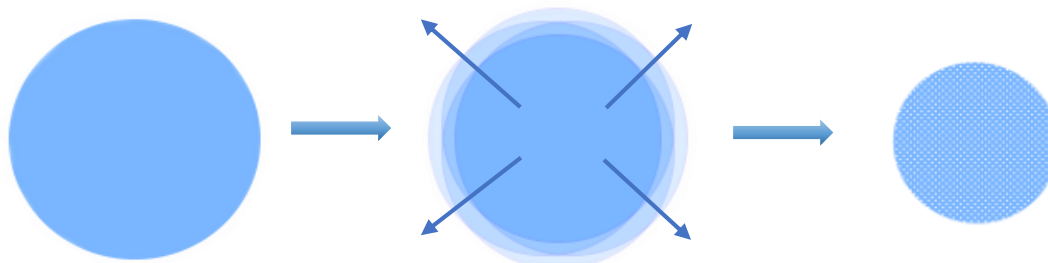


Fonte: GUINEBRETIERE *et al.*, 2002

No caso do método de emulsão-difusão (Figura 13), o solvente orgânico utilizado é parcialmente miscível com a água, o que facilita a difusão do mesmo para a abundante fase externa aquosa. Durante esse processo, o tamanho inicial das gotículas da emulsão é reduzido, por conta da rápida difusão do solvente para a fase aquosa, resultante da parcial miscibilidade com a água, conforme ilustrado na Figura 14. A difusão seguida da evaporação do solvente permite, enfim, a precipitação do

polímero e consequente formação da partícula (VAUTHIER; BOUCHEMAL, 2009; HASSOU *et al.*, 2009).

Figura 14: Ilustração da evaporação do solvente



Fonte: elaborado pelo autor

Segundo Vauthier & Bouchemal (2009), alguns fatores podem influenciar o tamanho da partícula obtida pelo método de emulsão-difusão, como por exemplo:

- Miscibilidade do solvente com a água: quanto maior a miscibilidade entre as duas fases, mais rápida é a difusão do solvente para a fase aquosa externa, e reduzem as chances de ocorrerem instabilidades que aumentem o tamanho das gotículas;
- O aumento da velocidade de agitação reduz o tamanho de partícula;
- O aumento de concentração do tensoativo reduz o tamanho de partícula;
- O aumento da concentração de polímero aumenta o tamanho de partícula, assim como sua polidispersão.

3.3.3 Liofilização

Para a obtenção das partículas na forma de pó, é necessário que elas passem por uma etapa de secagem. A fim de se estudar as partículas em forma de sólida, foi escolhida a técnica de liofilização.

A liofilização consiste em uma técnica na qual se remove a água da amostra congelada por sublimação e dessorção, sob vácuo. Esse processo gera diferentes tipos de estresse no material durante o congelamento e secagem, portanto, geralmente se utiliza componentes que protegem a formulação, como os crioprotetores (ABDELWAHED *et al.*, 2006).

Durante o congelamento a porção líquida da suspensão é resfriada e cristais de água pura vão se formando. A medida que o processo continua, mais água pura vai sendo congelada, causando um aumento de concentração do líquido restante. Isso

acarreta um aumento de viscosidade que inibe a continuação da cristalização da água remanescente. Essa porção restante, rica em partículas, se solidifica, formando uma fase amorfa e/ou cristalina. Essa alta concentração de partículas é o que pode induzir agregação e, em alguns casos, fusão irreversível de partículas. Além disso, o congelamento também pode gerar um estresse mecânico das partículas, desestabilizando o sistema (ABDELWAHED *et al.*, 2006).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

- Poli(ácido láctico), 1240 g/cm³ (Nature Works – Igeo 4043D)
- Poli(etilenoglicol)-b-poli(propilenoglicol)-b-poli(etilenoglicol), Pluronic® F-68 (poloxamer), Mn 8.400 g/mol (Sigma-Aldrich®)
- Vitamina E galênica (Farmácia Universitária – UFRJ)
- Diclorometano (Sigma-Aldrich®)
- Etanol (Sigma-Aldrich®)

4.2 Equipamentos:

- Analisador termogravimétrico, TA Instruments, TGA Q500 - V6.7 Build 203 (IMA/UFRJ);
- Difrátômetro Rigaku Ultima IV Zetasizer Nano S90 (Malvern Instruments)
- Calorímetro diferencial de varredura, Rigaku, modelo TAS 100, EUA.
- Espectômetro de infravermelho, Perkin Elmer Spectrum Versão: 10.4.2, Frontier FT-IR/FIR (IMA/UFRJ);
- Liofilizador, Liotop, L101 (IMA/UFRJ);
- Metalizador com alvo de platina (Leica EM ACE600)
- Microscópio eletrônico de varredura Quanta FEI 250
- Zetasizer Nano S90 (Malvern Instruments)

4.3 Método

O método utilizado para a obtenção das nanopartículas de PLA foi o método de emulsão-difusão, ilustrado na Figura 15.

A fase orgânica tem como componentes 40mL de água e 4,8mg (4% p/p) poloxamer F-68 como tensoativo do sistema. A concentração de tensoativo PF68

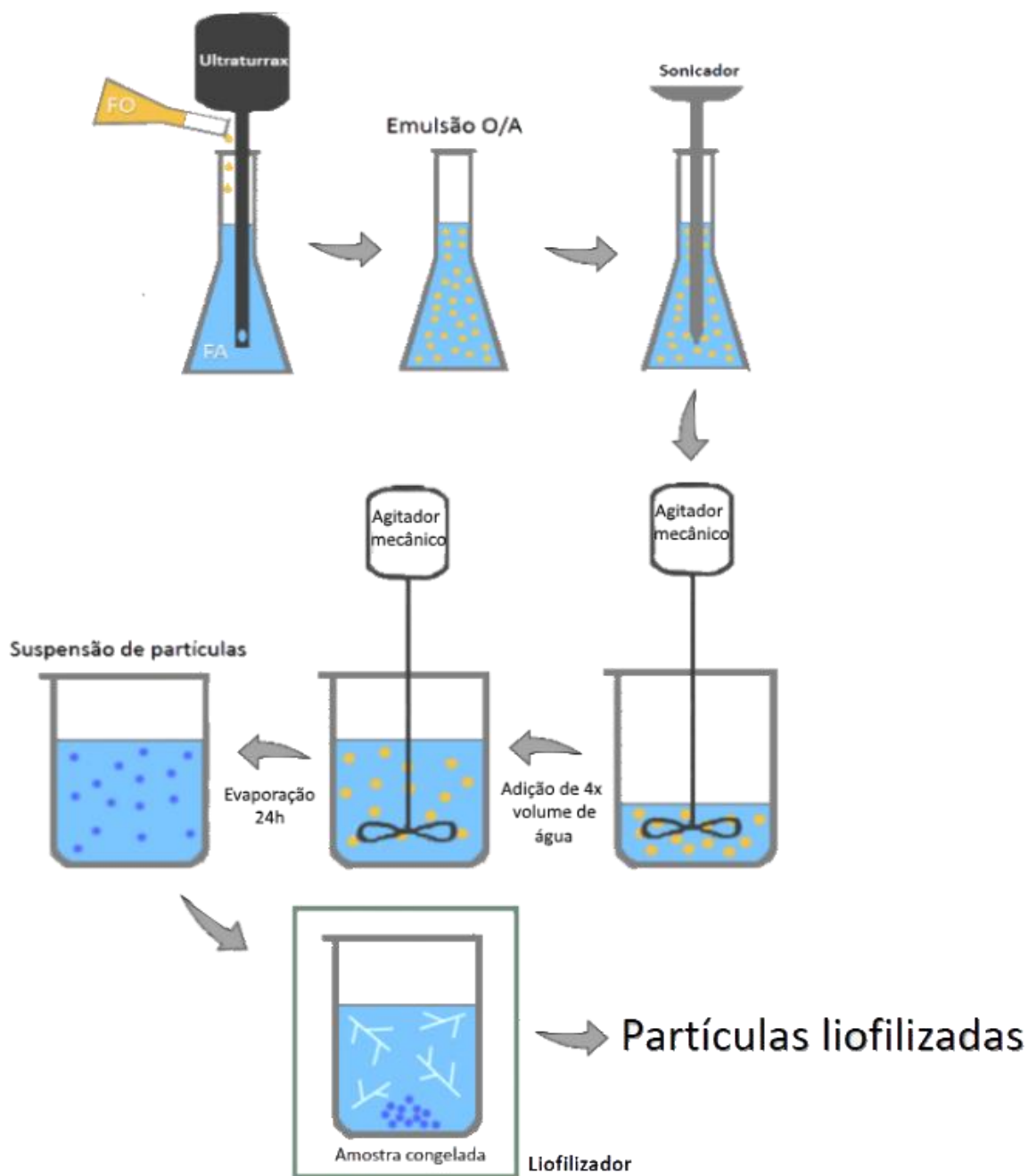
precisou ser ajustada para melhor estabilidade da emulsão resultante do método. Com a utilização da concentração (w/v) do método descrito por (LIU, *et al.*, 2005; RAVIKUMARA; TIYABOONCHAI; MADHUSUDHAN, 2013), houve separação de fase em um curto período de tempo. Portanto, foi feito um estudo, no qual foram testadas as concentrações (w/w), como descreve o estudo de (GUINEBRETIERE *et al.*, 2002) de 1 - 4% (w/w) de PF68 em relação à quantidade de PLA do sistema, e a concentração que apresentou resultado satisfatório de estabilidade pelo período de tempo necessário para a preparação da emulsão foi a de 4%.

A fase orgânica foi preparada a partir de uma mistura de solventes: diclorometano (DCM), que dissolve os 120mg PLA, e o etanol, que desempenha a função como co-solvente a fim de melhorar a miscibilidade do DCM com a água. A proporção usada de DCM:etanol foi de 2:1 e, a partir dessa solução, 20mL foram usados na preparação da emulsão. No sistema com o ativo, a vitamina E foi adicionada na fase orgânica na proporção de 10:1 polímero:vitamina E. A função do etanol como co-solvente está relacionada a uma adaptação do método de emulsão-difusão. Uma das características deste método é o solvente utilizado na fase orgânica, que deve ser parcialmente miscível com a água para que a difusão ocorra de forma adequada nas etapas subsequentes. Porém o PLA utilizado neste estudo, não se mostrou solúvel em solventes orgânicos puros desta natureza e, por isso, foi feita uma mistura binária de DCM, que é completamente imiscível com a água, e etanol, miscível com a água, a fim de gerar um efeito melhor de miscibilidade das fases componentes da emulsão, assim, o processo de difusão dessa mistura para a fase externa aquosa ser facilitada durante a etapa de evaporação do solvente (RAVIKUMARA; TIYABOONCHAI; MADHUSUDHAN, 2013)

Para a preparação da emulsão, a fase orgânica foi gotejada sobre a fase aquosa sob agitação de Ultra Turrax® T-18 na potência de 11.000 rpm, sob banho de gelo para que o aquecimento causado pela agitação de alta energia não fosse o suficiente para evaporar o solvente. Em seguida, a emulsão foi submetida a ultrassom de ponteira com 60% de sua potência (potência máxima de 500w) para redução das gotículas durante 3 minutos, também sob banho de gelo.

Para a fase de evaporação, foram colocados 240 mL de água destilada (4 vezes o volume da emulsão) em um bécher e, sob agitação mecânica, a emulsão foi vertida

Figura 15: Ilustração do método de emulsão-difusão



nesse volume de água, para que o etanol presente na fase interna arraste o diclorometano, sob temperatura ambiente. O elevado volume de água auxilia nesse processo de difusão do solvente para a fase externa aquosa para que a gotícula de PLA solidifique e as partículas serem formadas. Após 24 horas de evaporação, sob temperatura ambiente e agitação mecânica, parte das suspensões de partículas foram estocadas para posteriores caracterizações e a outra parte foi congelada em

Ultrafreezer (LIOTOP) a temperatura de -68 °C a -72 °C por, aproximadamente 1 hora e, em seguida, colocado no Liofilizador para o processo de secagem a uma temperatura de -49 °C e pressão de 72 mmHg por 96h.

4.4 Caracterização Dos Sistemas

4.4.1 Difração de Raios-X (XRD)

Foram obtidos difratogramas do PLA, do poloxamer, das nanopartículas de PLA e das nanopartículas de PLA com vitamina E, por meio do difratômetro Rigaku Ultima IV, com monocromador de cobre ($\text{CuK}\alpha$ $\lambda = 1.54\text{\AA}$) e detector contador de cintilação. As análises foram feitas a temperatura ambiente em 40 kV, 20 mA, 0,01°/s e a faixa de análise compreendeu de $2\theta = 1,2^\circ$ a 60° . O cálculo da cristalinidade das amostras deu-se através do método de Rulland utilizando o software Fitky.

4.4.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi utilizada para caracterizar o perfil de degradação do PLA, do poloxamer e dos sistemas desenvolvidos. As medidas de TGA foram obtidas através do equipamento Analisador Termogravimétrico TGA Q-500 da marca TA Instruments, no intervalo de aquecimento de 40 a 700 °C, com taxa de aquecimento de 10°C/min.

4.4.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As amostras de PLA, de poloxamer, das nanopartículas de PLA e PLA com vitamina E foram analisadas sob o fluxo de N_2 de 50 ml/min, com a taxa de aquecimento de 10°C/min e na faixa de -80°C até 250°C.

Os valores das entalpias e das temperaturas de fusão e cristalização (ΔH_f e ΔH_c , T_m e T_c) obtidos por DSC foram utilizados no cálculo do grau de cristalinidade de cada material (X_c). O X_c foi calculado segundo a equação abaixo:

$$X_c \% = \frac{H_f}{\Delta H_{f100\%}} \cdot 100$$

O ΔH_f é a entalpia de fusão da amostra determinada experimentalmente e $\Delta H_{f100\%}$ é a entalpia de fusão do pla hipoteticamente 100% cristalino. Para calcular a cristalinidade dos materiais, o calor de fusão do polímero 100% cristalino foi extraído da literatura ($\Delta H_{f100\%} = 93 \text{ J/g}$) (apud PEREIRA; MORALES, 2014).

4.4.4 Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram efetuadas na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , analisadas a 25°C, em aparelho Perkin Elmer Spectrum versão: 10.4.2 e modelo Frontier FT-IR/FIR, com cristal de seleneto de zinco, utilizando KBr para análise das nanopartículas.

4.4.5 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O diâmetro médio hidrodinâmico da partícula e o índice de polidispersão referente à distribuição do tamanho foram determinados por espalhamento dinâmico de luz, utilizando o equipamento Zetasizer Nano S90 (Malvern Instruments). Foram analisadas as amostras liofilizadas e a suspensão de partículas. A fim de garantir uma total homogeneização das amostras ressuspensas, foi utilizado um agitador de soluções (ultrassom de banho) continuamente durante 3 minutos. Todas as amostras foram analisadas a uma temperatura de 25 °C.

4.4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

A análise de SEM foi realizada com o objetivo de identificar a morfologia das nanopartículas desenvolvidas. Para tal, as amostras em forma de pó foram fixadas na superfície de *stubs* metálicos com auxílio de uma fita de carbono que apresenta a superfície adesiva e condutora. Os *stubs* contendo as amostras foram levados ao metalizador com alvo de platina (Leica EM ACE600) e recobertas no mesmo com uma camada de aproximadamente 20 nm de ouro a fim de torná-las condutoras e possibilitar a obtenção das imagens.

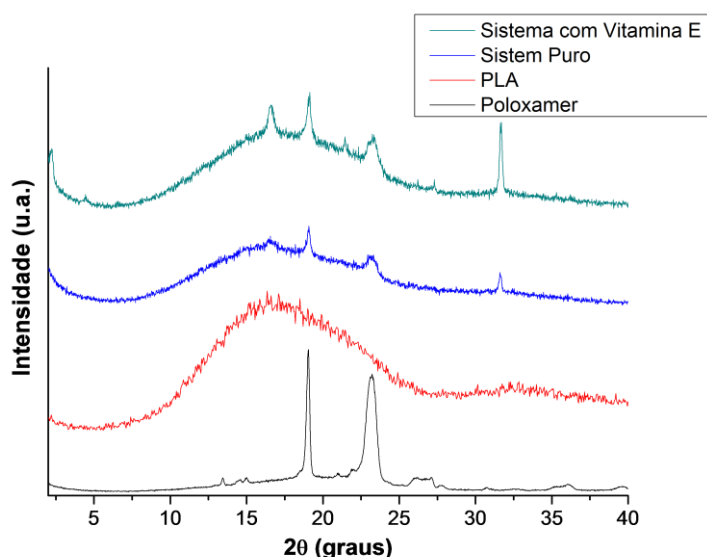
As imagens das amostras foram obtidas a partir do uso do detector de elétrons secundários (ETD) e utilizou como diferença de potencial 20 kV para a aceleração dos elétrons. As análises foram realizadas no Microscópio eletrônico de varredura Quanta FEI 250.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Difração de Raios-X - XRD

Na análise de Difração de Raios-X foi observado o perfil cristalino dos polímeros puros e dos sistemas desenvolvidos. Na Figura 16, a seguir, são mostrados os difratogramas.

Figura 16: Difratograma de Raio-X dos sistemas e polímeros puros



No difratograma do PLA puro, aparentemente a contribuição amorfa é elevada, por não serem observados picos estreitos que são característicos de materiais cristalinos. No estudo de Kuchnier (2014), o mesmo perfil de pico largo no eixo 2θ foi observado e foi concluído que há uma clara contribuição amorfa, assim como nos resultados obtidos. A fim de analisar e confirmar o perfil cristalino deste material, o grau de cristalinidade foi ainda calculado por DSC, cujos resultados serão discutidos em seguida.

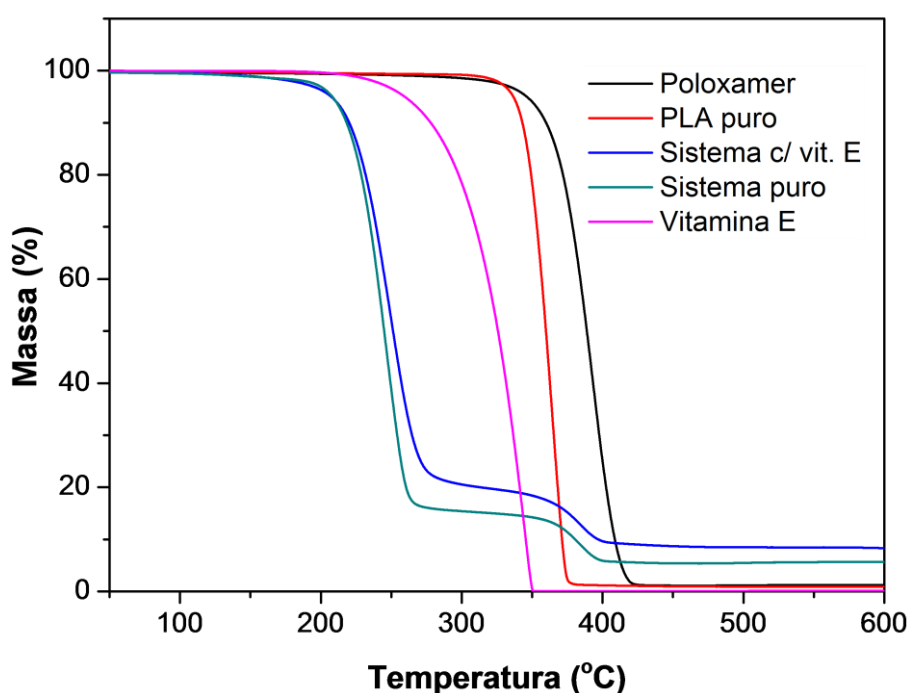
Quando se observa os difratogramas, os picos referentes à presença do poloxamer e do PLA são identificados nos sistemas, o que indica que realmente houve uma mistura física dos dois polímeros puros. Porém, outros picos só são detectados no sistema puro e no sistema com vitamina E. Então, de alguma forma a mistura física do poloxamer com o PLA mudou o perfil cristalino dos sistemas, resultando em picos que só aparecem nos difratogramas dos mesmos, efeito esse que é exacerbado no sistema com vitamina E. Já que o aparecimento desses picos é observado em ambos os sistemas desenvolvidos, ele é provavelmente resultado do método de preparação das partículas, mais especificamente no momento da formação da partícula sólida.

Em relação à tendência do grau de cristalinidade, o sistema puro se mostrou menos cristalino que o sistema com vitamina E. Uma das explicações para esse efeito, segundo Hyvonen *et al.* (2005), é a rápida evaporação do solvente orgânico e rápida precipitação do polímero no sistema, não tendo este tempo para se organizar. A consequência é a queda nos valores de cristalinidade do sistema. Já no sistema com vitamina E, por ela se apresentar na forma de óleo, a evaporação do solvente hidrofóbico desse sistema (DCM) está ocorrendo de forma mais lenta quando comparada ao sistema puro, o que permite um tempo maior para as cadeias se organizarem durante essa etapa de, a ponto de resultar em maior cristalinidade do sistema que contém a vitamina oleosa (HYVÖNEN *et al.*, 2005).

5.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi utilizada com o intuito de avaliar o perfil de degradação dos componentes puros e dos sistemas desenvolvidos a fim de comparar os resultados. Além disso, checar se é observado decaimento em baixas temperaturas, característico de presença de solvente orgânico nos sistemas, e a perda de massa característica de água. A seguir, na Figura 17, estão os termogramas dos polímeros puros, da vitamina E e dos sistemas.

Figura 17: Termogramas dos componentes puros e dos sistemas desenvolvidos



Foram obtidos os parâmetros T_{onset} (temperatura na qual se inicia o processo de degradação), T_{peak} (temperatura correspondente à maior perda de massa) e a quantificação do resíduo de cada material (Tabela 2).

Tabela 2: T_{onset} , T_{peak} e resíduo dos componentes puros e dos sistemas

MATERIAL	T_{ONSET}	T_{PEAK}	RESÍDUO
PLA PURO	346°C	325°C	0,94%
POLOXAMER	410°C	393°C	1,53%
VITAMINA E	308°C	343°C	0
SISTEMA PURO	240°C	246°C	11,28%
SISTEMA COM VIT. E	374°C	383°C	
	250°C	250°C	10,43%
	384°C	380°C	

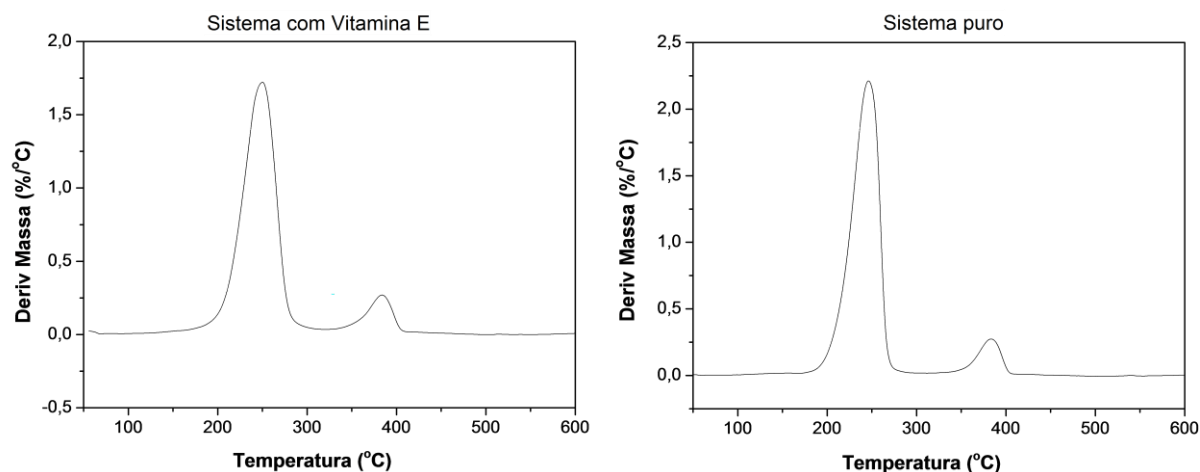
Na análise dos termogramas, das T_{onset} e T_{peak} obtidas pela técnica do TGA, é possível observar que os sistemas desenvolvidos possuem uma menor resistência térmica quando comparados aos polímeros puros, já que ambos começam a degradar em temperaturas mais baixas. Isso pode ser justificado pela forma como esses materiais se apresentam: os polímeros puros são pellets e a vitamina E um óleo denso, enquanto os sistemas se encontram em forma de pó fino. Sendo assim, o calor oriundo da técnica de TGA se difunde mais rapidamente pelos sistemas em pó do que pelos outros componentes em pellet e em óleo, o que faz com que ele se degrade em temperaturas menores, já que fundem mais homoganeamente.

Quando são avaliados os sistemas, também é observado que eles geram resíduo ao final da análise. Esse resíduo pode ser resultado das alterações nas características dos polímeros e novas interações nos sistemas resultantes do processo de preparação e secagem das partículas, que tem como consequência um diferente perfil de degradação diferenciado. Visto que todos os componentes dos sistemas têm sua estrutura química basicamente carbônica, é possível que o resíduo seja carbono.

Na análise dos termogramas dos sistemas, ocorrem dois eventos de degradação, comportamento esperado já que são misturas físicas dos componentes utilizados em sua preparação. O primeiro evento, mais significativo, possivelmente está relacionado com o PLA, já que compõe a maior parte dos sistemas e possui T_{onset} menor que o poloxamer, que pode ser relacionado com o segundo evento de perda,

menos significativo. Isso fica evidente quando se observa as Derivadas das perdas de massa dos sistemas (dTGs), demonstradas a seguir, na Figura 18. Quanto a vitamina E, é possível que ela esteja sofrendo degradação juntamente com o PLA, já que sua T_{onset} é mais próxima ao do PLA que aquela correspondente ao poloxamer.

Figura 18: dTGs dos sistemas desenvolvidos

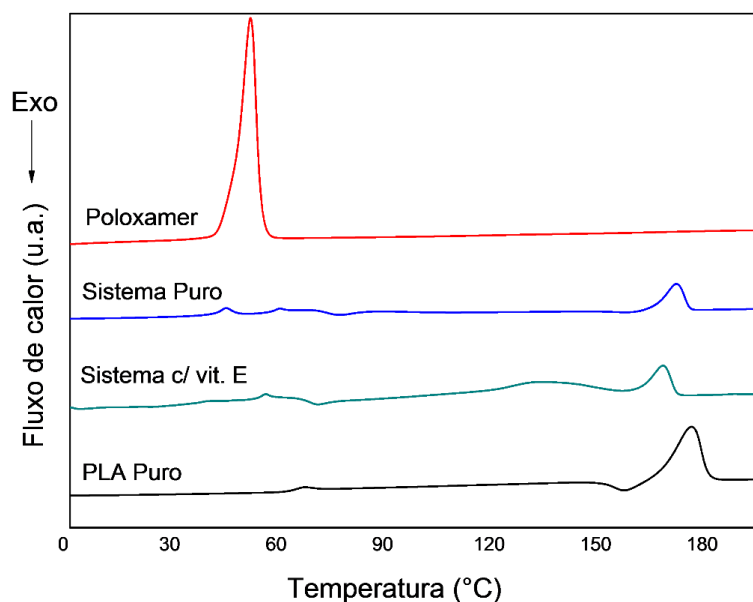


Por fim, não se observa perda de massa correspondente à solvente orgânico ou água nos sistemas, o que indica que o processo de evaporação do solvente e a liofilização foram eficazes na retirada destes em ambos os sistemas. Além disso, não é possível observar a presença dos solventes orgânicos utilizados na preparação das partículas nas caracterizações dos sistemas, pois sua pressão de vapor é menor que as do DCM e do etanol. Portanto, se a liofilização foi capaz de remover a água dos sistemas, ela também se torna perfeitamente capaz de remover os resíduos de solventes presentes neles.

5.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Os dados da técnica de calorimetria diferencial de varredura foram obtidos da primeira corrida de todos os materiais, já o que se busca é analisar como os componentes usados no preparo das partículas interagiram entre si através da sua história térmica. Na Figura 19, a seguir, estão representados os gráficos referentes aos polímeros puros e os sistemas desenvolvidos.

Figura 19: Calorimetria diferencial de varredura dos polímeros e dos sistemas.



Na avaliação dos polímeros puros, vê-se que o PLA apresenta, em forma de uma descontinuidade da linha base do gráfico, sua temperatura de transição vítrea (T_g) em 66°C e sua temperatura de fusão (T_m) em 175°C . Próximo à T_m , há um pico exotérmico, em 156°C , característico dos poliésteres, que passam por uma reorganização de cadeia antes de fundir. Já o poloxamer, apresenta apenas o pico referente à T_m , na temperatura de 51°C .

Em ambos os sistemas é possível se observar que há contribuição de ambos os polímeros puros que os compõem em forma de uma mistura física, já que estão presentes picos separados de fusão com T_m de valor próximo às vistas nos gráficos dos polímeros puros.

No gráfico correspondente ao sistema puro, se observa 4 manifestações térmicas, sendo elas três picos endotérmicos (44°C ; 59°C ; 171°C) e um pico exotérmico ($76,1^\circ\text{C}$). Os dois primeiros picos podem estar relacionados à diferentes organizações das cadeias do poloxamer oriundas do método de preparo da partícula, pelo qual essas cadeias se organizaram de forma a criar 2 populações de cristais, uma composta por cristais menores ou menos perfeitos na temperatura de 44°C , e outra de cristais maiores e/ou mais perfeitos que fundem na temperatura de 59°C . O pico mais intenso do gráfico é o que se apresenta na temperatura de 171°C . Este está relacionado ao PLA presente no sistema, por ser o componente em maior quantidade e pela temperatura próxima ao valor do PLA puro utilizado no preparo da partícula. O deslocamento do pico da T_m está relacionado com o método de preparo e também

ao fato do sistema ser uma mistura física entre dois polímeros, o que faz com que as cadeias de PLA não se organizem tão bem como no seu estado puro e, por isso, cristais menores e/ou menos perfeitos são criados na matriz da partícula correspondente ao PLA, diminuindo, assim a sua temperatura de fusão.

No sistema com vitamina E também são observadas 4 transições térmicas, porém de perfis diferentes daquelas vistas no sistema puro. Elas ocorrem nas temperaturas 55,7°C, 132,8°C, 167,2°C (endotérmicas) e 69,9°C (exotérmica). Assim como no sistema puro, a mistura física do poloxamer e do PLA resultaram em menores valores de T_m . Porém a diferença é que, quando se observa os picos correspondentes à contribuição do poloxamer e do PLA, no sistema com vitamina E, ocorre o oposto: vê-se um pico referente ao poloxamer que se apresenta na temperatura de 52,7°C, e outros referentes ao PLA, nas temperaturas de 132,8 °C e 167,2°C. Ou seja, nesse sistema, o poloxamer possui apenas uma população de cristais menores e/ou menos perfeitos que os vistos no poloxamer puro. Já o PLA possui duas populações de cristais ambas de cristais menores e menos perfeitos quando comparadas com o PLA puro.

Os picos exotérmicos vistos no PLA puro e nos sistemas desenvolvidos ocorrem devido à uma característica dos poliésteres de realizar rearranjo das cadeias antes de fundir. Por isso, antes da T_m é possível observar um pico que se assemelha com um evento de cristalização, mas que, na realidade, é o rearranjo característico referente ao PLA presente nos sistemas.

Quando se avalia a intensidade dos picos referentes ao PLA nos dois sistemas, é observado que o sistema com vitamina E possui dois picos, enquanto o sistema puro possui apenas um pico. Sendo assim, a presença da vitamina E no sistema promoveu novas interações com o PLA, de forma que favoreceu o melhor empacotamento das cadeias, aumentando assim a cristalinidade do sistema. Isso pode ser confirmado com o cálculo da cristalinidade através da entalpia de fusão desses picos em questão (Tabela 3).

Dessa forma, na análise por DSC se observou que os polímeros puros mudam seus perfis térmicos ao serem submetidos ao método de obtenção das partículas. Além disso, vê-se que a vitamina E favorece um melhor empacotamento do PLA do sistema, quando comparado ao sistema puro, o que pode ser vantajoso quando se trata de liberação mais lenta do ativo, já que, como já dito anteriormente, quanto mais

cristalino o sistema, maior é a dificuldade de liberar o ativo, promovendo uma liberação mais lenta do mesmo.

Tabela 3: Graus de cristalinidade determinados por DSC

MATERIAL	GRAU DE CRISTALINIDADE (X_c)
PLA	23%
Sistema puro	10%
Sistema com Vitamina E	25%

Os resultados obtidos por DSC, corroboram com os obtidos por DRX, já que através do cálculo de grau de cristalinidade pela entalpia dos sistemas, se observou que o sistema com vitamina E de fato é mais cristalino que o sistema puro. Porém, o grau de cristalinidade do PLA puro, que não foi detectável por DRX por conta do halo de contribuição amorfa do polímero, é possível ser calculado pela técnica de DSC. Com isso, quando compara X_c do PLA puro com o do sistema puro, pode ser observado que o método de preparo das partículas tem consequências nos perfis cristalinos dos polímeros utilizados.

5.4 Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR foi realizada com o objetivo de obtenção de dados referentes à incorporação do PLA, poloxamer e da vitamina E nos sistemas de partículas desenvolvidos. Observa-se no espectro de FTIR que as bandas correspondentes aos polímeros puros e à vitamina E estão presentes também nos espectros dos sistemas preparados, o que é um indicativo da presença dos polímeros e o ativo utilizados na obtenção nas partículas em questão. Todavia, existem bandas dos componentes puros que se sobrepõem no espectro (Figura 20). Por isso, é importante a avaliação do número de onda de cada pico característico para melhor determinar quais bandas correspondem à qual componente em cada um dos sistemas.

Quando se compara os sistemas desenvolvidos com os componentes puros, se observa a presença das bandas características descritas tanto na literatura quanto nos resultados obtidos na análise, como descrito nas tabelas 4 a 6 abaixo.

Figura 20: espectros FTIR dos componentes puros e dos sistemas puro e com vitamina E.

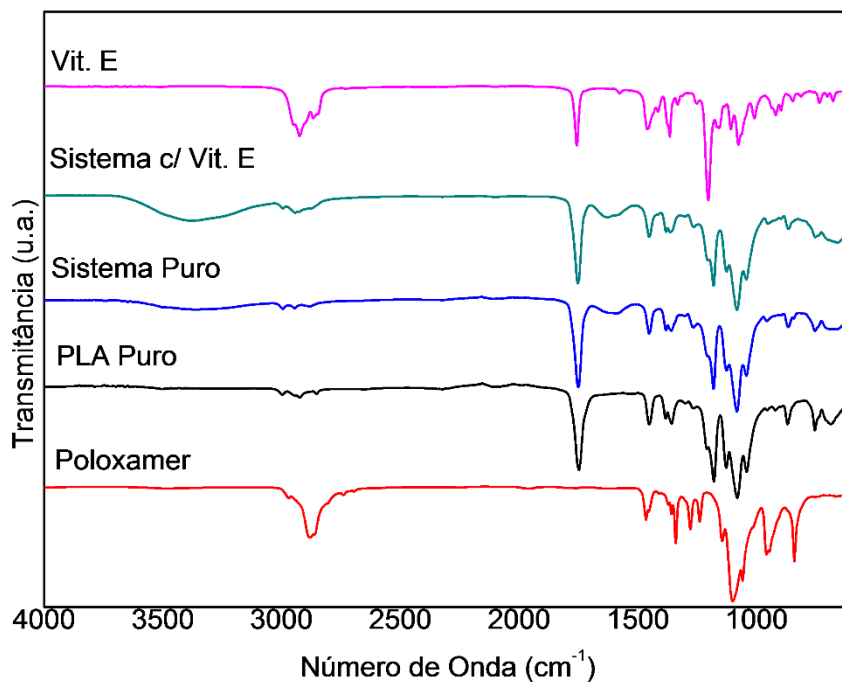


Tabela 4: espectros FTIR da vitamina E da literatura e utilizado na dissertação

<i>Vitamina E</i>			
Dados da literatura (cm ⁻¹)	Resultados obtidos - Vit. E pura (cm ⁻¹)	Resultados obtidos - Sistema com vit. E (cm ⁻¹)	Grupo funcional
3470	-	-	O-H (estiramento)
1260, 1209	1204,24	1264,68	C-O-C (referente ao grupo fenol)
1212	1204,24	-	C-O-H
1378	1366,13	1364,78	metil
1090	1077,58	1083,55	ether group

Fonte: Adaptado de BRACCO *et al.*, 2007; DOUDIN, 2016

Tabela 5: espectros FTIR do PLA da literatura e utilizado na dissertação.

<i>PLA</i>				
Dados da literatura (cm ⁻¹)	PLA puro (cm ⁻¹)	Sistema puro (cm ⁻¹)	Sistema com vit. E (cm ⁻¹)	Grupo funcional
~3400	-	3362,75	3377,03	O-H (estiramento) - não visto em PLA seco
3000-2800	2923,65	2995,28	2944,12	C-H (estiramento)
1760-1750	1748,62	1750,72	1753,71	C=O (estiramento)
1640-1650	-	-	1632,57	C=C (estiramento) absorção de água)
1489, 1452, 1412, 1383	1453,28	1453,21	1453,37	C-H (flexão)
1337, 1315		1382,45	1381,89	C-H (flexão)
1190-1180	1180,43	1181,89	1181,93	C-O-C e C-O (estiramento / álcool)
1040-1060	1042,64	1043,81	1044	C-O-C e C-O (estiramento / álcool)
948	-	956,82	952,96	C-O-C e C-O (estiramento / álcool)

Fonte: Adaptado de WRONA *et al.*, 2017

Tabela 6: espectros FTIR do poloxamer da literatura e utilizado na dissertação

<i>Poloxamer</i>				
Dados da literatura (cm ⁻¹)	Poloxamer puro (cm ⁻¹)	Sistema puro (cm ⁻¹)	Sistema com vit. E (cm ⁻¹)	Grupo funcional
3500	-	-	-	O-H (estiramento) - não visto em PLA seco
2884	2881,39	-	-	C-H (estiramento)
1114	1101,5	1127,33	1127,23	C-O (estiramento)

Fonte: Adaptado de PANDITA *et al.*, 2011.

A banda referente ao estiramento da ligação O-H (relacionado com a presença de umidade na amostra analisada) está presente nos espectros correspondentes aos sistemas, mas não está presente nos polímeros e no ativo puro. E comparando os sistemas entre si, na Figura 1, vê-se que essa banda é muito mais intensa no espectro do sistema com vitamina E do que no sistema puro. Isso pode ser justificado pelas condições de acondicionamento de cada um deles. O sistema puro foi armazenado em dessecador à vácuo, assim como o PLA puro e o poloxamer utilizados na análise do FTIR. Já o sistema com vitamina E teve a necessidade de ser acondicionado em geladeira, fora do dessecador, já que o ativo é sensível a calor, resultando em maior umidade presente e uma maior intensidade da banda correspondente a presença de água na amostra. A água presente na amostra não é relacionada a presença do PLA, já que a sua capacidade de absorvê-la é baixo (VYAVAHARE, 2015), e sim a presença do poloxamer por ser a porção higroscópica do sistema. Sendo ele um copolímero em bloco anfifílico composto por monômeros de óxido de etileno (bloco hidrofílico) e óxido de propileno (bloco hidrofóbico), a água vista neste espectro está aderida a esta porção do sistema com vitamina E.

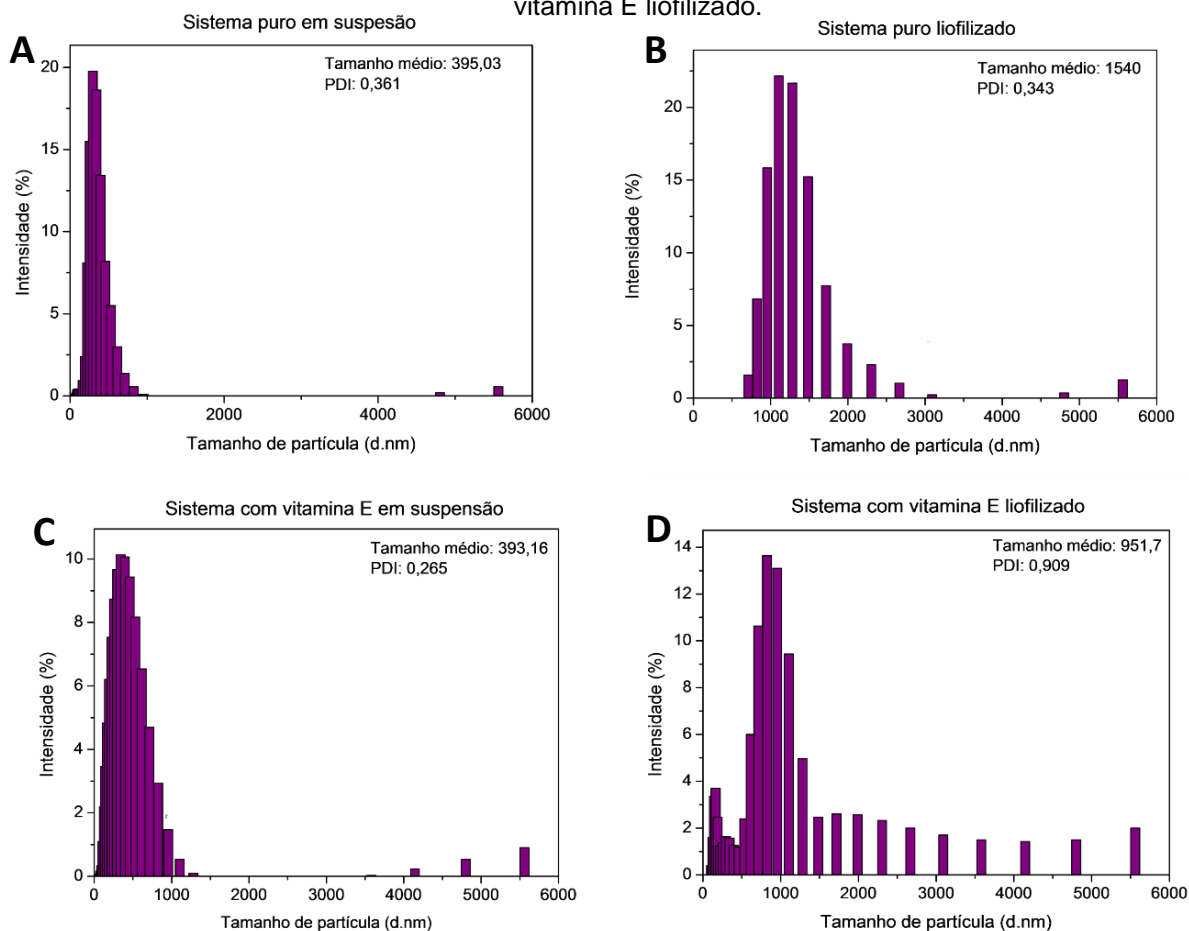
Os resultados obtidos por FTIR apresentaram todas as bandas características do PLA, do poloxamer e da vitamina E individualmente. Entretanto, nos sistemas muitas delas se sobrepõem, por conta da similaridade química das suas estruturas, além da baixa concentração do poloxamer e da vitamina, não sendo possível comprovar a presença concomitante destes.

5.5 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Os sistemas obtidos foram analisados por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) para determinação do tamanho de partícula. Os resultados são referentes aos sistemas ainda em suspensão e depois de liofilizados. Na Figura 21, a seguir, estão representados os gráficos de distribuição de tamanhos.

Quando se compara ambos os sistemas entre si, observa-se que em ambos os casos, as partículas que passaram pelo processo de secagem por liofilização apresentam tamanhos maiores quando comparadas àquelas que permaneceram em suspensão. Isso ocorre por conta do processo de congelamento pelo qual as suspensões de partículas devem passar para que possam ser liofilizadas. Durante o congelamento, as moléculas de água vão se transformando em cristais, o que causa na “expulsão” das partículas presentes nessa porção de gelo recém formado para a

Figura 21: Gráficos de distribuição de tamanhos de partícula dos sistemas. (A) Sistema puro em suspensão; (B) Sistema puro liofilizado; (C) Sistema com vitamina E em suspensão; (D) Sistema com vitamina E liofilizado.



fração ainda na forma líquida. À medida que a suspensão vai chegando à temperatura de congelamento, as partículas ficam cada vez mais confinadas em menores volumes, se aproximando umas das outras, o que tem como consequência agregação do sistema (ABDELWAHED *et al.*, 2006; KHAYATA *et al.*, 2006). Como o DLS detecta o raio hidrodinâmico da partícula, quando estas estão agregadas, não é possível se avaliar o tamanho real de cada uma individualmente. Esta hipótese da agregação das partículas em questão será analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).

As partículas em suspensão do sistema puro e do sistema com vitamina E estão com tamanhos aproximados, o que pode indicar que a vitamina E se distribuiu homogeneamente pelas partículas formadas. Isso ocorre por ela se apresentar em forma oleosa e ter uma estrutura carbônica hidrofóbica, interagindo bem com PLA e, sobretudo, com o poloxamer que é um tensoativo e interage com compostos oleosos. Sendo essa distribuição da vitamina homogênea, não há um aumento significativo nem do tamanho de partícula e nem no índice de polidispersão (PDI).

Já no caso das partículas liofilizadas, o PDI no sistema com o ativo é mais elevado que no sistema puro. Uma das possibilidades de explicação para o PDI ser tão diferente são as diferentes interações que foram criadas pela vitamina E no processo de congelamento e liofilização, que gera agregados de partículas com diferentes forças de interações múltiplas entre si e, por consequência, formam-se diferentes populações de agregados durante o processo de secagem das partículas. Portanto é possível que a vitamina E não esteja somente no interior das partículas formadas, mas também adsorvida na superfície, sendo responsável por essas interações que não ocorrem no sistema puro.

Quando se avalia o tamanho médio de partícula, há uma diferença de quase 600nm entre o sistema puro (1540nm) e o sistema com a vitamina E (951nm). Isso ocorre justamente por conta de diversos tamanhos de populações de agregados mais heterogêneos, que faz com que a média do sistema com a vitamina E seja menor, apesar de serem observadas algumas populações de partículas maiores do que as vistas no sistema puro, também se observa populações menores que contribuem para a redução da média dos tamanhos dos agregados. Portanto a liofilização muda de fato as características das partículas.

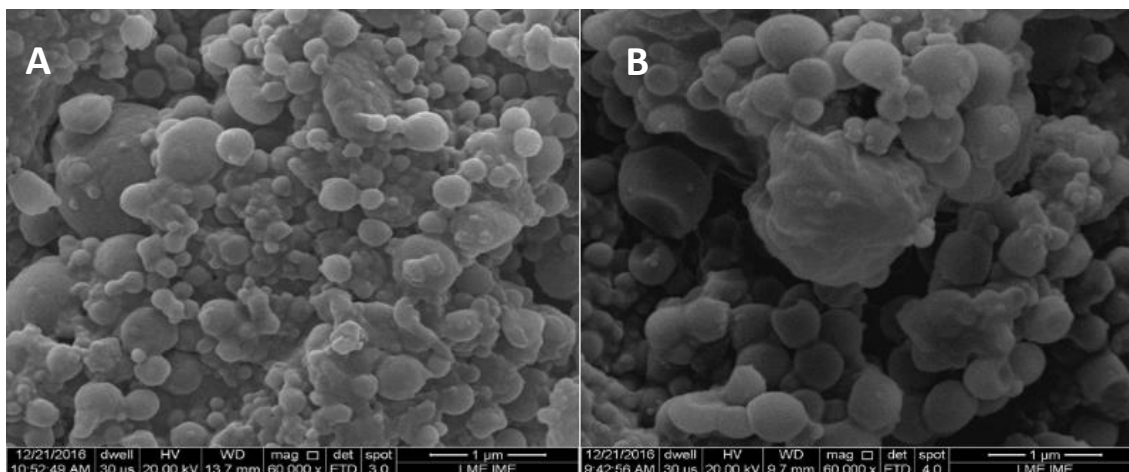
5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (FEG-SEM)

A morfologia das partículas e confirmação da agregação das partículas foram analisadas através de imagens obtidas por FEG-SEM. A Figura 22.A mostra as partículas correspondentes ao sistema puro e na 22.B as partículas do sistema com vitamina E. Pode-se afirmar que o formato das partículas é esférico de superfície levemente rugosa. Além disso, é possível se observar a agregação resultante do processo de liofilização, já que não se vê partículas individualizadas, corroborando com os dados de Espalhamento de Luz Dinâmico nos quais se vê que as partículas liofilizadas tinham como resultado um maior raio hidrodinâmico médio.

6. CONCLUSÃO

O método de emulsão-difusão realizado neste estudo foi capaz de promover a formação de nanopartículas resultantes da mistura física dos componentes escolhidos para a sua formação.

Figura 22: Micrografias dos agregados de partículas: (A) sistema puro; (B) sistema com vitamina E



Foram realizadas caracterizações eficazes na determinação das propriedades térmicas, de cristalinidade do sistema, além do tamanho e morfologia das partículas obtidas.

A partir dessas caracterizações, pode-se concluir que o sistema obtido possui potencial aplicação em formulações tópicas antienvhecimento de liberação modificada de ativos antioxidantes, por se tratar de um sistema cristalino, como discutido anteriormente. Entretanto, quando estas passaram pelo processo de secagem por liofilização, ocorreu agregação, o que pode dificultar a sua penetração na barreira da pele íntegra para ação direta antioxidante nos queratinócitos.

7. SUGESTÕES

- Realizar ensaio in vitro em queratinócitos;
- Realizar testes de retenção das partículas em orelha de porco, para que se avalie se as partículas secas são capazes de ultrapassar a barreira da pele;
- Desenvolver metodologia para cálculo da taxa de encapsulação da vitamina E por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC);
- Realizar análise de Ressonância Magnética Nuclear de Sólidos para se avaliar as porções mais e menos rígidas dos sistemas, afim de entender melhor as interações entre os componentes;
- Realizar teste de estabilidade acelerada para se avaliar as melhores condições de acondicionamento das partículas e obter uma previsão do tempo de prateleira.

REFERÊNCIAS

ABDELWAHED, W.; DEGOBERT, G.; STAINMESSE, S.; FESSI, H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 58, p. 1688-1713, 2006. DOI: 10.1016/j.addr.2006.09.01. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X06001840>>. Acesso em: 09 fev. 2017.

ANTON, N., BENOIT, J., & SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review. **Journal of Controlled Release**, [S.l.], v. 128, p. 185–99, 2008. DOI: 10.1016/j.jconrel.2008.02.007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18374443>>. Acesso em: 27 abr. 2016.

BAUMANN, L. Skin aging and its treatment. **Journal of Pathology**, [S.l.], v. 211, p. 241-251, 2007. DOI: 10.1002/path.2098. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17200942>>. Acesso em: 27 set. 2016.

BRACCO, P.; BRUNELLA, V.; ZANETTI, M.; LUDA, M. P.; COSTA, L. Stabilisation of ultra-high molecular weight polyethylene with Vitamin E. **Polymer Degradation and Stability**, [S.l.], v. 92, p. 2155–2162, 2007. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2007.02.023. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391007002443>>. Acesso em: 7 fev. 2017.

BUCKINGHAM, E.M.; KLINGELHUTZ, A.J. The role of telomeres in the ageing of human skin. **Experimental Dermatology**, [S.l.], v. 20, p. 297–302, 2011. DOI:10.1111/j.1600-0625.2010.01242.x. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21371125>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

BURKE, K.E. Prevention and Treatment of Aging Skin with Topical Antioxidants. In: DAYAN, N. Skin Aging Handbook, [S.l.]. Norwich: William Andrew Inc., 2008. p. 149-176. Disponível em: <<http://www.anme.com.mx/libros/Skin%20Aging%20Handbook.pdf#page=168>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

COHEN-LETESSIER, A. Actualités cosmétiques dans le vieillissement cutané, **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, [S.l.], v. 135, p. 211-214, 2008. DOI: 10.1016/S0151-9638(09)72547-5. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0151963809725475>>. Acesso em: 13 mar. 2015.

DELAMBRA, E.; DIMRI, G.P. Cellular Senescence and Skin Aging. In: DAYAN, N. Skin Aging Handbook, [S.l.]. Norwich: William Andrew Inc., 2008. p. 129-148.

Disponível em:

<<http://www.anme.com.mx/libros/Skin%20Aging%20Handbook.pdf#page=148>>.

Acesso em: 15 nov. 2015.

DOUDIN, K. Vitamin E-stabilised UHMWPE for orthopaedic implants : Quantitative determination of vitamin E and characterisation of its transformation products. **Polymer Degradation and Stability**, [S.l.], v. 125, p. 59–75, 2016. Elsevier Ltd. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2015.11.028. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391015301506>>. Acesso em: 07. Fev. 2017.

ELSABAHY, M.; WOOLEY, K.L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. **Chemical Society Review**, [S.l.], v. 41, p. 2545–2561, 2012.

DOI: 10.1039/c2cs15327k. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22334259>>. Acesso em: 20 out. 2015.

EPSTEIN, H. Skin Care Products. In: BAREL, A.O.; PAYE, M.; MAIBACH, H.I. Handbook of Cosmetic Science and Technology, [S.l.]. Nova Iorque: Informa Healthcare, 2009. p. 121-134. Disponível em: <[https://www.crcpress.com/Handbook-of-Cosmetic-Science-and-Technology-Fourth-Edition/Barel-Paye-](https://www.crcpress.com/Handbook-of-Cosmetic-Science-and-Technology-Fourth-Edition/Barel-Paye-Maibach/p/book/9781842145647)

[Maibach/p/book/9781842145647](https://www.crcpress.com/Handbook-of-Cosmetic-Science-and-Technology-Fourth-Edition/Barel-Paye-Maibach/p/book/9781842145647)>. Acesso em: 20 mar. 2016.

FORLONI, G. Responsible nanotechnology development. **Journal of Nanoparticle Research**, [S.l.], v. 14:1007, p. 1-17. DOI 10.1007/s11051-012-1007-1. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-012-1007-1>>. Acesso em: 20 mar. 2016.

GALINDO-RODRIGUEZ, S., ALLÉMANN, E., FESSI, H., DOELKER, E.

Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods. **Pharmaceutical Research**, [S.l.], v. 21, n. 8, p. 1428–1439, 2004. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15359578>>. Acesso em: 16 abr. 2016.

GIRAUD, I., FRANCESCHI-MESSANT, S., PEREZ, E., LACABANNE, C., DANTRAS, E. Preparation of aqueous dispersion of thermoplastic sizing agent for carbon fiber by emulsion/solvent evaporation. **Applied Surface Science**, [S.l.], v. 266, p. 94–99, 2013. DOI: 10.1016/j.apsusc.2012.11.098. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433212020569>>. Acesso em: 16 abr. 2016.

GOU, M., WEI, X., MEN, K., WANG, B., LUO, F., ZHAO, X., QIAN, Z. PCL/PEG copolymeric nanoparticles: potential nanoplatforms for anticancer agent delivery. **Current Drug Targets**, [S.l.], v. 12, p. 1131–1150, 2011. DOI: 10.2174/138945011795906642. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21443476>>. Acesso em: 16 abr. 2016.

GUINEBRETIERE, S., BRIANÇON, S., LIETO, J., MAYER, C., FESSI, H. Study of the emulsion-diffusion of solvent: Preparation and characterization of nanocapsules. **Drug Development Research**, [S.l.], v. 57, n. 1, p. 18–33, 2002. DOI:10.1002/ddr.10054. Disponível em: <[GUTERRES, S. S., FESSI, H., BARRATT, G., DEVISSAGUET, J. P., PUISIEUX, F. \(1995\). Poly\(DL-Lactide\) Nanocapsules Containing Diclofenac: I. Formulation and Stability Study. **International Journal of Pharmaceutics**, \[S.l.\], v. 113, p. 57–63, 1995. DOI: 10.1016/0378-5173\(94\)00177-7. Disponível em: <<https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-244a33d2-37a8-3640-a77d-07517bbe6f3a>>. Acesso em: 20 ago. 2015.](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ddr.10054/abstract?systemMessage=Wiley+Online+Library+will+be+unavailable+on+Saturday+7th+Oct+from+03.00+EDT+%2F+08%3A00+BST+%2F+12%3A30+IST+%2F+15.00+SGT+to+08.00+EDT+%2F+13.00+BST+%2F+17%3A30+IST+%2F+20.00+SGT+and+Sunday+8th+Oct+from+03.00+EDT+%2F+08%3A00+BST+%2F+12%3A30+IST+%2F+15.00+SGT+to+06.00+EDT+%2F+11.00+BST+%2F+15%3A30+IST+%2F+18.00+SGT+for+essential+maintenance.+Apologies+for+the+inconvenience+caused+.>. Acesso em: 12 jan. 2016.</p>
</div>
<div data-bbox=)

GUTERRES S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous applications. **Drug Target Insights**, Porto Alegre, v. 2, p. 147-157, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3155227/>>. Acesso em: 20 ago. 2015.

HASSOU, M., COUENNE, F., GORREC, Y., & TAYAKOUT, M. Modeling and Simulation of Polymeric Nanocapsule Formation by Emulsion Diffusion Method. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, [S.l.], v. 55, n. 8, p. 2094–105, 2009. <http://doi.org/1002/aic.11809>. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aic.11809/full>>. Acesso em: 14 mar. 2016.

HYVÖNEN, S.; PELTONEN, L.; KARJALAINEN, M.; HIRVONEN, J. Effect of nanoprecipitation on the physicochemical properties of low molecular weight poly(L-lactic acid) nanoparticles loaded with salbutamol sulphate and beclomethasone

dipropionate. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 295, n. 1–2, p. 269–281, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517305001778>>. Acesso em: 14 mar. 2016.

KHAYATA, N.; ABDELWAHED, W.; CHEHNA, M. F.; CHARCOSSET, C.; FESSI, H. Stability study and lyophilization of vitamin E-loaded nanocapsules prepared by membrane contactor. **International Journal of Pharmaceutics**, [S.l.], v. 439, n. 1–2, p. 254–259, 2012. Elsevier B.V. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2012.09.032 Disponível em: <<https://translate.google.com.br/translate?hl=pt-BR&sl=en&u=https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23010283&prev=search>>. Acesso em: 15 mar. 2016.

KILPATRICK-LIVERMAN, L.; MATTAI, J.; TINSLEY, R.; WU, J. Mechanisms of Skin Hydration. In: BAREL, A.O.; PAYE, M.; MAIBACH, H.I. Handbook of Cosmetic Science and Technology. Nova Iorque: Informa Healthcare, 2009. p. 91-106. Disponível em: <<https://www.crcpress.com/Handbook-of-Cosmetic-Science-and-Technology-Fourth-Edition/Barel-Paye-Maibach/p/book/9781842145647>>. Acesso em: 04 out. 2016.

KUCHNIER, C. N. Estudo Do Efeito De Aditivo Extensor De Cadeia Multifuncional Em Blendas De PLA/PBAT. 2014. 154f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade De Engenharia Química (Unicamp), 2014. Disponível em: <http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/CAMP_3104e6f3097a79fc99e53ed71f5baaab/Details>. Acesso em: 14 fev. 2017.

KUWAZURU, O.; SAOTHONG ;J., YOSHIKAWA, N. Mechanical approach to aging and wrinkling of human facial skin based on the multistage buckling theory. **Medical Engineering & Physics**, v. 30, p. 516–522, 2008. DOI: 10.1016/j.medengphy.2007.06.001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17681837>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

LIU, M.; DONG, J.; YANG, Y.; YANG, X.; XU, H. Characterization and release of triptolide-loaded poly (D,L-lactic acid) nanoparticles. **European Polymer Journal**, v. 41, p. 375–382, 2005. DOI: :10.1016/j.eurpolymj.2004.09.015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305704003362>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

LODÉN, M. Interactions between the stratum corneum and topically applied products: regulatory, instrumental and formulation issues with focus on moisturizers. **British Journal of Dermatology**, v. 171, n. 3, p. 38-44, 2014. DOI 10.1111/bjd.13240. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25040916>>. Acesso em: 20 ago. 2015.

MARESCA, V.; FLORI, E.; PICARDO, M. Skin phototype: a new perspective. **Pigment cell & Melanoma**, [S.l.], [v. 28(4), p. 378-389, 2015. DOI: 10.1111/pcmr.12365. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25786343>>. Acesso em: 14 mar. 2016.

MARTINS, I.M.; BARREIRO, M.F.; COELHO, M.; RODRIGUES, A.E. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. **Chemical Engineering Journal**, [S.l.], v.245, p. 191-200, 2014. DOI: 10.1016/j.cej.2014.02.024. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894714001703>>. Acesso em: 15 mar. 2016.

MCCAY, P. B. Vitamin E : Interactions With Free Radicals and Ascorbate. **Ann. Rev. Nutr.**, [S.l.], v. 5, p. 323–40, 1985. DOI: 10.1146/annurev.nu.05.070185.001543. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2992548>>. Acesso em: 14 mar. 2016.

MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N.; STRØMME, M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. **Progress in Material Science**, [S.l.], v. 57, p. 875-910, 2012. DOI:10.1016/j.pmatsci.2011.10.001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079642511001046>>. Acesso em: 15 nov. 2015.

MONTENEGRO, L. Nanocarriers for skin delivery of cosmetic antioxidants. **Journal of Pharmacology & Pharmacognosy Research**, [S.l.], v 2, n. 4, p. 73-92, 2014. Disponível em: <<http://jppres.com/jppres/nanocarriers-for-skin-delivery-of-cosmetic-antioxidants/>>. Acesso em: 17 nov. 2015.

MUKHERJEE, P.K; MAITY, N.; NEMA, N.K.; SARKAR, B.K. Bioactive compounds from natural resources against skin aging. **Phytomedicine**, [S.l.], v. 19, p. 64-73, 2011. DOI: 10.1016/j.phymed.2011.10.003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22115797>>. Acesso em: 17 nov. 2015.

NASIR, A. Nanotechnology and dermatology: Part II—risks of nanotechnology. **Clinics in Dermatology**, [S.l.], v. 28, p. 581–588, 2010. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2009.06.006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20797523>>. Acesso em: 13 mar. 2016.

NAYLOR, E.C.; WATSON, R.E.B.; SHERRATT, M.J. Molecular aspects of skin ageing. **Maturitas**, [S.l.], v. 69, p. 249– 256, 2011. DOI:

10.1016/j.maturitas.2011.04.011. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378512211001496>>. Acesso em:
20 mar. 2016.

NEGRETTO, C. M. U.; ZIEGLER, S.; CEZAR, C. M.; RAFFIN, R. P.; GOMES, P. Análise de transportador lipídico nanoestruturado contendo vitamina E através da espectrofotometria UV/VIS. **Disciplinarum Scientia**, [S.l.], v. 14, n. 1, p. 89–98, 2013. Disponível em:
<<https://www.periodicos.unifra.br/index.php/disciplinarumNT/article/view/1317>>. Acesso em: 20 nov. 2017.

PALMER, D.M.; KITCHIN, J.S. Oxidative Damage, Skin Aging, Antioxidants and a Novel Antioxidant Rating System. **Journal of Drugs in Dermatology**, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 11-15, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20120419>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

PANDITA, D.; AHUJA, A.; LATHER, V.; et al. Development of Lipid-Based Nanoparticles for Enhancing the Oral Bioavailability of Paclitaxel. **PharmSciTech**, [S.l.], v. 12, n. 2, p. 712–722, 2011. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21637945>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

PAPAKOSTAS, D.; RANCAN, F.; STERRY, W.; BLUME-PEYTAVI, U.; VOGT, A. Nanoparticles in dermatology. **Archives of Dermatological Research**, [S.l.], v. 303, p. 533–550, 2011. DOI: 10.1007/s00403-011-1163-7. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21837474>>. Acesso em: 25 ago. 2015.

PEREIRA, R. B.; MORALES, A. R. Estudo do Comportamento Térmico e Mecânico do PLA Modificado com Aditivo Nucleante e Modificador de Impacto. **Polímeros**, [S.l.], v. 24, n. 2, p. 198–202, 2014. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282014000200010>. Acesso em: 15 nov. 2016.

POLLETO, F.S.; BECK, R.C.R.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Polymeric Nanocapsules: Concepts and Applications. In: BECK, R.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. *Nanocosmetics, and Nanomedicines*, [S.l.]. Porto Alegre: Springer, 2011. p. 49-68. DOI: 10.1007/978-3-642-19792-5. Disponível em:
<https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-19792-5_3>. Acesso em: 14 ago. 2015.

RABE, J.H.; MAMELAK, A.J.; MCELGUNN, P.J.S.; MORISON, W.L.; SAUDER, D.N. Photoaging: Mechanisms and repair. **Journal of the American Academy of**

Dermatology, [S.l.], v 55, n. 1, p. 1-19, 2006. DOI:10.1016/j.jaad.2005.05.010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16781287>>. Acesso em: 14 mar. 2016.

RAJ, S.; JOSE, S.; SUMOD, U.S.; SABITHA, M. Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, [S.l.], v 4, n. 3, p. 185-193, 2012. DOI: 10.4103/0975-7406.99016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3425166/>>. Acesso em: 13 mar. 2016.

RAVIKUMARA N. R.; TIYABOONCHAI, W.; MADHUSUDHAN, B. Fabrication and Characterization of Genistein Encapsulated Poly (D, L) Lactic acid Nanoparticles for Pharmaceutical Application. **Current Nanoscience**, [S.l.], v. 9, p. 293-302, 2013. DOI: 10.2174/15734137111309020021. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/109031>>. Acesso em: 15 ago. 2015.

ROCHETTE, P.J.; BRASH, D.E. Human Telomeres Are Hypersensitive to UV-Induced DNA Damage and Refractory to Repair. **PLoS Genet**, [S.l.], v. 6, n. 4, e1000926, 2010. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000926. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1000926>>. Acesso em: 15 ago. 2015.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quím. Nova**, [S.l.], v. 26, n. 5, p.726-737, 2003. DOI: 10.1590/S0100-40422003000500017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422003000500017&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 05 jun. 2016.

SCHNEIDER, M.; STRACKE, F.; HANSEN, S.; SCHAEFER, U.F. Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. **Dermato-Endocrinology**, [S.l.], v. 1, n. 4, p.197-206, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2835875/>>. Acesso em: 13 nov. 2016.

RAMOS-E-SILVA, M.; CELEM, L.R.; RAMOS-E-SILVA, S.; FUCCI-DA-COSTA, A.P. Anti-aging cosmetics: Facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, [S.l.], v. 31, p. 750–758, 2013. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2013.05.013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24160281>>. Acesso em: 25 ago. 2015.

SILVA, G.A. Introduction to nanotechnology and Its Applications to Medicine. **Surgical Neurology**, [S.l.],v. 61, p. 216–20, 2004. DOI:

10.1016/j.surneu.2003.09.036. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14984987>>. Acesso em: 14 ago. 2015.

SIMONE, E.A. Polymeric carriers: role of geometry in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [S.l.], v. 5, n. 12, p. 1283-1300, 2008. DOI: 10.1517/17425240802567846. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19040392>>. Acesso em: 25 set. 2016.

SOUTO, E. B., SEVERINO, P., SANTANA, M. H. A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. **Polímeros**, [S.l.], v. 22(1), p. 101–106, 2012. DOI: 10.1590/S0104-14282012005000005. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282012000100017>. Acesso em: 25 set. 2016.

STEVANOVI, M.; USKOKOVI, D. Poly (lactide-co-glycolide)-based Micro and Nanoparticles for the Controlled Drug Delivery of Vitamins. **Current Nanoscience**, v. 5, n. 1, p. 1–14, 2009. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/68591>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

TAKUR, R.; BATHEJA, P.; KAUSHIK, D.; MICHNIAK, B. Structural and Biochemical Changes in Aging Skin and Their Impact on Skin Permeability Barrier. In: DAYAN, N. Skin Aging Handbook, [S.l.], Norwich: William Andrew Inc., 2008. p. 55-90. Disponível em:
<<http://www.anme.com.mx/libros/Skin%20Aging%20Handbook.pdf#page=74>>. Acesso em: 20 mar. 2016.

TAVARES, M. R. O Efeito Da Concentração Da Policaprolactona No Desenvolvimento De Nanopartículas Poliméricas Visando A Transposição Dos Fármacos Através Da Barreira Hematoencefálica. 2016. 148f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Poímeros) - Instituto de Macromoléculas Eloisa Mano, 2016. Disponível em: <...>. Acesso em: 15 nov. 2016.

VAUTHIER, C., BOUCHEMAL, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, [S.l.], v. 26(5), p. 1025–1058, 2009. DOI: 10.1007/s11095-008-9800-3. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19107579>>. Acesso em: 19 set. 2016.

VYAVAHARE, O. V. Investigation of Hydration Induced Structural Rearrangements of Poly (Lactic Acid), 2015. 112f. Tese (Polymer Science and Engineering) - University of Massachusetts – Amherst, 2015. Disponível em:
<http://scholarworks.umass.edu/dissertations_2/414/>. Acesso em: 04 fev. 2017.

WRONA, M.; CRAN, M. J.; NERÍN, C.; BIGGER, S. W. Development and characterisation of HPMC films containing PLA nanoparticles loaded with green tea extract for food packaging applications. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 156, p. 108–117, 2017. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.08.094>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861716310475>>. Acesso em: 20 set. 2016.

YENILMEZ, E.; BAŞARAN, E.; YAZAN, Y. Release characteristics of vitamin E incorporated chitosan microspheres and in vitro-in vivo evaluation for topical application. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 84, n. 2, p. 807–811, 2011. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.07.002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861710005333>>. Acesso em: 20 set. 2016.