

Gilmar Hanck da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS
NANOPARTICULADOS DE PS-*b*-PAA COM SUPERFÍCIE
MODIFICADA COM DERIVADOS DE QUITOSANA PARA A
ENCAPSULAÇÃO DE MINOXIDIL**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Química
Orientador: Prof. Dr. Edson Minatti

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Gilmar Hanck da
Desenvolvimento de sistemas poliméricos
nanoparticulados de PS-b-PAA com superfície modificada com
derivados de quitosana para a encapsulação de minoxidil /
Gilmar Hanck da Silva ; orientador, Edson Minatti -
Florianópolis, SC, 2015.
118 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

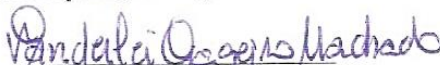
1. Química. 2. PS-b-PAA. 3. Auto-associação. 4.
Polissacarídeo. 5. Minoxidil. I. Minatti, Edson. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Química. III. Título.

Gilmar Hanck da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS
NANOPARTICULADOS DE PS-*b*-PAA COM SUPERFÍCIE
MODIFICADA COM DERIVADOS DE QUITOSANA PARA A
ENCAPSULAÇÃO DE MINOXIDIL**

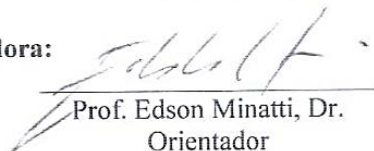
Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de **Mestre em Química**, e aprovada em sua forma final pelo **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 17 de julho de 2015.



Prof. Vanderlei Gageiro Machado, Dr.
Coordenador do Programa

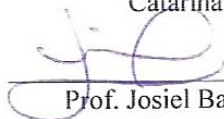
Banca Examinadora:



Prof. Edson Minatti, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina



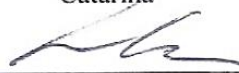
Prof. Ismael Casagrande
Bellettini, Dr.
Universidade Federal de Santa
Catarina



Prof. Josiel Barbosa
Domingos, Dr.
Universidade Federal de Santa
Catarina



Prof. Luiz Alberto
Kanis, Dr.
Universidade do Sul de Santa
Catarina



Prof. Nito Angelo
Debacher, Dr.
Universidade Federal de Santa
Catarina

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, José e Maria Madalena e à minha irmã Sandra, por todo carinho, apoio e compreensão. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

(A ordem não representa necessariamente uma hierarquia de importância...).

À minha família, especialmente meus pais, José e Maria Madalena e minha irmã, Sandra, pelo amor incondicional, todo o apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao meu orientador, Prof. Edson Minatti, pela oportunidade, orientação e paciência.

Aos professores Ismael Casagrande Bellettini, Josiel Barbosa Domingos, Luiz Alberto Kanis e Nito Ângelo Debacher por aceitarem serem membros da banca examinadora.

Aos meus grandes colegas e amigos do POLISSOL: Adriana, Alexandra, Bruna, Carlos, Celso, Jeferson, Jonatan, Juliana, Matheus, Rafaela, Renata, Rômulo, Vanderlei, Vanderléia, especialmente à Samira Fayad pelo incentivo, paciência e contribuição.

Aos antigos membros do grupo POLISSOL: Leandro e Ismael que sempre estavam prontos para ajudar no que fosse possível.

À minha grande amiga e companheira de mestrado, Juliana Dreyer, pelas palavras de incentivo, as conversas madrugada adentro, mas principalmente, pela paciência e apoio nos momentos difíceis desta jornada.

Aos colegas e professores dos laboratórios POLIMAT, LACBIO, LQAG e LABEC, especialmente ao Alysson Vasques Fernandes Sako pela paciência e auxílio nas análises de eletroforese capilar.

Aos técnicos do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica - LCME-UFSC.

À minha grande amiga Ledilege Cucco Porto, que não mediu esforços para me auxiliar, pelas palavras de incentivo e as dicas que foram extremamente úteis para a realização deste trabalho.

À CAPES, ao CNPq e à UFSC pelo apoio financeiro.

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

Há momentos em que a maior sabedoria é parecer não saber nada.

(Sun Tzu)

A perfeição não é alcançada quando não há mais nada a ser incluído, mas sim quando não há mais nada a ser retirado.

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

O presente trabalho descreve a síntese e caracterização de três derivados de quitosana que foram utilizados para decorar vesículas produzidas a partir da auto-associação do copolímero em bloco PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ visando a encapsulação do minoxidil. As vesículas foram obtidas usando o método de co-solvente orgânico (dioxano) em água e caracterizadas quanto ao seu tamanho por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), morfologia por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e potencial zeta. Essas vesículas apresentam morfologia bem definida com diâmetros inferiores a 200 nm e, devido à dissociação das porções de ácido carboxílico do bloco hidrofílico, estas vesículas exibem carga de superfície negativa, o que possibilita o revestimento da sua superfície com polissacarídeos de carga oposta, tais como quitosana e derivados de quitosana. Após a decoração, estas vesículas são claramente diferentes. Com a adição e o aumento da concentração de quitosana ou derivados de quitosana, o valor de potencial zeta diminui, passando por uma região de transição, próximo do potencial zero, onde são observadas a formação de agregados. Depois de alcançar o máximo de adsorção, os parâmetros de potencial zeta se estabilizam, as vesículas se re-dispersam e o diâmetro hidrodinâmico fica ligeiramente maior quando comparado com as vesículas não decoradas. A eficiência de encapsulação (EE) do minoxidil, quantificada por eletroforese capilar, resulta numa EE máxima de 50,7 %, o que está em boa concordância com a capacidade de carga de tais vesículas.

Palavras-chave: Auto-associação. Copolímero. PS-*b*-PAA. Nanopartícula. Espalhamento de luz dinâmico. Vesícula. Polímero. Polissacarídeo. Quitosana. Biopolímero. Minoxidil.

ABSTRACT

The present work describes the synthesis and characterization of three chitosan derivatives which were used to decorate vesicles made from the self-assembly of the block copolymer PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ aiming encapsulation of minoxidil. The vesicles were obtained by using the organic (dioxane) co-solvent method in water and characterized according to their size by Dynamic Light Scattering (DLS), morphology by Transmission Electron Microscopy (TEM) and zeta potential. These vesicles have well-defined morphology with diameters lower than 200 nm and, due to the dissociation of the carboxylic acid moieties of the hydrophilic block, these vesicles have a negative surface charge, which allows the coating of its surface with oppositely charged polysaccharides, such as chitosan and chitosan derivatives. After the decoration, these vesicles were clearly different. With the addition and the concentration increases of chitosan or chitosan derivatives, the zeta potential value decreases, passing through a transition region, near zero potential, where's observed the formation of aggregates. After reaching maximum adsorption, zeta potential parameters are stabilized, the vesicles are re-dispersed and the hydrodynamic diameter is mildly larger when compared to the vesicles without decoration. The encapsulation efficiency (EE) of minoxidil, quantified by capillary electrophoresis, results in an EE maximum of 50,7 %, which is in good agreement with the cargo ability of these vesicles.

Keywords: Self-assembly. Copolymer. PS-*b*-PAA. Nanoparticle. Dynamic light scattering. Vesicle. Polymer. Polysaccharide. Chitosan. Biopolymer. Minoxidil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de um gráfico de concentração plasmática <i>vs.</i> tempo de administração do fármaco, onde a curva (A) mostra uma formulação convencional e a curva (B) uma formulação de liberação controlada.	25
Figura 2. Classificação dos copolímeros de acordo com a disposição de seus monômeros: (a) em bloco, (b) alternado, (c) aleatório e (d) enxertado.	27
Figura 3. Representação dos diferentes tipos de copolímeros em bloco: (a) dibloco, (b) tribloco, (c) multibloco e (d) estrela.	28
Figura 4. Formação de micelas em meio aquoso (Adaptado da Ref. [23]).	28
Figura 5. Representação esquemática da contribuição das forças de atração e repulsão para o mecanismo de formação das micelas em meio aquoso (Adaptado da Ref. [22]).	29
Figura 6. Representação esquemática da incorporação do princípio ativo no interior hidrofóbico da micela (Adaptado da Ref. [23]).	29
Figura 7. Representação esquemática de uma (a) vesícula polimérica, (b) vesícula com princípio ativo hidrofóbico, (c) vesícula com princípio ativo hidrofílico, (d) vesícula decorada (Adaptado da Ref. [23]).	30
Figura 8. Representação estrutural do copolímero dibloco poliestireno- <i>b</i> -poli(ácido acrílico) (PS- <i>b</i> -PAA).	31
Figura 9. (a) Diagrama de fase do PS- <i>b</i> -PAA em dioxano-água em função das concentrações de copolímero e porcentagem de água em dioxano. As regiões coloridas entre as fases de esfera e bastão e entre as fases de bastão e vesícula correspondem às regiões de coexistência. (b) Representação das alterações morfológicas geradas pela porcentagem de adição de água e/ou dioxano/THF (Adaptado da Ref. [24]).	32
Figura 10. Representação estrutural da celulose.	33
Figura 11. Representação estrutural das unidades monoméricas da quitosana, onde (a) representa a unidade desacetilada e (b) a unidade acetilada com as respectivas numerações dos carbonos.	34
Figura 12. Representação esquemática da reação de carboximetilação, partindo da (a) quitosana, originando um (b) N,O-carboximetil derivado.	36
Figura 13. Representação esquemática da reação de alquilação reductiva, partindo da (a) quitosana, originando uma (b) ímina (base de Schiff), que é convertida num (c) N-alquil derivado (R- na reação representa o número de carbonos da molécula inserida).	37
Figura 14. Representação estrutural do minoxidil.	39

Figura 15. Representação gráfica de uma titulação condutimétrica ^[49] .	41
Figura 16. Representação gráfica da relação entre viscosidade reduzida vs. concentração de polímero ^[66] .	43
Figura 17. Representação esquemática do equipamento de espalhamento de luz, onde a amostra está representada por micelas poliméricas (Adaptado da Ref. [17]).	44
Figura 18. Representação esquemática de um gráfico de Zimm, onde os tracejados são as extrapolações a ângulo zero e concentração zero ^[68] .	48
Figura 19. Representação esquemática da dupla camada elétrica (Adaptado da Ref. [72]).	51
Figura 20. Representação esquemática de um equipamento de eletroforese capilar (Adaptado da Ref. [76]).	54
Figura 21. Representação esquemática do fluxo eletrosmótico (Adaptado da Ref. [76]).	54
Figura 22. Representação esquemática da modificação partindo da (a) quitosana e produzindo três derivados (b) N,O-carboximetilquitosana (QTMA); (c) N-octilquitosana (QTMO); (d) N,O-carboximetil-N-octilquitosana (QTM2).	60
Figura 23. Espectro de IR da quitosana produzido em pastilha de KBr (GD = 83,07 %).	69
Figura 24. Titulação potenciométrica da quitosana (GD = 80,5 %).	70
Figura 25. Titulação condutimétrica da quitosana (GD = 81,09 %).	71
Figura 26. Determinação da viscosidade intrínseca $[\eta]$ da quitosana a $25,0 \pm 0,1$ °C ($[\eta] = 367,15$; $R = 0,997$).	73
Figura 27. Representação esquemática do mecanismo de reação de O-carboximetilação da quitosana.	74
Figura 28. Representação esquemática do mecanismo de reação de desacetilação e N-carboximetilação da quitosana.	75
Figura 29. Representação esquemática do mecanismo de reação de N-alquilação redutiva da quitosana.	76
Figura 30. Espectros de IR da QT (-) e dos derivados QTMA (-), QTMO (-) e QTM2 (-) produzidos em pastilhas de KBr.	80
Figura 31. Titulação potenciométrica dos derivados de quitosana.	83
Figura 32. Titulação condutimétrica dos derivados de quitosana.	84
Figura 33. Função de autocorrelação $g^2(q,\tau)$ em ângulos de espalhamento de 30° a 150° (a) e a respectiva dependência de q^2 em função da frequência de relaxação (Γ) (b) para uma suspensão de nanopartículas de PS- <i>b</i> -PAA na concentração de 0,25 mg/mL.	86
Figura 34. Dependência de q^2 em função da frequência de relaxação (Γ) para uma suspensão de nanopartículas de PS- <i>b</i> -PAA na concentração de 0,05 mg/mL.	88

Figura 35. Frascos contendo misturas de nanopartículas e derivados de quitosana em concentrações em que existe a formação de agregados visivelmente aderidos ao vidro, onde QTMA (a), QTMO (b) e QTM2 (c) nas respectivas razões de 0,08, 0,09 e 0,09 (Câmera Digital Nikon Coolpix P510).	89
Figura 36. Variação do raio hidrodinâmico (R_H) em função da razão da concentração de QT (a), QTMA (b), QTMO (c), QTM2 (d) pela concentração de nanopartículas de PS- <i>b</i> -PAA.	90
Figura 37. Distribuições de tamanho (R_H nm) medido no ângulo de 90° para as concentrações inicial e final da formação dos agregados e seus respectivos índices de polidispersão (PDI) para QT (a), QTMA (b), QTMO (c) e QTM2 (d).	93
Figura 38. Variação do potencial zeta (ζ) em função da razão da concentração de QT (a), QTMA (b), QTMO (c), QTM2 (d) pela concentração de nanopartículas de PS- <i>b</i> -PAA.	95
Figura 39. Micrografias em menores e maiores ampliações das nanopartículas de PS- <i>b</i> -PAA, onde (A) e (B) são micrografias apenas das vesículas, (C) as vesículas com um problema de contraste e (D) uma vesícula na presença de minoxidil encapsulado.	98
Figura 40. Micrografias em alta ampliação das nanopartículas de PS- <i>b</i> -PAA decoradas com (A) quitosana, (B) QTMO, (C) QTM2 e (D) QTMA, todas na presença de minoxidil encapsulado.	99
Figura 41. Curva de calibração para o minoxidil realizado em eletroforese capilar ($R = 0,999$).	100
Figura 42. Eletroferograma do minoxidil na concentração de 50 ppm. Condições: eletrólito composto por 20 mmol/L de glicina e 20 mmol/L de ácido málico (pH 3,0), injeção hidrodinâmica (50 mbar, 5 s), tensão aplicada (+ 30 kV), temperatura (25 °C), detecção UV direta em 288 nm.	101
Figura 43. Espectro de ultravioleta do minoxidil.	101
Figura 44. Pureza da banda de absorção no UV do fármaco minoxidil em eletroforese capilar.	102
Figura 45. Representação esquemática das vesículas de PS- <i>b</i> -PAA, as vesículas decoradas e as vesículas com minoxidil encapsulado e seus respectivos valores de R_H , potencial zeta (ζ) e eficiência de encapsulação (EE).	103
Figura 46. Cromatograma do dioxano puro.	104
Figura 47. Cromatograma da amostra de suspensão de nanopartículas dialisada.	104
Figura 48. Cromatograma da amostra de suspensão de nanopartículas rotaevaporada.	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Definições de tipos de viscosidade e suas respectivas relações (Adaptado da Ref. [17]).	42
Tabela 2. Valores de ρ para partículas com morfologias típicas (Adaptado da Ref. [68]).	50
Tabela 3. Concentrações das soluções de quitosana com os respectivos tempos médios de escoamento obtidos a $25,0 \pm 0,1$ °C e os desvios padrão.	72
Tabela 4. Principais bandas de absorção no infravermelho observadas para a quitosana e seus derivados.	81
Tabela 5. Valores de grau de substituição obtidos pelas técnicas de titulação potenciométrica e condutimétrica dos derivados de quitosana.	85
Tabela 6. Razão de [QT-x]/[PS- <i>b</i> -PAA], as respectivas concentrações de QT-x e de potencial zeta em que se inicia e finda-se a formação dos agregados e o R_H médio inicial, máximo e final para cada sistema.	92
Tabela 7. Teor e eficiência de encapsulação (EE) para cada concentração de minoxidil inicialmente utilizada.	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A - Absorbância
A (τ) - Distribuição do tempo de relaxação
A₂ - Segundo coeficiente virial
A₃ - Terceiro coeficiente virial
C ou [] - Concentração
CE - Eletroforese capilar
cmc - Concentração micelar crítica
D - Coeficiente de difusão
D₀ - Coeficiente de difusão à diluição infinita
DLS - Espalhamento de luz dinâmico
dn/dc - Taxa de incremento do índice de refração com a concentração do soluto
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DP - Desvio Padrão
E - Energia do elétron
EE - Eficiência de encapsulação
f(k_a) - Função de Henry
FEO - Fluxo eletrosmótico
FTIR - Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
g²(q,t) - Função de autocorrelação
GC-MS - Cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massa
GD - Grau de desacetilação
GS - Grau de substituição
h - Constante de Plank
HA - Ácido hialurônico
I₀ - Intensidade de luz incidente
I_θ - Intensidade de luz espalhada
IR - Infravermelho
K - Constante óptica
K_{ATP} - Canais de K⁺ sensíveis ao trifosfato de adenosina
k_B - Constante de Boltzmann
k_D - Coeficiente “virial” hidrodinâmico
LCME - Laboratório central de microscopia eletrônica
LD - Limite de detecção
LQ - Limite de quantificação
m - massa
M_N - Massa molar numérica média
M_V - Massa molar viscosimétrica média
M_W - Massa molar ponderal média

MWCO - Molecular weight cut-off (Massa molar de corte)
MXD - Minoxidil
 n - Índice de refração do solvente
 N_A - Número de Avogadro
 η - Viscosidade do soluto
 η_0 - Viscosidade do solvente
 η_{esp} - Viscosidade específica
 η_{iner} - Viscosidade inerente
 η_{red} - Viscosidade reduzida
 η_{rel} - Viscosidade relativa
 $[\eta]$ - Viscosidade intrínseca
 $P(\theta)$ - Fator de forma
PAA - Poli(ácido acrílico)
PCL - Poli- ϵ -caprolactona
PCL-*b*-PEG - Poli(ϵ -caprolactona)-*b*-poli(etilenoglicol)
PDI - Grau de polidispersidade ou de polidispersão
PDMS - Polidimetilsiloxano
PET - Poli(tereftalato de etileno)
PLGA - Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
PS - Poliestireno
PS-*b*-PAA - Poliestireno-bloco-poli(ácido acrílico)
 q - Vetor de onda do espalhamento
QT - Quitosana
QTMA - N,O-carboximetilquitosana
QTMO - N-octilquitosana
QTM2 - N,O-carboximetil-N-octilquitosana
 R - Coeficiente de correlação
 r - Distância entre a partícula e o detector
 R_g - Raio de giro ou de giração
 R_H - Raio hidrodinâmico
 R_θ - Razão de Rayleigh
SLS - Espalhamento de luz estático
SPME - Solid phase micro-extraction (Microextração em fase sólida)
 T - Temperatura absoluta
 t - Tempo de escoamento do soluto
 t_0 - Tempo de escoamento do solvente
TEM ou MET - Microscopia eletrônica de transmissão
THF - Tetraidrofurano
 U_E - Mobilidade eletroforética
UV - Ultravioleta
 v - Velocidade da partícula

vs. - *Versus*

α - Constante de proporcionalidade ou polarizabilidade

Γ - Constante de correlação ou de relaxação

ε - Constante dielétrica

ζ - Potencial zeta

θ - Ângulo de espalhamento

λ - Comprimento de onda da radiação

ρ - Parâmetro de morfologia (rho)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 POLÍMEROS	27
2.2 COPOLÍMEROS EM BLOCO	28
2.2.1 Vesículas poliméricas	29
2.2.2 PS-<i>b</i>-PAA	30
2.3 POLIELETRÓLITOS	32
2.4 POLISSACARÍDEOS.....	33
2.4.1 Quitosana	34
2.4.2 Modificação química da quitosana	35
2.4.2.1 Carboximetilação	36
2.4.2.2 Alquilação redutiva	36
2.5 INTERAÇÃO ENTRE NANOPARTÍCULAS E POLISSACARÍDEOS.....	37
2.6 MINOXIDIL	39
2.7 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DAS TÉCNICAS UTILIZADAS	40
2.7.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	40
2.7.2 Condutividade elétrica	41
2.7.3 Viscosidade.....	42
2.7.4 Espalhamento de luz	43
2.7.4.1 Espalhamento de luz estático (SLS)	45
2.7.4.2 Espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	48
2.7.5 Potencial Zeta (ζ)	50
2.7.6 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	52
2.7.7 Eletroforese capilar (CE).....	53
2.7.8 Cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas (GC-MS).....	55
3 OBJETIVOS.....	57
3.1 OBJETIVO GERAL	57

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
4 PARTE EXPERIMENTAL	59
4.1 MATERIAIS E REAGENTES	59
4.2 EQUIPAMENTOS E MÉTODOS UTILIZADOS	59
4.2.1 Modificação química da quitosana.....	59
4.2.2 Caracterização da quitosana e seus derivados	60
4.2.2.1 Determinação do grau de desacetilação da quitosana e do grau de substituição dos derivados de quitosana.....	60
4.2.2.1.1 Análise de infravermelho (IR)	60
4.2.2.1.2 Titulação condutimétrica e potenciométrica	61
4.2.2.2 Determinação da massa molar viscosimétrica média da quitosana	62
4.2.3 Preparação das nanopartículas.....	62
4.2.4 Decoração das nanopartículas com quitosana e seus derivados.....	63
4.2.5 Caracterização das nanopartículas revestidas	63
4.2.5.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	63
4.2.5.2 Potencial Zeta (ζ)	64
4.2.5.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	64
4.2.6 Preparação das nanopartículas encapsuladas com minoxidil	65
4.2.7 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação do minoxidil nas suspensões de nanopartículas.....	65
4.2.8 Determinação do remanescente de dioxano nas suspensões de nanopartículas	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA	69
5.1.1 Determinação do grau de desacetilação da quitosana	69
5.1.2 Determinação da massa molar viscosimétrica da quitosana.....	71
5.2 DERIVADOS DE QUITOSANA: MODIFICAÇÃO QUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO.....	73
5.2.1 Modificação química da quitosana	73
5.2.1.1 Derivado hidrofílico.....	73

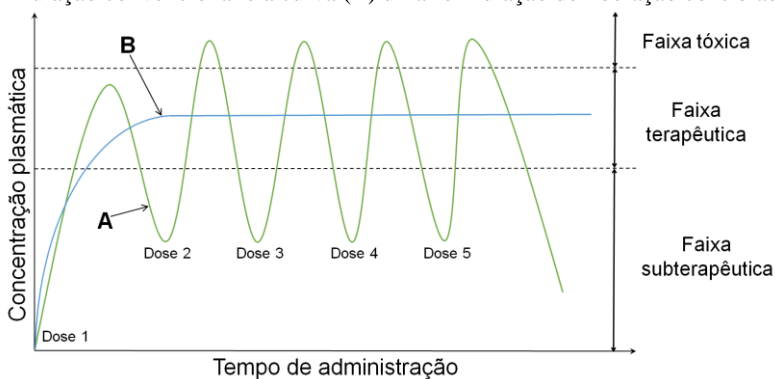
5.2.1.2 Derivado hidrofóbico	75
5.2.1.3 Derivado anfílico	76
5.2.2 Caracterização por infravermelho.....	77
5.2.3 Determinação do grau de substituição dos derivados de quitosana	82
5.3 NANOPARTÍCULAS: REVESTIMENTO E CARACTERIZAÇÃO	85
5.3.1 Revestimento das nanopartículas com quitosana e derivados de quitosana	85
5.3.2 Caracterização por Espalhamento de Luz Dinâmico.....	85
5.3.3 Caracterização por Potencial Zeta	95
5.3.4 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão	97
5.4 MINOXIDIL: ENCAPSULAÇÃO	100
5.5 DIOXANO: REMANESCENTE	103
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	107
REFERÊNCIAS	109

1 INTRODUÇÃO

Desde o seu advento, a nanotecnologia tem atraído grande atenção e gerado amplos avanços nos mais diversos setores industriais, devido ao seu enorme e atualmente comprovado potencial. Materiais em escala nanométrica tem frequentemente propriedades únicas em função do seu tamanho reduzido e, destes, os polímeros tem ganhado crescente interesse justamente pelas inúmeras possibilidades de aplicações^[1].

Em particular, a aplicação de polímeros na administração de fármacos tem sido extensivamente estudada nas últimas décadas, visando o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada e/ou direcionada de fármacos em alvos específicos do organismo. Esses sistemas carreadores têm trazido os mais variados benefícios, além de muitas vantagens, quando comparados aos sistemas convencionais como, por exemplo, diminuição da toxicidade, diminuição da degradação do fármaco, melhora da absorção, aumento da eficácia terapêutica, aumento da biodisponibilidade, diminuição dos eventos adversos, redução dos custos devido a diminuição do número de doses necessárias, liberação contínua e progressiva dos princípios ativos, direcionamento para alvos específicos, entre outras^[2]. A Figura 1 mostra um comparativo entre os perfis de concentração plasmática de uma formulação administrada pelo método convencional (1.A) e através de um sistema de liberação controlada (1.B).

Figura 1. Representação esquemática de um gráfico de concentração plasmática vs. tempo de administração do fármaco, onde a curva (A) mostra uma formulação convencional e a curva (B) uma formulação de liberação controlada.



- A - Terapia convencional
- B - Liberação controlada

Como podemos observar, pelo método convencional a concentração plasmática possui oscilações no decorrer do tempo, pois para que os níveis plasmáticos permaneçam dentro da faixa terapêutica é necessário a administração de novas doses de fármaco. Como os níveis plasmáticos são dependentes do número de doses administradas, quanto maior a dose ou menor o intervalo entre elas, maiores são as chances de a concentração alcançar níveis tóxicos, originando eventos adversos. Já pelo sistema de liberação controlada, a administração de uma única dose pode resultar em níveis plasmáticos dentro da faixa terapêutica por um período de tempo maior^[2].

Diversos são os tipos de sistemas carreadores existentes atualmente, com destaque para os lipossomas^[3], os dendrímeros^[4], as nanoesferas^[5], as nanocápsulas^[6], as vesículas^[7] e as micelas poliméricas^[8]. Essas nanoestruturas podem ser produzidas a partir de polímeros sintéticos ou biopolímeros, utilizados como transportadores de variados agentes ativos e para a administração em diferentes vias, principalmente oral^[8], parenteral^[9], nasal^[10], oftálmica^[11] e dérmica^[12].

A via de administração dérmica e transdérmica é uma das mais importantes e extensivamente explorada nas últimas décadas, pois apesar das dificuldades que esta rota apresenta para a entrega de fármacos, a pele é o maior órgão do corpo humano e somente este fato já basta para não ser negligenciada^[13,14].

O desenvolvimento de sistemas nanoestruturados com superfície modificada por meio do revestimento com outros polímeros são uma promessa, pois possibilitam aumentar a permeabilidade e o poder de direcionamento seletivo através do reconhecimento por receptores e alvos específicos do organismo. Neste contexto, as vesículas de copolímeros em bloco são extremamente atrativas, tem vantagens frente a outros sistemas, além da versatilidade de encapsulamento de agentes ativos tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos^[1,15].

Utilizando-se dessas informações, foi escolhido o copolímero de PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ para a produção das nanovesículas poliméricas, pelo simples fato deste copolímero, neste grau de polimerização, em solução formar vesículas, o que possibilita a incorporação de princípios ativos tanto hidrofóbicos quanto hidrofílicos^[15]. Como fármaco de escolha, foi utilizado o minoxidil pela sua boa hidrofiliidade e por existirem poucos trabalhos utilizando este sistema com fármacos hidrofílicos. E como agentes decorantes (revestimentos externos) foram utilizados a quitosana e outros três derivados sintetizados a partir da quitosana, por suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e por facilitar a absorção e a permeação cutânea^[16].

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 POLÍMEROS

A palavra polímero origina-se do grego *poli* (muitos) e *mero* (unidade de repetição). Assim, o monômero é uma unidade de repetição e a união de vários monômeros através de ligações covalentes formam as macromoléculas que são os polímeros. Os polímeros possuem alta massa molar e podem ser caracterizados por seu tamanho, estrutura química e interações intra e intermoleculares. As propriedades de cada polímero dependem de como suas unidades monoméricas estão organizadas, conduzindo à versatilidade dos diferentes polímeros encontrados atualmente^[17,18].

As macromoléculas podem ser divididas em dois grupos: os polímeros sintéticos como o poliestireno (PS), politetrafluoretileno (TEFLON®), poli(tereftalato de etileno) (PET), entre outros; e os polímeros de origem natural ou biopolímeros como a celulose, proteínas, entre outros. Estruturalmente mais complexos, os biopolímeros estão subdivididos em três grupos: proteínas e polipeptídeos, polinucleotídeos e polissacarídeos^[19].

Os polímeros formados a partir de uma única unidade monomérica são chamados de homopolímeros (por exemplo, o PS), enquanto que os formados por duas ou mais unidades monoméricas diferentes são conhecidos como copolímeros. Os copolímeros podem ser divididos em quatro tipos, dependendo da disposição de seus monômeros, conforme representado na Figura 2, utilizando duas unidades de monômero A (●) e B (●)^[20].

Figura 2. Classificação dos copolímeros de acordo com a disposição de seus monômeros: (a) em bloco, (b) alternado, (c) aleatório e (d) enxertado.



Os copolímeros em bloco podem ainda ser divididos em outros quatro grupos, como representa a Figura 3.

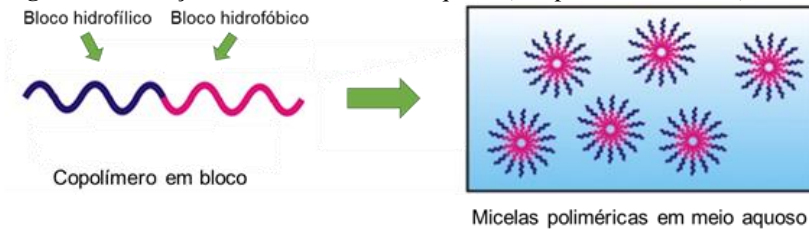
Figura 3. Representação dos diferentes tipos de copolímeros em bloco: (a) dibloco, (b) tribloco, (c) multibloco e (d) estrela.



2.2 COPOLÍMEROS EM BLOCO

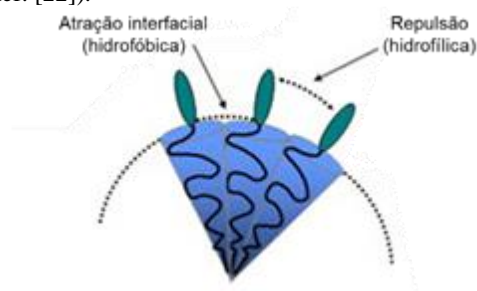
Muitos copolímeros têm caráter anfifílico, ou seja, possuem segmentos com grande diferença de solubilidade, um bloco hidrofílico e outro hidrofóbico, e com isso, a particularidade de se auto-organizar, quando na presença de solventes seletivos à um dos blocos e acima de uma concentração específica, a chamada concentração micelar crítica (cmc), formando micelas ou outros agregados micelares (esferas, cilindros, lamelas, discos) (Figura 4)^[21-24].

Figura 4. Formação de micelas em meio aquoso (Adaptado da Ref. [23]).



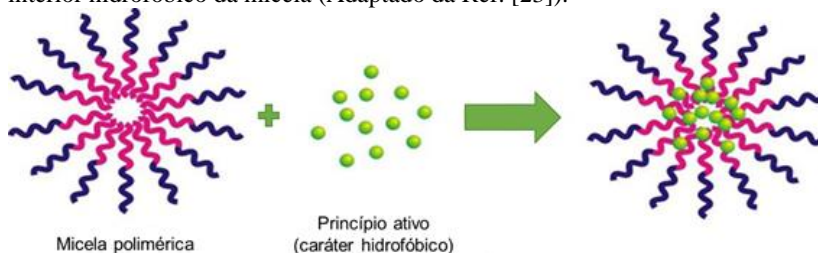
No processo de micelização em água, o bloco hidrofílico é orientado para a fase contínua, formando a parte externa da micela (corona), enquanto que o bloco hidrofóbico constitui a parte interna (núcleo). Existem duas forças atuantes na formação destas estruturas, as forças atrativas (que tendem a unir as moléculas) e as forças repulsivas (que limitam o número de moléculas que podem se auto-associar) (Figura 5)^[22].

Figura 5. Representação esquemática da contribuição das forças de atração e repulsão para o mecanismo de formação das micelas em meio aquoso (Adaptado da Ref. [22]).



O núcleo hidrofóbico da micela serve como um microambiente favorável a encapsulação e liberação de princípios ativos de caráter hidrofóbico, enquanto que a corona hidrofílica serve como uma interface estabilizante entre o núcleo hidrofóbico e o meio externo (Figura 6)^[23].

Figura 6. Representação esquemática da incorporação do princípio ativo no interior hidrofóbico da micela (Adaptado da Ref. [23]).



Quando o bloco hidrofóbico é consideravelmente maior do que o bloco hidrofílico, temos a formação favorecida de estruturas do tipo vesículas^[23].

2.2.1 Vesículas poliméricas

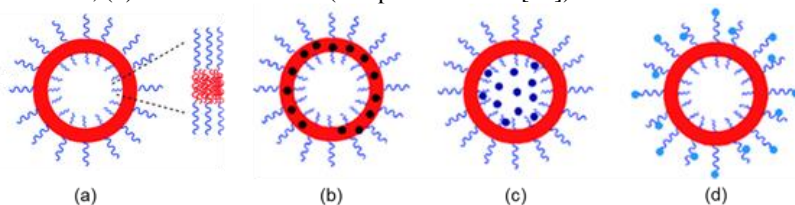
A auto-associação de copolímeros anfifílicos tem gerado grande interesse principalmente para a utilização em sistemas de liberação controlada de fármacos, neste contexto, as vesículas poliméricas têm merecido maior atenção, uma vez que são esferas ocas com uma membrana bicamada hidrofóbica e coronas internas e externas hidrofílicas. Diferentes de micelas e análogos aos lipossomas, as

vesículas poliméricas são consideradas mais robustas, estáveis e versáteis, possibilitando a incorporação tanto de agentes ativos hidrofóbicos, na sua espessa membrana hidrofóbica, quanto de princípios ativos hidrofílicos, na sua cavidade interna^[23-25].

Além do potencial de modificação da superfície, permitindo o direcionamento para órgãos específicos, bem como o uso de gatilhos de liberação através de estímulos externos^[23], tais como alterações no pH^[26], temperatura^[27], oxidação/redução^[28], luz^[29], dentre outros.

A Figura 7 mostra a estrutura típica de uma vesícula polimérica, com as cadeias hidrofóbicas (vermelho) formando a membrana compacta da vesícula e as cadeias hidrofílicas solvatadas (azul) formando a corona interna e externa. Uma vesícula encapsulando um princípio ativo hidrofóbico (Figura 7.b), outra encapsulando um agente ativo hidrofílico no interior da vesícula (Figura 7.c) e uma última com a superfície modificada (decorada) (Figura 7.d)^[23].

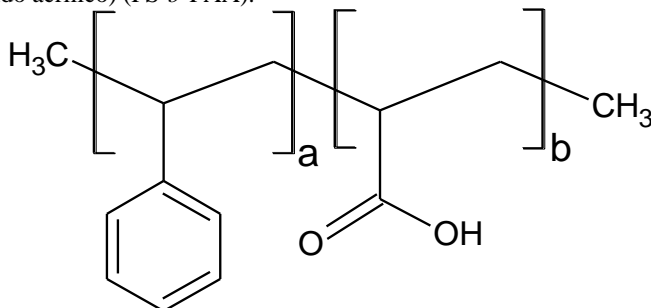
Figura 7. Representação esquemática de uma (a) vesícula polimérica, (b) vesícula com princípio ativo hidrofóbico, (c) vesícula com princípio ativo hidrofílico, (d) vesícula decorada (Adaptado da Ref. [23]).



2.2.2 PS-*b*-PAA

O PS-*b*-PAA é um copolímero dibloco anfifílico constituído por um bloco hidrofóbico de poliestireno (a) e outro bloco hidrofílico de poli(ácido acrílico) (b) (Figura 8). Nanoestruturas formadas a partir de PS-*b*-PAA tem sido intensivamente investigada, principalmente pelo grupo de Adi Eisenberg, que vem estudando este copolímero a mais de 20 anos^[30].

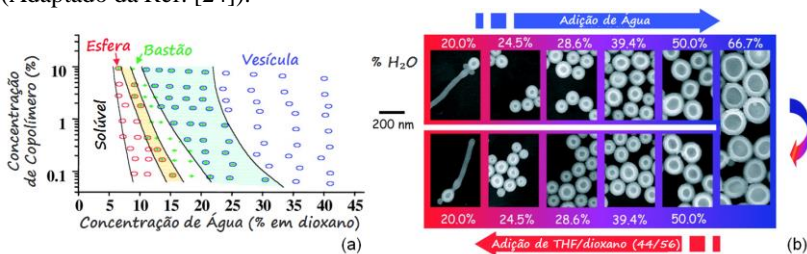
Figura 8. Representação estrutural do copolímero dibloco poliestireno-*b*-poli(ácido acrílico) (PS-*b*-PAA).



Quando em solvente seletivo para um dos blocos, tal como água, este copolímero forma agregados pela auto-associação do bloco hidrofóbico (PS), com o intuito de minimizar o contato com o solvente e o PAA que atua como estabilizante destas estruturas. Sob diferentes condições, como composição e proporção de cada um dos blocos, concentração do copolímero, natureza do solvente, porcentagem de água e presença de aditivos, podem-se observar uma variedade enorme de morfologias, como por exemplo, micelas esféricas e do tipo *crew-cut* (onde a corona de PAA é muito menor em comparação ao núcleo de PS)^[30], bastões^[31], lamelas e vesículas^[32], entre outras^[24].

Normalmente, utilizando como bom solvente para ambos os blocos, o tetraidrofurano (THF), temos favorecida a formação de micelas e utilizando o dioxano, temos o favorecimento na formação de vesículas. E ainda é possível realizar o controle morfológico apenas com a porcentagem de adição de água, como mostra a Figura 9(b). A Figura 9(a) representa um diagrama de fase do PS-*b*-PAA em dioxano-água, onde é visível as transições entre as fases de esfera, bastão e vesícula, além das regiões de coexistência entre uma fase e outra (regiões coloridas)^[24].

Figura 9. (a) Diagrama de fase do PS-*b*-PAA em dioxano-água em função das concentrações de copolímero e porcentagem de água em dioxano. As regiões coloridas entre as fases de esfera e bastão e entre as fases de bastão e vesícula correspondem às regiões de coexistência. (b) Representação das alterações morfológicas geradas pela porcentagem de adição de água e/ou dioxano/THF (Adaptado da Ref. [24]).



As vesículas de PS-*b*-PAA têm a característica de possuírem cargas negativas na sua superfície, decorrentes da dissociação dos blocos hidrofílicos de PAA em água, o que possibilita a modificação da superfície dessas nanoestruturas através de interações eletrostáticas com outras macromoléculas positivamente carregadas^[33,34].

2.3 POLIELETRÓLITOS

Os polieletrólitos ou políons são polímeros que desenvolvem cargas substanciais quando dissolvidos em solventes altamente polares, tal como água. Estas cargas surgem a partir de grupos ionizáveis presentes ao longo da cadeia molecular. As interações eletrostáticas entre os grupos ionizáveis, bem como a presença de outros eletrólitos em solução, conferem a essa classe de polímeros uma série de propriedades distintas das exibidas por polímeros neutros^[35].

Os polieletrólitos podem ser classificados de acordo com a solubilidade da sua cadeia principal não carregada, ou seja, espécies que não se dissolvem na ausência de carga são denominadas hidrofóbicas, enquanto que aquelas que se dissolvem são consideradas hidrofílicas^[35].

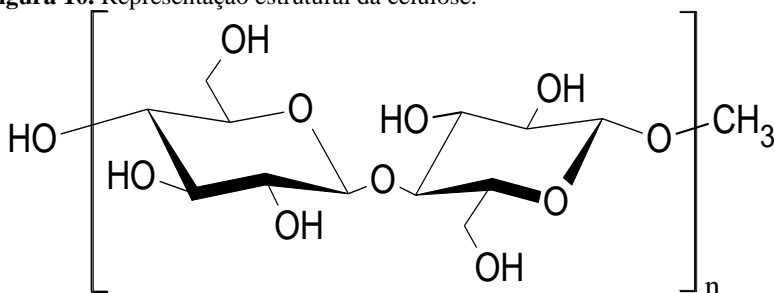
Os polieletrólitos que apresentam simultaneamente ambas as cargas positivas e negativas são chamados de polianfóteros. Podem apresentar um ponto isoelétrico, que corresponde a um pH ou condição da solução em que a densidade de cargas positivas e negativas são iguais, comportando-se como poliânions fracos em pH elevado ou como polications fracos em baixos valores de pH^[35].

Os polieletrólitos são produzidos sinteticamente pela polimerização de monômeros carregados ou pela funcionalização de polímeros neutros, naturais ou sintéticos. O DNA é o polieletrólito biológico mais conhecido, mas existem outros exemplos, como as proteínas e os polissacarídeos. Além das funções biológicas comuns, fora dos sistemas naturais, os polieletrólitos podem ser utilizados para modificar a reologia de soluções, controlar a agregação de partículas coloidais, ou alterar a natureza de superfícies por adsorção^[35].

2.4 POLISSACARÍDEOS

Os polissacarídeos são polímeros de origem natural formados por unidades monoméricas de açúcares (carboidratos), unidas por ligações glicosídicas, sendo as formas pentose e hexose as mais abundantes na natureza. Podem ser classificados segundo sua função, como polissacarídeos estruturais (celulose e quitina) ou de reserva (amido). Os polissacarídeos estruturais são linearmente arranjados de forma a constituírem a parede celular de plantas e alguns insetos^[36,37]. A Figura 10 mostra a estrutura química da celulose, formada pela união de moléculas de glicose através de ligações β -1,4-glicosídicas.

Figura 10. Representação estrutural da celulose.



Quando em solução, os polissacarídeos podem apresentar diferentes conformações da sua cadeia polimérica, principalmente quando aplicadas alterações de propriedades, tais como temperatura, pH, força iônica, entre outras, podendo promover transições morfológicas que variam de simples-hélice, dupla-hélice, tripla-hélice, novelo aleatório e outros agregados^[36].

Os polissacarídeos são considerados seguros, atóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis. Possuem um grande número de grupos funcionais reativos (radicais amina, hidroxila e carboxila), que podem

ser facilmente modificados quimicamente, resultando em diversos tipos de derivados. Essa versatilidade, unida ao baixo custo e alta disponibilidade, fazem com que inúmeros estudos sejam realizados com polissacarídeos e seus derivados para aplicação em sistemas de liberação de fármacos e diversas outras^[37-39].

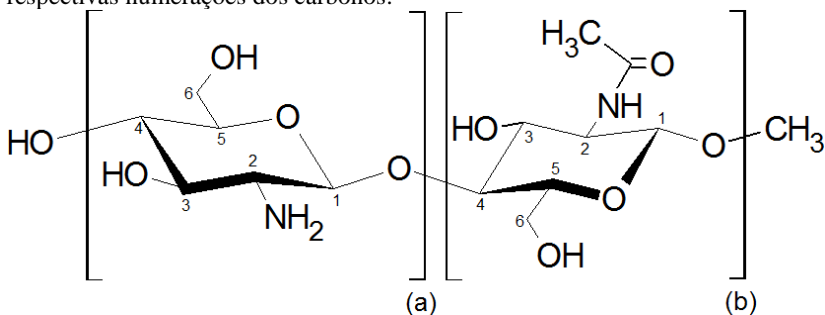
2.4.1 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da reação de N-desacetilação da quitina, segundo biopolímero mais abundante na natureza, depois da celulose. Extraído do exoesqueleto de crustáceos, insetos e alguns fungos^[40-43].

A quitina foi descoberta em 1811 por Braconnot e inicialmente chamada de “*fungine*”, por ter sido descoberto em cogumelos. Somente em 1823 que Odier nomeou como quitina. A quitosana, por sua vez, foi descoberta em 1859 por Rouget, após tratamento da quitina com KOH concentrado e altas temperaturas, propondo o termo “*quitina modificada*”. Em 1894, Hoppe-Seyler, ignorando o trabalho de Rouget, nomeou este polímero de quitosana^[44].

Quando o grau de desacetilação da quitina atinge cerca de 50 %, torna-se solúvel em meio ácido aquoso e passa a ser chamada de quitosana. Estruturalmente a quitosana é constituída de monômeros de glucosamina (2-amino-2-deoxi- β -1,4-D-glicopirronase) e N-acetilglucosamina (2-acetoamido-2-deoxi- β -1,4-D-glicopirronase) unidos através de ligações β -1,4-glicosídicas^[40,41,43] (Figura 11), onde (a) e (b) representam as unidades desacetilada e acetilada, respectivamente.

Figura 11. Representação estrutural das unidades monoméricas da quitosana, onde (a) representa a unidade desacetilada e (b) a unidade acetilada com as respectivas numerações dos carbonos.



Os polímeros de quitosana estão disponíveis em diferentes faixas de massa molar (50 kDa – 2000 kDa) e grau de desacetilação (50 % – 98 %), os quais variam de acordo com as condições de polimerização e desacetilação. A quitosana é solúvel em soluções de ácidos fracos diluídos, sendo o ácido acético o solvente mais empregado. Sua solubilidade é altamente dependente do grau de desacetilação e do pH. Sua solubilidade ocorre devido a protonação do grupo amina da posição C-2 da unidade D-glucosamina, sendo convertido para um polieletrólito em meio ácido^[41].

A quitosana é considerada um excelente promotor para a liberação de fármacos em diversas vias, tais como em mucosas (nasal e bucal), intestinal, além da via transdérmica, uma vez que melhora a permeabilidade na pele^[16].

Nas últimas duas décadas a maioria das formas de quitina, quitosana e seus derivados tem encontrado uma série de aplicações biomédicas, além de serem utilizadas no desenvolvimento de diversos tipos de sistemas de liberação de fármacos^[44,45]. Uma vez que, além da estrutura polimérica flexível, a quitosana apresenta grupos funcionais reativos: grupos amina, além de vários grupos hidroxila primária e secundária nas posições C-2, C-6 e C-3, respectivamente, possibilitando realizar diversas modificações químicas da sua cadeia polimérica^[40,46].

2.4.2 Modificação química da quitosana

A crescente utilização da quitosana se deve, principalmente, a sua natureza catiônica e reativa e as demais propriedades, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesividade e atoxicidade. A quitosana fornece grupos funcionais reativos como amina primária, hidroxila primária, bem como hidroxila secundária ao longo da sua cadeia polimérica, possibilitando a produção de um considerável número de derivados, responsáveis por alterações nas propriedades físico-químicas do polímero e que ampliam as suas aplicações^[41,46-48].

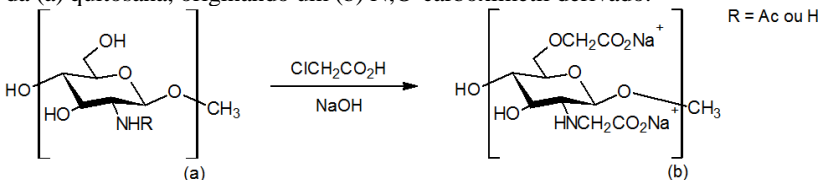
A incorporação de grupos hidrofílicos e/ou hidrofóbicos à cadeia da quitosana pode alterar propriedades como a solubilidade e flexibilidade do polímero, por exemplo, tornando seus derivados solúveis ou não em solventes aquosos e/ou orgânicos. Contudo, estas propriedades dependerão muito da massa molar, da estrutura química e do grau de substituição dos grupos inseridos^[47,48].

Por isso, dentre as reações de modificação química da quitosana, destacam-se a carboximetilação e a alquilação redutiva.

2.4.2.1 Carboximetilação

A introdução de grupos carboximetila na quitosana pode conduzir à formação de derivados aniônicos, N-carboximetil, O-carboximetil ou N,O-carboximetil, dependendo das condições reacionais empregadas. A utilização de solvente orgânicos apropriados facilita a reação. A carboximetilação ocorre preferencialmente no C-6 da hidroxila primária, no entanto, pode ocorrer, após a N-desacetilação sob condições altamente alcalinas, no C-2 da amina primária, deixando os grupos amina disponíveis para também reagirem^[41,48,49]. A Figura 12 representa o esquema básico da reação de carboximetilação.

Figura 12. Representação esquemática da reação de carboximetilação, partindo da (a) quitosana, originando um (b) N,O-carboximetil derivado.



Os derivados carboximetilquitosana são altamente solúveis em água, além de possuir propriedades físico-químicas e biológicas, tais como elevada viscosidade, grande volume hidrodinâmico, capacidade de formação de filmes e géis, tornando-os uma atraente opção para o uso em produtos alimentares, cosméticos e farmacêuticos. Ao variar o grau de substituição do grupo carboximetila inserido, pode-se obter várias densidades de carga na cadeia molecular, proporcionando uma forma conveniente de controlar o comportamento em diversos pH^[46].

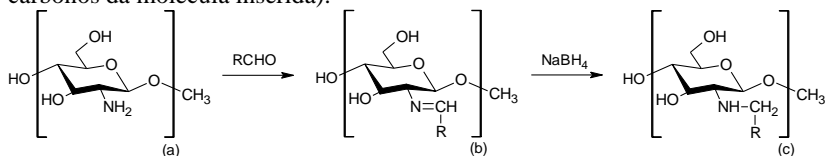
A quitosana modificada com grupos carboximetila é capaz de melhorar diversas propriedades, tais como a atividade antibacteriana, aumenta as propriedades adesivas, de absorção e de adsorção, bem como prolonga a liberação de alguns fármacos^[50].

2.4.2.2 Alquilação redutiva

O tratamento da quitosana com aldeídos alifáticos e um agente de redução é a maneira mais simples para a preparação de produtos N-alquilados, esse processo é chamado de alquilação redutiva. O grupo amina livre da quitosana reage com o aldeído por condensação para dar origem à sua correspondente imina (base de Schiff), que pode ser

facilmente convertida num N-alquil derivado através da redução com boroidreto de sódio (NaBH_4) ou cianoboroidreto de sódio (NaCNBH_3), como mostra a Figura 13^[40,48,51].

Figura 13. Representação esquemática da reação de alquilação redutiva, partindo da (a) quitosana, originando uma (b) imina (base de Schiff), que é convertida num (c) N-alquil derivado (R- na reação representa o número de carbonos da molécula inserida).



Outros métodos podem ser empregados para a produção de derivados alquilados de quitosana, como apresentado por MOURYA & INAMDAR^[46], que discutem as diversas modificações existentes e suas principais aplicações, sendo a entrega de DNA a aplicação mais importante da quitosana alquilada, uma vez que este derivado melhora a eficiência de transfecção (processo de introdução de DNA nas células), que é facilitada pelas interações hidrofóbicas e a descompactação do DNA a partir de transportadores produzidos com este derivado, devido ao enfraquecimento das atrações eletrostáticas entre o DNA e a quitosana alquilada. A eficiência de transfecção é aumentada e nivelada dependendo do número de carbonos do grupo alquila inserido.

A quitosana e muitos de seus derivados têm a capacidade de formar complexos através de interações eletrostáticas, o que possibilita utilizá-las na decoração de nanopartículas poliméricas.

2.5 INTERAÇÃO ENTRE NANOPARTÍCULAS E POLISSACARÍDEOS

A modificação da superfície de sistemas poliméricos nanoparticulados tem sido um tema muito estudado nos últimos anos, pois além das vantagens já existentes dos transportadores coloidais, tais como proteção do fármaco contra a degradação, maior estabilidade e a capacidade de aumentar a absorção e controlar a liberação do fármaco, as nanopartículas com superfície modificada trazem outras vantagens, como o aumento do tempo de circulação sanguínea, a proteção contra a adsorção de proteínas e a captura por células fagocitárias, além da possibilidade de vetorização do ativo para órgãos e tecidos específicos

através da funcionalização dos grupos reativos disponíveis na molécula do ligante, permitindo que as nanopartículas decoradas se liguem à receptores específicos presentes nas células alvo^[52].

A interação entre polímeros e a superfície de nanopartículas pode ser controlada por diversos fatores, como propriedades da superfície (natureza química, densidade de carga, etc.), propriedades do polímero (massa molar, estrutura química, concentração e presença de grupos funcionais reativos), a natureza do solvente e outros fatores externos como temperatura, pH e força iônica^[51].

Nanopartículas decoradas com polissacarídeos podem ser preparadas por adsorção, incorporação durante a preparação, copolimerização ou utilizando copolímeros pré-formados. A adsorção baseia-se no revestimento das nanopartículas previamente preparadas, suas interações podem ser de diferentes origens, como interações eletrostáticas, hidrofóbicas, dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio, entre outras^[43,52].

Quando um polieletrólito é adsorvido sobre a superfície de nanopartículas, a estrutura da dupla camada elétrica é modificada, causando uma neutralização seguida de inversão da carga. Esta inversão de carga tem sido evidenciada tanto em lipossomas^[53] quanto em vesículas poliméricas revestidas com polieletrólitos^[33,34,54].

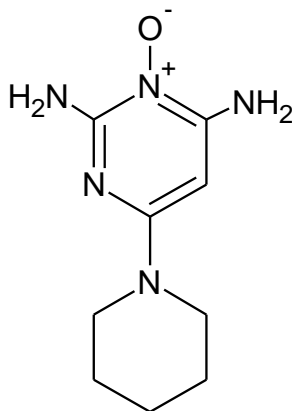
BARBAULT-FOUCHER & Colaboradores^[55] desenvolveram nanoesferas de poli- ϵ -caprolactona (PCL) revestidas com ácido hialurônico (HA), a fim de combinar a ação bioadesiva do HA com a liberação oftálmica prolongada. DU & Colaboradores^[56], por sua vez, sintetizaram um O-caboximetil quitosana derivado decorado com ácido glicirretínico para produção de conjugados com potencial direcionamento ao fígado. PRADHAN & Colaboradores^[57] têm estudado o uso de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) decoradas com ácido hialurônico para a entrega combinada de dois fármacos antitumorais (docetaxel e tanespimicin).

Como evidenciado, os polissacarídeos possuem distintas vantagens frente aos numerosos polímeros que podem ser utilizados para a modificação da superfície de nanopartículas, pois além da presença de grupos funcionais reativos, exibem características de biocompatibilidade e biodegradabilidade e excelentes propriedades, tais como atividades bio/mucoadesivas, antivirais, antibacterianas e antitumorais. Fazendo dos polissacarídeos uma promissora alternativa para a produção de nanopartículas com superfície modificada^[52].

2.6 MINOXIDIL

O minoxidil (MXD) é um fármaco derivado de pirimidina (6-(1-piperidino)-2,4-pirimidinadiamino-3-óxido), de fórmula molecular $C_9H_{15}N_5O$ (Figura 14), desenvolvido em 1963 pelo laboratório Upjohn (hoje incorporado à Pfizer) e introduzido na terapêutica em meados de 1970 pela ação anti-hipertensiva. Na mesma época, foi observado como efeito colateral a hipertricose (crescimento de pelos)^[58]. Este fato levou ao desenvolvimento de formulações tópicas contendo minoxidil para o tratamento da alopecia androgênica, sendo atualmente o principal medicamento recomendado para essa finalidade^[59]. Em 1985, foi estabelecido que 2 % é a menor concentração de minoxidil em solução tópica capaz de promover os efeitos terapêuticos desejados sem afetar a pressão sanguínea, sendo liberado em 1987 para o tratamento da alopecia^[58]. A partir de 1993, houve o aumento da dosagem para 5 %^[60]. Atualmente, o minoxidil é comercializado na forma de soluções tópicas com o nome comercial de Regaine® nas concentrações de 2 % e 5 %.

Figura 14. Representação estrutural do minoxidil.



Os mecanismos pelo quais o minoxidil aplicado topicamente estimula o crescimento capilar ainda são incertos, acreditava-se inicialmente que seria induzido pela ação vasodilatadora local, que aumenta o fluxo sanguíneo nas papilas dérmicas ao ativar os canais de K^+ sensíveis ao trifosfato de adenosina (K_{ATP}) desta área. Todavia, sabe-se atualmente que o minoxidil estimula o crescimento capilar por diversas formas: pode aumentar o diâmetro da fibra capilar; pode aumentar a taxa de crescimento capilar linearmente; pode alterar o ciclo

de desenvolvimento capilar, diminuindo a fase telógena (fase de repouso) e prolongando a fase anágena (fase de crescimento); ou agir pela combinação de todos esses efeitos^[59,60].

A aplicação tópica de sistemas nanoparticulados possibilita direcionar a liberação de fármacos para a via transfolicular devido ao controle do tamanho das nanopartículas^[61]. Nanopartículas poliméricas de copolímero em bloco de poli(ϵ -caprolactona)-*b*-poli(etilenoglicol) (PCL-*b*-PEG) para administração transdérmica de minoxidil foram descritas na literatura por SHIM & Colaboradores^[61], demonstrando que nanopartículas de 40 nm e 130 nm contendo minoxidil permearam a pele através dos folículos capilares. Entretanto, nenhum estudo contendo minoxidil e nanopartículas com superfície modificada foi encontrado, o mais próximo é um estudo elaborado por MURA & Colaboradores^[62], trazendo a utilização de vesículas de lecitina de soja (lipossomas) contendo alguns intensificadores de permeação.

2.7 FUNDAMENTOS TEÓRICOS DAS TÉCNICAS UTILIZADAS

2.7.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria e possibilita identificar grupos funcionais presentes na estrutura química de um composto através das transições vibracionais moleculares situadas na região do infravermelho^[63].

A condição para que ocorra absorção da radiação infravermelha é que haja variação do momento de dipolo elétrico da molécula, como consequência de seu movimento vibracional ou rotacional (o momento de dipolo é determinado pela magnitude da diferença de carga e a distância entre dois centros de carga). Somente nessas circunstâncias o campo elétrico alternante da radiação incidente interage com a molécula, originando os espectros. De outra forma, pode-se dizer que o espectro de absorção no infravermelho tem origem quando a radiação eletromagnética incidente tem uma componente com frequência correspondente a uma transição entre dois níveis vibracionais. A vibração dos átomos no interior de uma molécula apresenta energia coerente com a região do espectro eletromagnético correspondente ao infravermelho (100 cm^{-1} a 10.000 cm^{-1}). Porém, a região mais utilizada vai de 500 cm^{-1} a 4.000 cm^{-1} ^[63].

O espectro infravermelho de um composto químico é considerado uma de suas propriedades físico-químicas mais características e, por

esse motivo, a espectroscopia na região do infravermelho tem extensa aplicação na identificação de vários compostos^[63]. Esta técnica também é bastante utilizada em estudos de modificação química de polímeros e foi utilizada neste trabalho para verificar as mudanças, a nível molecular, que podem ter ocorrido durante os processos de formação destes compostos.

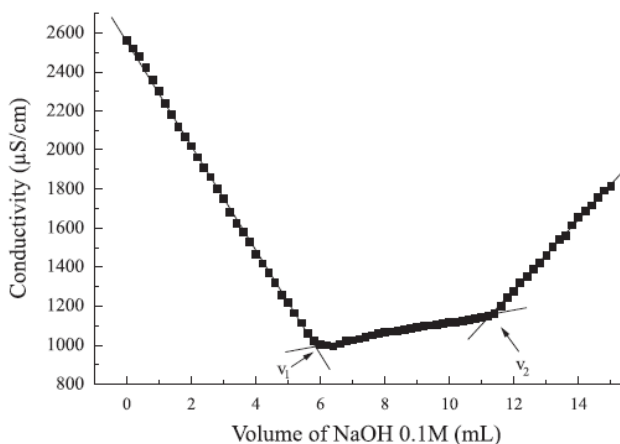
2.7.2 Condutividade elétrica

A condutividade elétrica é a medida da mobilidade das espécies iônicas em solução e depende do número de íons presentes na solução. Para eletrólitos fortes, a concentração de íons na solução é diretamente proporcional à concentração de eletrólito adicionado, em virtude da sua completa ionização. Enquanto que para os eletrólitos fracos, a concentração de íons na solução depende do seu equilíbrio de dissociação e, portanto, do grau de ionização (α) do eletrólito^[64].

Em soluções eletrolíticas a condutividade elétrica é uma importante propriedade, facilmente mensurável, que pode caracterizar tanto a estrutura química quanto as interações inter-iônicas presentes em solução. A Figura 15 ilustra um exemplo de curva de titulação condutimétrica, onde exibe diferentes regiões (pontos de inflexão) que indicam a dissociação de grupos protonados da molécula^[49].

Neste trabalho, a técnica foi utilizada para a determinação do grau de desacetilação da quitosana e do grau de substituição dos compostos elaborados.

Figura 15. Representação gráfica de uma titulação condutimétrica^[49].



2.7.3 Viscosidade

A viscosidade de um polímero é a resistência ao escoamento das moléculas em função do atrito interno causado tanto pelo tamanho quanto pelo enovelamento das cadeias^[17]. Uma característica importante de soluções poliméricas é que a viscosidade aumenta consideravelmente em relação ao solvente puro ou de soluções diluídas de pequenas moléculas. Isso ocorre devido à grande diferença de tamanho entre as moléculas de polímero e as de solvente^[65].

O estudo viscosimétrico de soluções poliméricas permite obter informações a respeito da sua massa molar, dimensões da cadeia polimérica em solução e, conseqüentemente, da qualidade do solvente para o polímero estudado (medida pela intensidade de solvatação do polímero)^[17,65].

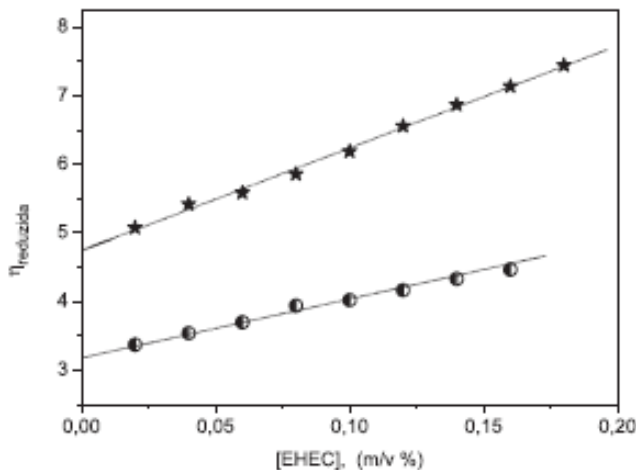
A viscosidade de soluções poliméricas pode ser expressa de diferentes formas, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Definições de tipos de viscosidade e suas respectivas relações (Adaptado da Ref. [17]).

Nome	Equação que define	Unidade
Viscosidade Relativa	$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0} \quad (1)$	Adimensional
Viscosidade específica	$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 = \frac{(t - t_0)}{t_0} \quad (2)$	Adimensional
Viscosidade Reduzida	$\eta_{red} = \frac{\eta_{esp}}{c} \quad (3)$	dL/g
Viscosidade Inerente	$\eta_{iner} = \frac{\ln(\eta_{rel})}{c} \quad (4)$	dL/g
Viscosidade Intrínseca	$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{esp}}{c} \right) = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\ln \eta_{rel}}{c} \right) \quad (5)$	dL/g

A viscosidade de soluções poliméricas diluídas aumenta com o aumento da concentração e com o aumento das dimensões da cadeia polimérica. O limite da viscosidade reduzida (η_{red}) para soluções infinitamente diluídas é a viscosidade intrínseca $[\eta]$. A viscosidade intrínseca é obtida pela extrapolação gráfica da relação de viscosidade reduzida *versus* concentração^[17,65], como mostra a Figura 16. Esta relação pode ser utilizada para determinar a massa molar viscosimétrica média (M_V) a partir da equação de Mark-Houwink-Sakurada.

Figura 16. Representação gráfica da relação entre viscosidade reduzida vs. concentração de polímero^[66].



$$[\eta] = KM_v^\alpha \quad (6)$$

Onde K e α são constantes para um determinado sistema de polímero/solvente/temperatura. Geralmente os valores de α situam-se entre 0,5 e 0,8, comuns para polímeros de cadeias flexíveis. Já valores de α maiores estão relacionados com macromoléculas rígidas. Normalmente, o valor de K diminui com o aumento de α ^[17].

Os valores de K e α podem ser determinados experimentalmente utilizando uma série de polímeros monodispersos homólogos, que diferem apenas no seu peso molecular. As viscosidades intrínsecas destes polímeros são então relacionadas ao respectivo peso molecular, por meio do logaritmo da Equação 6^[17].

O cálculo de massa molar viscosimétrica não é absoluto, por isso a necessidade de métodos complementares, como o espalhamento de luz. Contudo, em comparação com outras técnicas, a viscosimetria possui vantagens, uma vez que é um método simples, rápido e barato, além de aplicável à uma vasta faixa de massas molares.

2.7.4 Espalhamento de luz

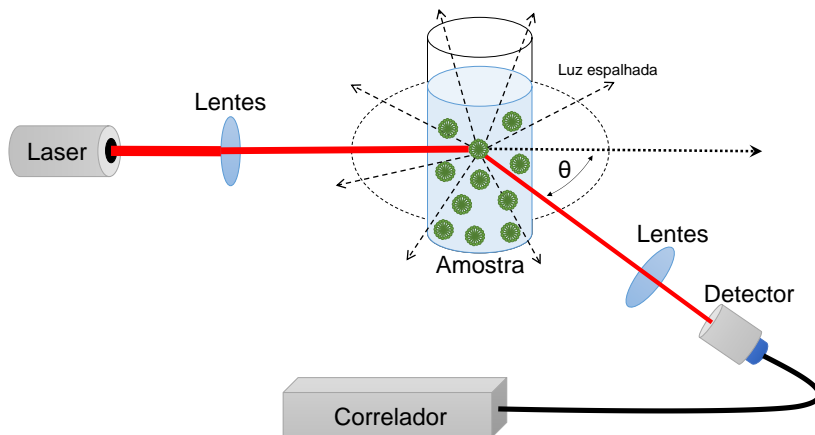
O espalhamento de luz é um dos métodos mais utilizados na caracterização de polímeros, pois fornece informações a respeito da massa molar ponderal média (M_w), da magnitude das interações

polímero-solvente e polímero-polímero (A_2) e do tamanho médio das cadeias, bem como do raio hidrodinâmico (R_H), raio de giração (R_g), dentre outros parâmetros^[17].

A teoria do espalhamento de luz foi inicialmente proposta por Lord Rayleigh, em 1871, aplicando a teoria eletromagnética clássica para explicar o fenômeno de espalhamento de luz por moléculas de gases^[17,67].

A técnica consiste na interação (incidência) de um feixe de luz (radiação eletromagnética) sobre uma partícula. Os fótons, dependendo da amostra, podem ser absorvidos, transmitidos (não interagem com a amostra), reemitidos como luz de baixa frequência (fluorescência, fosforescência) ou espalhados. O espalhamento dos fótons deste feixe para direções (ângulos θ) diferentes da direção do feixe incidente ($\theta = 0$) são recebidos por um detector (Figura 17). A intensidade da luz espalhada depende do comprimento de onda da luz incidente, do ângulo de observação, do número de espécies espalhadores presentes na amostra, do tamanho e morfologia destas espécies, da concentração e da natureza química das mesmas, além de propriedades como viscosidade, índice de refração e polaridade do solvente^[68].

Figura 17. Representação esquemática do equipamento de espalhamento de luz, onde a amostra está representada por micelas poliméricas (Adaptado da Ref. [17]).



A técnica de espalhamento de luz é uma das principais bases para o desenvolvimento deste trabalho, sendo assim, faz-se necessário esclarecer alguns aspectos a respeito da teoria que orienta as

informações obtidas nos experimentos realizados tanto por espalhamento de luz dinâmico (DLS) quanto por espalhamento de luz estático (SLS).

2.7.4.1 Espalhamento de luz estático (SLS)

No espalhamento de luz estático (SLS - do inglês *Static Light Scattering*), considera-se apenas a intensidade média da luz espalhada numa dada direção, sem levar em conta as flutuações ou distribuições de frequência da luz. Nos experimentos de espalhamento de luz estático a intensidade da luz espalhada (I_θ) é medida em diferentes ângulos θ . Se os centros de espalhamento são pequenos, como em moléculas gasosas, comparados com o comprimento de onda da radiação (dimensões menores que $\lambda/20$), a razão entre a luz incidente e a luz espalhada é conhecida como a razão de Rayleigh, pela equação^[17,68]:

$$R_\theta = \frac{I_\theta}{I_0} \cdot r^2 \quad (7)$$

Onde R_θ é a razão de Rayleigh, I_θ é a luz espalhada, I_0 é a luz incidente, r é a distância entre a partícula e o detector e θ é o ângulo entre a direção da luz incidente e da luz espalhada.

Para sistemas diluídos, a razão de Rayleigh pode ser relacionada com a massa molar (M_w) e a concentração (c) pela equação:

$$\frac{K_C}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{M_w} \quad (8)$$

Onde ΔR_θ é a diferença entre as razões de Rayleigh da solução e do solvente puro e K é a constante óptica, que é expressa por:

$$K = \frac{4\pi^2 n^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{N_A \lambda^4} \quad (9)$$

Onde n é o índice de refração do solvente, dn/dc é o incremento do índice de refração com a concentração do soluto, N_A é o número de Avogadro e λ é o comprimento de onda^[17,19,65,68].

A razão de Rayleigh depende da polarizabilidade da macromolécula, que por sua vez é função do incremento do índice de refração (dn/dc). Para determinar este parâmetro é utilizado um refratômetro diferencial, que tem um feixe de luz monocromática que

atravessa uma célula que possui dois compartimentos, um dos compartimentos contém o solvente (referência) e o outro contém o soluto. A variação do índice de refração em função da concentração é dada pela Equação 10:

$$\frac{\Delta n}{c} = \left(\frac{dn}{dc} \right) + \alpha_1 c + \dots \quad (10)$$

Onde α é a constante de proporcionalidade ou polarizabilidade, colocando-se em gráfico os valores de $\Delta n/c$ versus c e extrapolando-se à concentração zero, obtém-se o incremento do índice de refração^[17].

A equação 8 só é válida para soluções com concentrações bem diluídas, onde não existam interações intermoleculares, em concentrações finitas, existem interações intermoleculares que devem ser levadas em consideração, o qual considera-se que as flutuações na polarizabilidade das moléculas dependem do potencial químico e, portanto, podem ser relacionadas à pressão osmótica. Desta forma, a Equação 11 pode ser expressa pela expansão virial:

$$\frac{K_C}{\Delta R_0} = \frac{1}{M_W} + 2A_2c + 3A_3c^2 + \dots \quad (11)$$

Onde, A_2 e A_3 são o segundo e o terceiro coeficiente virial, respectivamente. Os coeficientes viriais descrevem as propriedades das interações intermoleculares a concentrações finitas. Valores de A_2 positivos indicam boa interação polímero-solvente e valores negativos indicam que as interações polímero-polímero são maiores do que as interações polímero-solvente. O terceiro coeficiente virial (A_3), na maioria dos casos, tem valores muito pequenos e são desprezados^[17,68].

Para macromoléculas as quais o tamanho do novelo é maior do que $\lambda/20$, a luz espalhada varia com o ângulo de observação, isso porque o espalhamento poderá ocorrer a partir de vários centros da mesma partícula. Considerando essas diferenças de espalhamento é necessário introduzir um fator de espalhamento ou fator de forma, $P(\theta)$, aos cálculos, assim a Equação 11 fica^[17,19,65]:

$$\frac{K_C}{\Delta R_0} = \frac{1}{P(\theta)} \left(\frac{1}{M_W} + 2A_2c + 3A_3c^2 + \dots \right) \quad (12)$$

Sendo que a equação para o fator de forma é:

$$P(\theta) = 1 - \frac{1}{3} \left(\frac{4\pi n}{\lambda} \right)^2 Rg \sin^2 \left(\frac{\theta}{2} \right) \quad (13)$$

Onde Rg é o raio de giração da partícula, o fator de forma pode ser escrito em função do vetor de onda do espalhamento (q):

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \left(\frac{\theta}{2} \right) \quad (14)$$

Reescrevendo a Equação 13:

$$\frac{1}{P(\theta)} = 1 + \frac{1}{3} Rg^2 q^2 \quad (15)$$

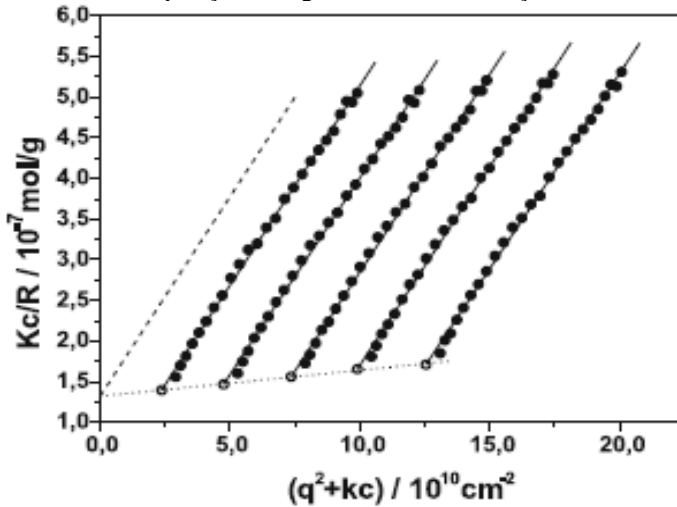
Nesta dedução, a expressão fator de forma é independente da forma da partícula, podendo ser aplicado contanto que $Rg^2 q^2 < 1$, isto é, para um pequeno q , ou equivalentemente, um pequeno θ ^[17,65].

Incorporando as correlações impostas pelo fator de espalhamento na Equação 16, chega-se à equação conhecida como Equação de Zimm^[17,65,69,70]:

$$\frac{K_C}{\Delta R_\theta} = \left(1 + \frac{1}{3} Rg^2 q^2 \right) \cdot \left(\frac{1}{M_w} + 2A_2 c + \dots \right) \quad (16)$$

Os valores de massa molar (M_w), segundo coeficiente virial (A_2) e raio de giração (Rg) podem ser obtidos pelo método de Zimm, utilizando a razão Kc/R_θ versus $\sin^2(\theta/2) + kc$, onde kc é uma constante arbitrária utilizada para garantir a separação gráfica das curvas. O gráfico consiste em duas extrapolações simultâneas, mantendo ângulo constante enquanto varia-se a concentração ($c = 0$) e mantendo concentração constante enquanto varia-se o ângulo ($\theta = 0^\circ$), conforme mostrado na Figura 18^[68]:

Figura 18. Representação esquemática de um gráfico de Zimm, onde os tracejados são as extrapolações a ângulo zero e concentração zero^[68].



Do gráfico de Zimm obtemos:

Intercepto = $1/M_w$ (massa molar)

Coefficiente angular da curva c ($c = 0$) = $1 + 1/3 R_g^2$ (raio de giração)

Coefficiente angular da curva θ ($\theta = 0^\circ$) = $2A_2$ (segundo coeficiente virial)

O raio de giração (R_g) ainda pode ser obtido através da Equação de Guinier, sendo válida apenas quando $qR_g < 1$. Na região de baixos valores de q , o valor de $I(q)$ é descrito pela Equação 17:

$$\ln I(q) = \ln I_0 - q^2 \left(\frac{R_g^2}{3} \right) \quad (17)$$

Os parâmetros M_w , A_2 e R_g são propriedades estáticas da macromolécula solvatada, ou seja, não dependem da dinâmica browniana da cadeia, resultante das forças de difusão entre segmentos da cadeia e solvente^[17,65].

2.7.4.2 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

No espalhamento de luz dinâmico (DLS - do inglês *Dinamic Light Scattering*), considera-se as flutuações espaciais na intensidade de

luz espalhada em função do tempo, numa dada direção (ângulo θ). Essas flutuações se originam das variações no índice de refração dentro do volume de espalhamento, devido ao movimento browniano das partículas. A relação entre a intensidade (I) de luz espalhada no ângulo (q), no tempo (t) e no tempo ($t + \tau$), expressa uma curva de autocorrelação (g_2), tal como na equação 18^[68]:

$$g_2(q, \tau) = \frac{\langle I(q, t)I(q, t + \tau) \rangle}{\langle I(q, t) \rangle^2} \quad (18)$$

As flutuações de espalhamento estão relacionadas com o coeficiente de difusão aparente e o vetor de onda do espalhamento, segundo a Equação:

$$\Gamma = D \cdot q^2 \quad (19)$$

Onde Γ é a constante de correlação ou de relaxação, D é o coeficiente de difusão aparente e q é o vetor de onda do espalhamento^[17,65].

Dentro do regime diluído, D varia linearmente com a concentração da amostra (c), ou seja:

$$D = D_0(1 + k_D c + \dots) \quad (20)$$

Onde D_0 é o coeficiente de difusão à diluição infinita, k_D é o coeficiente “virial” hidrodinâmico relacionado com as interações soluto-soluto e de soluto-solvente.

Uma característica importante do movimento browniano é que partículas pequenas se movem mais rapidamente do que partículas grandes, portanto, possuem maior coeficiente de difusão (D_0)^[19].

A Equação de Stokes-Einstein (Equação 21) relaciona o coeficiente de difusão à diluição infinita e o raio hidrodinâmico (R_H):

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_0} \quad (21)$$

Onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta e η é a viscosidade do solvente^[17,65].

A morfologia de partículas em solução pode ser estimada por espalhamento de luz através da relação entre raio de giração (R_g) com o raio hidrodinâmico (R_H), obtendo o parâmetro (ρ) pela Equação 22:

$$\rho = \frac{R_g}{R_H} \quad (22)$$

A Tabela 2 mostra os valores de ρ calculados, relacionado às morfologias mais frequentemente encontradas^[68].

Tabela 2. Valores de ρ para partículas com morfologias típicas (Adaptado da Ref. [68]).

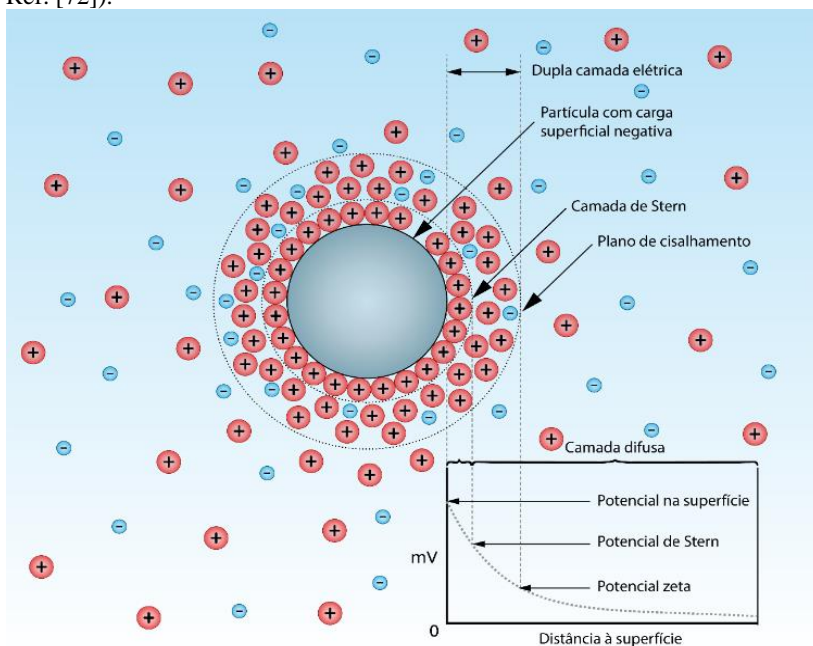
Morfologia	Parâmetro (ρ)
Microgel	0,3-0,5
Esfera rígida homogênea	0,8
Esfera oca	1,0
Elipsóide	0,7
Novelo aleatório	1,5
Bastão rígido	< 2

Sendo assim, como exposto, pode-se dizer que a principal diferença entre as medidas de espalhamento de luz estático (SLS) e espalhamento de luz dinâmico (DLS) é que, no caso do SLS, mede-se a intensidade média da luz espalhada por um conjunto de partículas, enquanto que no DLS, medem-se as flutuações da intensidade da luz espalhada em função do tempo.

2.7.5 Potencial Zeta (ζ)

A maioria das substâncias (partículas) adquire uma carga elétrica superficial quando em contato com um meio polar, através de mecanismos tais como ionização, adsorção e dissolução de íons. O desenvolvimento desta carga superficial afeta a distribuição de íons na região interfacial circundante das partículas, resultando num aumento na concentração de íons de carga oposta (contra íons) próximos a superfície, ao passo que íons de mesma carga são repelidos. Este fato leva à formação de uma dupla camada elétrica ao redor de cada partícula, que é constituída por duas partes: uma região interna chamada de camada de Stern, onde os íons estão fortemente ligados, e outra denominada de camada difusa (ou camada de Gouy-Chapman) que se distribui em torno da primeira, formando uma atmosfera iônica (Figura 19)^[19,71,72].

Figura 19. Representação esquemática da dupla camada elétrica (Adaptado da Ref. [72]).



Os fenômenos eletrocinéticos têm em comum a característica do movimento relativo entre uma superfície carregada e o volume de solução. Em suma, uma superfície carregada é submetida a uma força num campo elétrico e, reciprocamente, um campo elétrico é induzido pelo movimento relativo de tal superfície. Se uma partícula se move, uma parte desta camada se move também como parte da partícula (plano de cisalhamento hidrodinâmico). O potencial neste plano é conhecido como potencial zeta^[71].

A medida do potencial zeta consiste na aplicação de um campo elétrico em toda dispersão coloidal. Partículas com carga são atraídas em direção ao eletrodo de carga oposta. Quando atingido um equilíbrio entre estas duas forças opostas as partículas se movem com uma velocidade constante e proporcional ao potencial zeta. Esta velocidade é denominada mobilidade eletroforética, depende da força do campo elétrico aplicado, da constante dielétrica e da viscosidade do meio^[72]. Pode ser obtida pela aplicação da lei de Henry:

$$U_E = \frac{2e\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (23)$$

Onde U_E é a mobilidade eletroforética, ε é a constante dielétrica, ζ é o potencial zeta, η é a viscosidade do meio e $f(ka)$ é a função de Henry.

O potencial zeta fornece uma indicação que pode ser utilizada para prever e controlar a estabilidade de sistemas coloidais. Valores de potencial zeta bastante negativos ou positivos, obtidos pela adição de eletrólitos à suspensão, é importante para a estabilização físico-química de dispersões coloidais, pois graças a esta carga superficial, as forças repulsivas atuarão impedindo a tendência de agregação^[19,71].

2.7.6 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A microscopia eletrônica teve início com a descoberta de que um feixe de elétrons, assim como a luz visível, comporta-se como onda e como partícula. De acordo com a equação de Broglie, o comprimento de onda de uma partícula é inversamente proporcional ao seu momento e a sua energia, como mostra a Equação 24^[73,74]:

$$\lambda = \frac{h}{m \cdot v} \quad \rightarrow \quad \lambda = \frac{1,22}{E^{1/2}} \quad (24)$$

Onde λ é o comprimento de onda, h é a constante de Plank, m é a massa, v é a velocidade da partícula e E é a energia do elétron.

Em 1926, Busch demonstrou que lentes magnéticas podem ser apropriadamente projetadas para direcionar elétrons e, desta forma, serem usadas na construção de um microscópio. O termo “Microscópio Eletrônico” foi primeiramente proposto em 1932 numa publicação de Ruska^[75].

A microscopia eletrônica de transmissão (MET ou TEM - do inglês *Transmission Electron Microscopy*) emprega lentes magnéticas ou elétricas de foco ajustável. Esse conjunto de lentes magnéticas condensa o feixe de elétrons livres emitidos no vácuo por um filamento pontual. Ao incidir na amostra, outra lente eletrônica, a objetiva, foca o feixe de elétrons transmitidos numa imagem intermediária, a qual é ampliada pelas lentes objetivas para formar a imagem na tela fluorescente (imagem final)^[73,74].

As imagens geradas por um microscópio eletrônico de transmissão possuem uma alta resolução, quando comparadas a um microscópio ótico, pois os elétrons gerados reagem diretamente com o

núcleo dos átomos e não com uma grande área, como ocorre com a luz incidente em um microscópio ótico. Permitindo obter imagens únicas, com grandes ampliações e detalhes morfológicos inimagináveis^[73,74].

Diversos fatores podem influenciar a obtenção de uma boa imagem no TEM, associados com o equipamento, como a formação do contraste, ou com a amostra, como a morfologia e a estrutura química do material, além do método de preparação. Sendo o TEM uma ferramenta valiosa num vasto campo científico, nas pesquisas químicas, físicas, médicas, biológicas e, principalmente, para a nanotecnologia^[73,74].

2.7.7 Eletroforese capilar (CE)

A eletroforese capilar (CE - do inglês *Capillary Electrophoresis*) é definida como uma técnica de separação baseada nas velocidades de migração diferenciada de compostos iônicos e/ou ionizáveis pela ação de um campo elétrico. As partículas migram para o ânodo ou cátodo em função da sua carga específica e a separação ocorre pela diferença entre as mobilidades iônicas, que estão relacionadas com a razão carga/massa e com fatores estruturais^[76-79].

Desenvolvida pelo químico sueco Arne Tiselius no início da década de 30, a eletroforese foi usada para o estudo de proteínas do soro sanguíneo. O formato capilar foi somente idealizado por Stellan Hjertén na década de 70^[78].

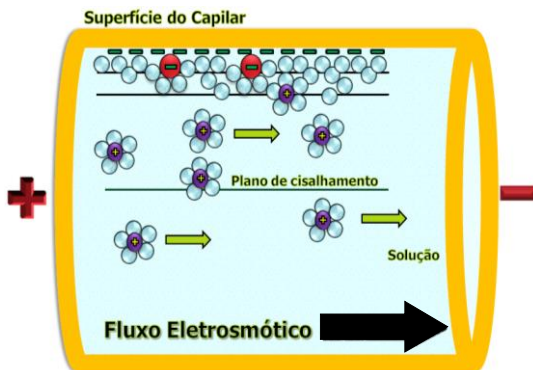
A técnica consiste basicamente de uma fonte de alta tensão, para o estabelecimento de um campo elétrico ao longo do capilar; um tubo capilar, normalmente de sílica fundida (com dimensões que variam de 15-100 μm de diâmetro interno e 30-150 cm de comprimento); dois eletrodos de platina que entram em contato com os recipientes que contêm os eletrólitos de corrida ou amostras; um detector e um computador para aquisição e tratamento dos dados^[76-79]. Conforme esquematizado na Figura 20.

Figura 20. Representação esquemática de um equipamento de eletroforese capilar (Adaptado da Ref. [76]).



Um fator extremamente importante que ocorre em CE é o fluxo eletrosmótico (FEO), gerado pela presença de grupos silanóis na parede interna do capilar. Estes grupos apresentam caráter ácido e, dependendo do pH do meio (acima de $\text{pH} = 3,0$), tornam-se ionizados, liberando prótons que deixam a parede do capilar carregada negativamente. Os cátions presentes na solução formam uma dupla camada elétrica pela interação com a parede do capilar. Ao aplicar uma diferença de potencial no capilar, os cátions presentes na solução migram para o eletrodo de carga oposta (cátodo), gerando assim o fluxo eletrosmótico^[78,79], como representado na Figura 21.

Figura 21. Representação esquemática do fluxo eletrosmótico (Adaptado da Ref. [76]).



A eletroforese capilar oferece vantagens em relação a outros métodos, tais como o baixo custo por análise, o baixo volume necessário de amostras, reagentes e solventes, o alto poder de separação, além da compatibilidade com diferentes tipos de detectores^[79]. E neste trabalho foi utilizada para determinar o teor e a eficiência de encapsulação.

2.7.8 Cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas (GC-MS)

A cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massas (GC-MS - do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) é uma das mais importantes técnicas analíticas para a separação e determinação de compostos orgânicos voláteis e/ou volatilizáveis. O processo de separação ocorre por meio da distribuição dos componentes da amostra entre uma fase estacionária (coluna cromatográfica) e uma fase móvel, no caso da GC, constituída por um gás de arraste, que deve ser puro e inerte, e percola através da primeira carregando os analitos. Este gás de arraste pode ser o hélio, nitrogênio ou hidrogênio^[80-82].

Uma vez separados, os analitos são direcionados ao espectrômetro de massa, que tem por finalidade converter um composto em subprodutos mensuráveis (fragmentos moleculares) que serão utilizados na indicação da estrutura química original. Esse processo ocorre através da ionização das moléculas por um feixe de elétrons de alta energia, este feixe remove um elétron da camada de valência, produzindo uma espécie altamente energética, conhecido como íon molecular cátion radical (M^+). Os íons moleculares gerados contêm um excesso de energia que não é igual para todos os íons, este excesso de energia é suficiente para produzir a quebra de ligações (a faixa de energia das ligações covalentes varia entre 50 a 100 kcal/mol), resultando na fragmentação do íon molecular em partículas menores, originando diversos novos cátions, ânions, radicais livres e pequenas moléculas neutras. Os íons positivamente carregados são separados da mistura resultante de acordo com as suas razões massa/carga (m/z) e fornece um espectro com as abundâncias relativas dos íons individuais. Através desse processo é obtido um padrão de fragmentação característico e informações sobre as características estruturais do composto^[82].

Depois de obtido um bom espectro de massa para cada composto, a identificação é realizada através da análise do espectro e pela pesquisa na biblioteca NIST. Esta biblioteca possui mais de 65.000 espectros de compostos puros, os quais podem ser comparados com os espectros de

massa obtidos, gerando uma lista de compostos mais prováveis. O estudo do espectro obtido pela análise dos fragmentos deve ser realizado após a obtenção da listagem dos compostos mais prováveis, aumentando assim, a possibilidade de a espécie indicada pela biblioteca ser realmente determinado composto^[82].

Neste trabalho, a técnica foi utilizada para a determinação do remanescente de solvente orgânico presente na suspensão de nanopartículas após os processos de diálise e rotaevaporação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanopartículas a partir do copolímero dibloco anfifílico poliestireno-b-poli(ácido acrílico) (PS-b-PAA) e estudar as interações entre as nanopartículas formadas e a presença de diferentes derivados de quitosana, avaliando as características físico-químicas, bem como, a viabilidade de aplicação das nanopartículas decoradas como um sistema de encapsulação do princípio ativo minoxidil, visando a aplicabilidade em sistemas de liberação controlada deste fármaco.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar derivados de quitosana através da inserção de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos à estrutura química da quitosana;
- Caracterizar a quitosana e seus derivados quanto ao seu grau de desacetilação e grau de substituição;
- Preparar nanopartículas a partir do copolímero PS-b-PAA pelo método de co-solvente seguido de diálise;
- Caracterizar as nanopartículas obtidas quanto ao seu tamanho, morfologia, polidispersidade e potencial zeta;
- Determinar o efeito da decoração das nanopartículas com quitosana e seus derivados sobre os parâmetros físico-químicos de tamanho, morfologia, polidispersidade e potencial zeta;
- Determinar o teor e a eficiência de encapsulação do minoxidil através da técnica de eletroforese capilar;
- Determinar o remanescente de solvente orgânico nas suspensões de nanopartículas.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

O copolímero em bloco de poliestireno e poli(ácido acrílico) (PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃), onde os subscritos representam o grau médio de polimerização de cada bloco, foi adquirido da empresa Polymer Source Inc. (Canadá), cuja massa molar numérica (M_N) de PS é de 45.000 g/mol e PAA de 4.500 g/mol, PDI (grau de polidispersidade) de 1,18 e fração de volume calculado para o PAA de 0,13. O minoxidil, matéria-prima, foi adquirido da Farmácia Homeopática Galênica - Lote 116691. O minoxidil, padrão USP, a quitosana e os demais reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich e utilizados sem purificação prévia.

4.2 EQUIPAMENTOS E MÉTODOS UTILIZADOS

4.2.1 Modificação química da quitosana

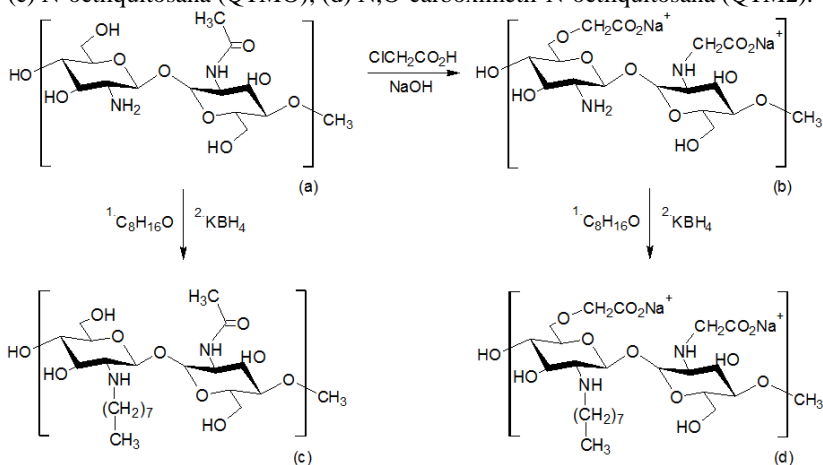
Os procedimentos utilizados para obtenção dos derivados de quitosana foram adaptados dos procedimentos descritos por LIU & Colaboradores^[83] e QU & Colaboradores^[84], para a inserção de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos à cadeia principal da quitosana, por meio de duas reações, a carboximetilação e a alquilação redutiva, obtendo-se três diferentes derivados, o N,O-carboximetilquitosana, o N-octilquitosana e o N,O-carboximetil-N-octilquitosana, que neste trabalho foram identificados pelas siglas QTMA, QTMO e QTM2, respectivamente, conforme apresentado no Figura 22.

Primeiramente, 2 g de quitosana foram transferidos para um balão de fundo redondo (100 mL) e acrescentados 30 mL de 2-propanol. Essa mistura foi mantida sob agitação constante durante 1 hora em temperatura ambiente, em seguida foram adicionados 5,0 mL (gota a gota) de uma solução concentrada de NaOH (15 mol/L) e agitada durante 1 hora. Após foram adicionados 10 g de ácido cloroacético, agitado por 1 hora em temperatura ambiente, em seguida aquecido até 60 °C e mantido sob agitação constante nesta temperatura durante 24 horas. Terminada a reação, a mistura foi filtrada, o sólido resultante lavado com metanol e seco sob vácuo.

Na segunda reação, 1 g de quitosana (ou do derivado QTMA) foi transferido para um balão de fundo redondo (100 mL) e acrescentados 30 mL de metanol. Essa mistura foi mantida sob agitação constante durante 1 hora, posteriormente foi adicionado 1 g de octanal (gota a

gota) e agitado durante 4 horas a 30 °C. Em seguida foram adicionados 5,0 mL de uma solução de borohidreto de potássio (KBH₄) 0,1 g/mL e mantido sob agitação constante durante 4 horas a 30 °C. Terminada a reação, a mistura foi filtrada, o sólido resultante lavado com água, metanol e éter dietílico e seco sob vácuo antes das análises de caracterização.

Figura 22. Representação esquemática da modificação partindo da (a) quitosana e produzindo três derivados (b) N,O-carboximetilquitosana (QTMA); (c) N-octilquitosana (QTMO); (d) N,O-carboximetil-N-octilquitosana (QTM2).



4.2.2 Caracterização da quitosana e seus derivados

4.2.2.1 Determinação do grau de desacetilação da quitosana e do grau de substituição dos derivados de quitosana

4.2.2.1.1 Análise de infravermelho (IR)

As análises de infravermelho foram realizadas no laboratório POLIMAT. Os espectros de infravermelho (pastilhas de KBr) da quitosana e seus derivados foram obtidos utilizando um espectrofotômetro Shimadzu IR Prestige FTIR, operando em transmitância na faixa de 4000-400 cm⁻¹, com uma resolução de 2 cm⁻¹.

O espectro de infravermelho pode confirmar a ocorrência de uma reação, através do surgimento das bandas correspondentes aos grupos funcionais da estrutura química do composto, além disso, pode ser útil

para determinar o grau de desacetilação (GD) da quitosana utilizando a seguinte relação:

$$GD = 100 \left[1 - \left(\frac{A_{1655}}{A_{3340}} \right) \left(\frac{1}{1.33} \right) \right] \quad (25)$$

Onde A representa a absorvância no número de onda determinado, os dois sinais de absorção (1655 e 3340 cm⁻¹) correspondem à amida e aos grupos amina primárias da quitosana, respectivamente. O fator (1.33) representa o valor da proporção de A₁₆₅₅/A₃₃₄₀ para a quitosana totalmente N-acetilada^[42].

4.2.2.1.2 Titulação condutimétrica e potenciométrica

O grau de desacetilação da quitosana e o grau de substituição dos seus derivados podem ser determinados através da titulação condutimétrica e potenciométrica das soluções aquosas destes compostos, conforme os procedimentos reportados por GE & LUO^[85] e ABREU & CAMPANA-FILHO^[49]. Para tanto, foram tomados 100 mg de amostra dissolvidos em 100 mL de água destilada. O pH da solução foi ajustado para pH < 2 com adição de ácido clorídrico concentrado. A solução em seguida foi titulada com uma solução aquosa de NaOH 0,1 mol/L, previamente padronizada. Os valores de pH e condutividade foram registrados utilizando um pHmetro Beckman φ 71 pH meter com um eletrodo de vidro combinado e um conditivímetro portátil Gehaka CG-220 com uma célula de condutividade (constante K = 1.0). A solubilização e a titulação foram realizadas em banho termostatizado a 25,0 ± 0,1 °C.

O grau de desacetilação (GD) e o grau de substituição (GS) foram calculados a partir do volume de NaOH utilizado, de acordo com as equações:

$$GD = \left(\frac{161 \cdot [\text{NaOH}] \cdot [v_2 - v_1]}{m} \right) \cdot 100 \quad (26)$$

$$GS = \left(\frac{161 \cdot ([\text{NaOH}] \cdot [v_2 - v_1])}{m - (\text{MM} \cdot [\text{NaOH}] \cdot [v_2 - v_1])} \right) \cdot 100 \quad (27)$$

Onde 161 representa a massa molar da glucosamina (unidade monomérica da quitosana desacetilada), [NaOH] é a concentração de NaOH (mol/L), v é o volume de base adicionada para alcançar o ponto de inflexão (L), m é a massa da amostra (g) e MM é a massa molar dos

grupos a serem calculados (42 = grupo acetila; 58 = grupo carboximetila; 112 = grupo octila).

4.2.2.2 Determinação da massa molar viscosimétrica média da quitosana

Para determinação de viscosidade intrínseca $[\eta]$, foi adotado o procedimento descrito por SANTOS & Colaboradores^[40], utilizando um viscosímetro SCHOTT AVS 350, tubo capilar Cannon-Fenske, nº 75, diâmetro de 0,54 mm e banho termostatzado em $25,0 \pm 0,1$ °C. Cerca de 50 mg da amostra de quitosana foi dissolvida em 25 mL de uma solução tampão (ácido acético 0,3 mol/L / acetato de sódio 0,2 M, pH = 4,5) sob agitação constante por 24 horas. A solução foi então aquecida em banho-maria a 80 °C durante dois minutos e após atingir a temperatura ambiente, acrescentou-se 25 mL de solução tampão e aqueceu-se novamente a 80 °C por mais dois minutos. Após atingir a temperatura ambiente, a solução foi filtrada em membrana de porosidade 0,45 μm . Foram preparadas cinco diferentes soluções, compreendendo concentrações na faixa entre 0,2 - 1,0 mg/mL. As médias das quatro determinações foram calculadas utilizando 10 mL de cada solução, que ficavam imersas no banho termostatzado a $25,0 \pm 0,1$ °C durante cinco minutos antes da realização das medidas.

As condições de baixa tensão e velocidade de cisalhamento permitem determinar a viscosidade intrínseca $[\eta]$, que é utilizada para calcular a M_v a partir da equação de Mark-Houwink-Sakurada, com valores definidos de $K = 0,075$ e $\alpha = 0,76$, considerando o grau de desacetilação, a temperatura e o solvente utilizado^[17]:

$$[\eta] = KM_v^\alpha \quad (6)$$

4.2.3 Preparação das nanopartículas

Para a preparação das nanopartículas foi adotado o procedimento desenvolvido por PORTO^[33]. Utilizando o método de co-solvente seguida de diálise, que consiste da diluição do copolímero num solvente termodinamicamente bom para ambos os blocos, seguida da adição lenta e progressiva de um solvente seletivo para um dos blocos, fazendo com que o bloco solvofóbico se organize minimizando o contato com o solvente, promovendo a formação de nanoestruturas bem definidas em escala nanométrica.

Resumidamente, o copolímero de PS-*b*-PAA foi dissolvido em dioxano na concentração de 0,5% e mantido sob agitação constante a

temperatura ambiente durante algumas horas até completa solubilização. Utilizando uma bomba de seringa SAMTRONIC ST-670, adicionou-se lentamente água ultrapura no fluxo de 250 $\mu\text{L/h}$ e agitação constante de 1000 rpm, até o dobro do volume inicial. Em seguida, foi adicionado um excesso de água ultrapura, o equivalente a 10 vezes o volume anterior, com o intuito de inibir a cinética de agregação das nanopartículas. A suspensão coloidal foi dialisada durante dois dias utilizando uma membrana de diálise semipermeável (MWCO 3,5 kDa), para eliminação do solvente orgânico.

4.2.4 Decoração das nanopartículas com quitosana e seus derivados

As nanopartículas produzidas a partir do copolímero PS-*b*-PAA pela metodologia desenvolvida por PORTO^[33], geram vesículas com cargas de superfície negativas decorrentes dos grupos de ácido acrílico na forma ionizada no pH da água destilada, $\text{pK}_a = 4,26$ ^[34]. A quitosana e seus derivados, por sua vez, possuem cargas positivas derivados dos grupos amina livres. Essa diferença de carga faz com que a quitosana e seus derivados sejam adsorvidos na superfície das nanopartículas e a quantidade de polícatión necessário para a cobertura completa pode ser evidenciada por medidas de potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico^[33,34].

A quitosana e suas versões modificadas foram dissolvidas separadamente em solução tampão (ácido acético 0,2 mol/L / acetato de sódio 0,1 mol/L, pH = 4,5) e mantidas em agitação constante durante 24 horas. Volumes específicos foram tomados e preparadas diluições nas faixas de concentração entre 1,25 - 125 $\mu\text{g/mL}$. Compreendendo diferentes proporções de [QT-x]/[PS-*b*-PAA] (razões entre 0,001 – 1,0) foram misturadas sob agitação constante durante 30 minutos antes da realização das análises de caracterização.

4.2.5 Caracterização das nanopartículas revestidas

4.2.5.1 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O raio hidrodinâmico (R_H) das nanopartículas de PS-*b*-PAA, bem como dos diferentes sistemas de [QT-x]/[PS-*b*-PAA], foram medidos utilizando um Goniômetro ALV/CGS-3, equipado por um detector com um laser de 22 mV HeNe, operando a um comprimento de onda de 632,8 nm. A dependência angular do DLS foi investigada em ângulos que variaram entre 30° e 150°, em intervalos de 10°, durante 300s para

cada ângulo. As medidas foram tomadas usando 2,0 mL de cada suspensão (vesículas de PS-*b*-PAA e misturas de [QT-*x*]/[PS-*b*-PAA], em diluições previamente estimadas) com cubetas cilíndricas e temperatura constante $25,0 \pm 0,1$ °C. O raio hidrodinâmico (R_H) pode ser obtido, para suspensões de nanopartículas esféricas, a partir da equação de Stokes-Einstein:

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_0} \quad (21)$$

Onde R_H é o raio hidrodinâmico, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura da amostra, η é a viscosidade do meio, com base no valor de coeficiente de difusão aparente (D).

4.2.5.2 Potencial Zeta (ζ)

O potencial de superfície foi estimado por medidas de potencial zeta (ζ), baseada na mobilidade eletroforética, que é convertida em potencial zeta utilizando a relação de Smoluchowski, num campo elétrico de 150 V/cm. O potencial zeta das nanopartículas de PS-*b*-PAA, bem como dos diferentes sistemas de [QT-*x*]/[PS-*b*-PAA], foram verificados no laboratório LaCBio, utilizando um Zetasizer NanoZS (Malvern Equipamentos). Bastante semelhante à seção anterior (seção 4.2.5.1), cerca de 1,0 mL de cada suspensão foi tomada para a realização das medidas em triplicata, a $25,0 \pm 0,1$ °C, em cubeta específica.

4.2.5.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma das técnicas mais utilizadas para a caracterização de nanopartículas, pois fornece uma informação visual da distribuição de tamanho e morfologia das nanopartículas. As imagens foram registradas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC), utilizando um microscópio eletrônico de transmissão MET 100 kV JEM-1011, operando a uma voltagem de aceleração de 80 kV. A preparação das amostras consistiu na deposição de cerca de 5 μ L de cada suspensão sobre grids de cobre revestidas com uma fina camada de carbono (Cu grid 200 mesh). As amostras foram secas à pressão atmosférica e temperatura ambiente. As imagens foram capturadas em diferentes ampliações.

4.2.6 Preparação das nanopartículas encapsuladas com minoxidil

A preparação das nanopartículas encapsuladas com minoxidil foram realizadas conforme item 4.2.3, com uma única diferença que, ao invés de água ultrapura, foram utilizadas soluções contendo minoxidil com diferentes concentrações (40 - 200 µg/mL). A encapsulação do minoxidil ocorreu durante a formação das vesículas poliméricas pela adição de solução aquosa de minoxidil sobre a solução contendo o copolímero PS-*b*-PAA em dioxano, sob condições controladas (taxa de 250 µL/h e agitação constante de 1000 rpm) até a proporção de 50:50 de dioxano:solução aquosa de minoxidil. Durante a adição da solução aquosa de minoxidil, as partes hidrofóbicas do copolímero se associam de maneira a minimizar o contato com a água e o fármaco é encapsulado no interior das vesículas. Após a adição da solução de minoxidil, um excesso de água foi adicionado (equivalente a três vezes o volume da suspensão). A suspensão foi em seguida rotaevaporada a 50% do seu volume para a eliminação do solvente orgânico. O procedimento para a decoração das nanopartículas foi o mesmo utilizado no item 4.2.4. O pH final das formulações foi em torno de 5,0.

4.2.7 Determinação do teor e da eficiência de encapsulação do minoxidil nas suspensões de nanopartículas

Todos os experimentos foram realizados no laboratório LABEC utilizando eletroforese capilar (Agilent Technologies HP^{3D}CE), equipado com um detector de arranjo de diodos. Foi utilizado o software HP Chemstation para obtenção e tratamento dos dados. As medidas eletroforéticas foram realizadas a 25 °C num capilar de sílica fundida sem revestimento (48,5 cm de comprimento total × 8,5 cm de comprimento de detecção × 50 µm de diâmetro interno x 375 µm de diâmetro externo) adquirida da empresa Polymicro Technologies (Phoenix, EUA), utilizando como eletrólito 20 mmol/L de glicina e 20 mmol/L de ácido málico em pH 3,0. Entre corridas o capilar foi lavado por 1,0 min com eletrólito. Foi realizada curva de calibração com soluções padrão (50 ppm de imidazol) e amostras (0,5-90 ppm de minoxidil) que foram introduzidas a partir da extremidade de entrada do capilar e injetado hidrodinamicamente a 50 mbar por 5 s (50 mbar = 4.996,2 PA). A tensão aplicada para a separação foi de 30 kV, de polaridade positiva do lado da injeção. A detecção UV foi realizada diretamente a 288 nm.

O teor e a eficiência de encapsulação foram estimados após a determinação da concentração de minoxidil contidas no sobrenadante das suspensões de nanopartículas por eletroforese capilar. Foram estimadas como sendo a diferença entre a concentração inicial utilizada e a concentração de minoxidil do sobrenadante obtido pelo procedimento de centrifugação das nanopartículas utilizando uma microcentrífuga MiniSpin Plus de Eppendorf, a 14000 rpm durante 60 minutos. A eficiência de encapsulação (EE) foi expressa em concentração percentual, de acordo com a Equação 28:

$$EE (\%) = C1 - C2 \times 100 \quad (28)$$

Onde C1 é a concentração inicial utilizada e C2 é a concentração livre, contida no sobrenadante.

4.2.8 Determinação do remanescente de dioxano nas suspensões de nanopartículas

Os experimentos foram realizados no laboratório LQAG, utilizando um cromatógrafo a gás Shimadzu GCMS-2010 acoplado à espectrômetro de massas. O cromatógrafo estava equipado com injetor do tipo split/splitless e coluna capilar DB-5MS (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de fase estacionária) adquirida da empresa Agilent Technologies J&W GC Columns (Santa Clara, EUA). As análises foram realizadas no modo de varredura total (15 a 400 u) e com elétron ionização (70 eV). As condições cromatográficas utilizadas foram: temperaturas do injetor e interface fixadas em 250 °C, o programa de temperatura do forno da coluna de 50 °C (3 min), 10 °C/min até 250 °C (5 min) e gás hidrogênio da empresa White Martins (São Paulo, BR) foi utilizado como gás carreador com vazão de 1,5 mL/min em modo de injeção split (1:5).

Foram preparadas duas amostras de nanopartículas, uma utilizando o processo de diálise (conforme item 4.2.6) e outra o de rotaevaporação, ambos para a eliminação do resíduo de solvente orgânico. Para o processo de rotaevaporação, a suspensão de nanopartículas com o excesso de água ultrapura foi adicionada num balão de fundo redondo de 50 mL e rotaevaporado em Rotaevaporador (Büchi/Brinkmann Rotovapor RE-111 e Büchi 461 Water Bath - Switzerland) à 60 °C até o volume de 50 %. Alíquotas de 100 µL das amostras foram transferidos para um vial, a extração das amostras foi

realizada com fibras de microextração em fase sólida (SPME - do inglês *Solid Phase Micro-Extraction*) de polidimetilsiloxano (PDMS) de 7 μm da empresa Supelco (Taufkirchen, DE). As fibras foram expostas às amostras por 30 minutos a temperatura ambiente, após a extração a fibra foi recolhida e levada ao cromatógrafo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

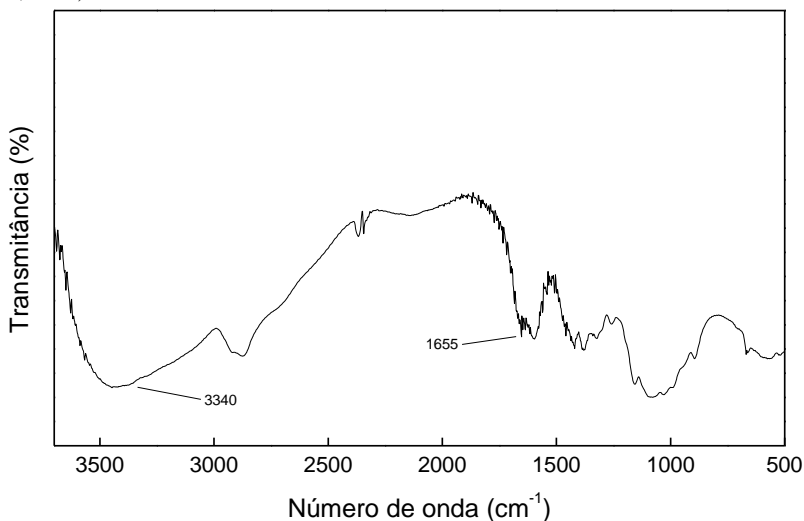
5.1.1 Determinação do grau de desacetilação da quitosana

O grau de desacetilação (GD) da quitosana pode ser determinado por diversas técnicas, dentre elas, pela espectroscopia de infravermelho, titulação potenciométrica e condutimétrica.

A técnica de infravermelho (IR) fornece espectros complexos, no entanto, com a mesma é possível classificar as principais bandas relativas a vibrações características aos grupos funcionais presentes na estrutura da quitosana (que serão melhor discutidas na seção 5.2.2), além de ser possível determinar o grau de desacetilação da quitosana, utilizando a Equação 25.

Os espectrofotômetros de infravermelho podem fornecer resultados tanto em absorbância (A) quanto em transmitância (T). Como esta equação emprega apenas absorbância, quando o resultado for recebido em transmitância, utiliza-se a relação ($A = -\log T$) para realizar as devidas transformações. A Figura 23 apresenta o espectro de IR obtido para a quitosana, cujo grau de desacetilação calculado foi de 83,07 %.

Figura 23. Espectro de IR da quitosana produzido em pastilha de KBr (GD = 83,07 %).



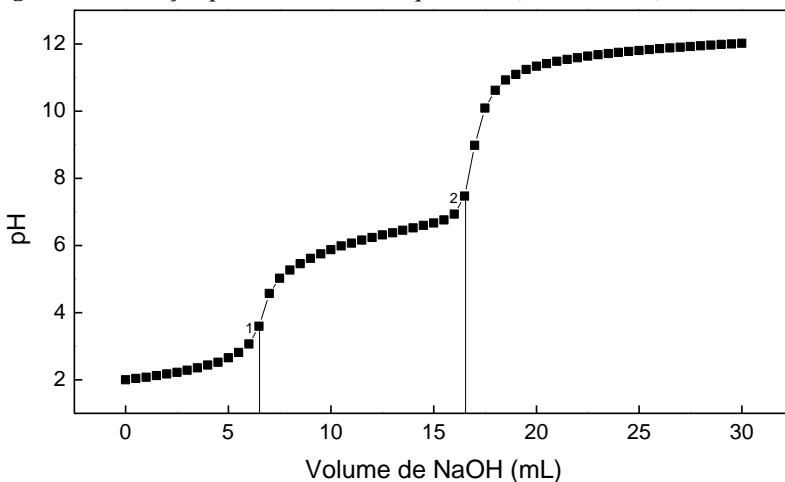
A quitosana é um polieletrólito fraco, apresentando grupos hidroxilas e grupos aminas livres distribuídos ao longo da cadeia polimérica, sendo assim, a potenciometria e a condutimetria são ótimas técnicas para avaliar o comportamento da quitosana em soluções aquosas em função do pH do meio.

A técnica de potenciometria é frequentemente utilizada para determinar o grau de substituição (GS) de um polímero após uma reação de modificação química, e além disso, pode ser utilizada para determinar o grau de desacetilação da quitosana.

A Figura 24 mostra que ocorre duas etapas de dissociação (pontos de inflexão no gráfico) para a quitosana durante o processo de titulação potenciométrica, e cada uma dessas etapas está relacionada à dissociação dos grupos protonados hidroxila e amina, respectivamente^[49].

O grau de desacetilação da quitosana calculado por titulação potenciométrica a partir da Equação 26^[49] foi de 80,5 %.

Figura 24. Titulação potenciométrica da quitosana (GD = 80,5 %).

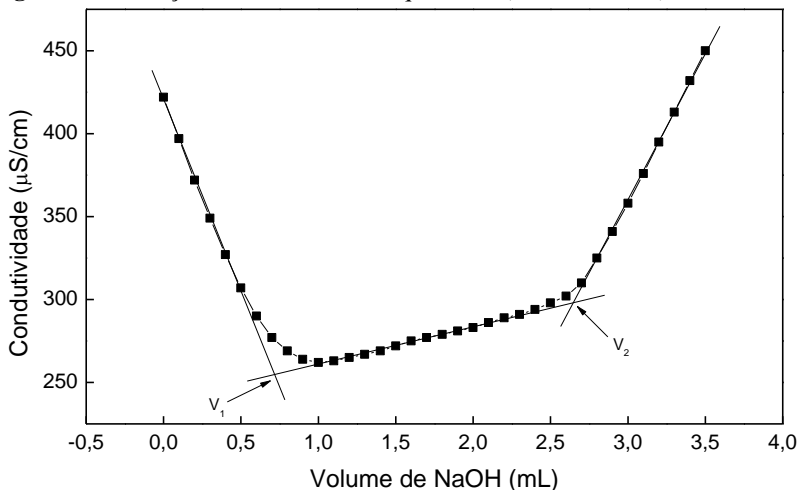


Utilizando o método da segunda derivada o grau de desacetilação da quitosana foi de 82,89 %, valor bem mais próximo ao obtido pela análise de infravermelho.

A técnica de condutimetria, assim como a potenciometria, é uma técnica comumente utilizada para determinar grau de substituição e grau de desacetilação. A Figura 25 mostra que, assim como na titulação potenciométrica, ocorre dois eventos (pontos de inflexão no gráfico)

durante o processo de titulação condutimétrica, relacionados à dissociação dos grupos protonados hidroxila e amina, respectivamente. E o grau de desacetilação da quitosana calculado por titulação condutimétrica foi de 81,09 %.

Figura 25. Titulação condutimétrica da quitosana (GD = 81,09 %).



Resultados estes que corroboram com a faixa apresentada pelo fornecedor que é de 75 % - 85 % de grau de desacetilação.

5.1.2 Determinação da massa molar viscosimétrica da quitosana

A massa molar viscosimétrica média (M_v) de um polímero pode ser determinada por meio do tempo de escoamento de soluções diluídas em tubos capilares. Considerando que nessas condições a densidade das soluções e do solvente são as mesmas, a viscosidade relativa (η_r) é igual a razão entre os tempos de escoamento das soluções e do solvente puro. A viscosidade específica (η_{esp}) é a diminuição da unidade da viscosidade relativa. A viscosidade é uma grandeza que, dependendo do sistema, aumenta com a concentração de soluto e a relação η_{esp}/C é conhecida como viscosidade reduzida (η_{red}). A extrapolação da η_{red} para a concentração zero fornece a viscosidade intrínseca $[\eta]$, que é utilizada para calcular a M_v a partir da equação de Mark-Houwink-Sakurada (Equação 6).

Como já descrito na seção 4.2.2.2, utilizando um viscosímetro SCHOTT AVS 350, foram determinados os tempos de escoamento para o solvente puro e para as soluções de quitosana na faixa de concentração entre 0,2 - 1,0 mg/mL, conforme mostra a Tabela 3.

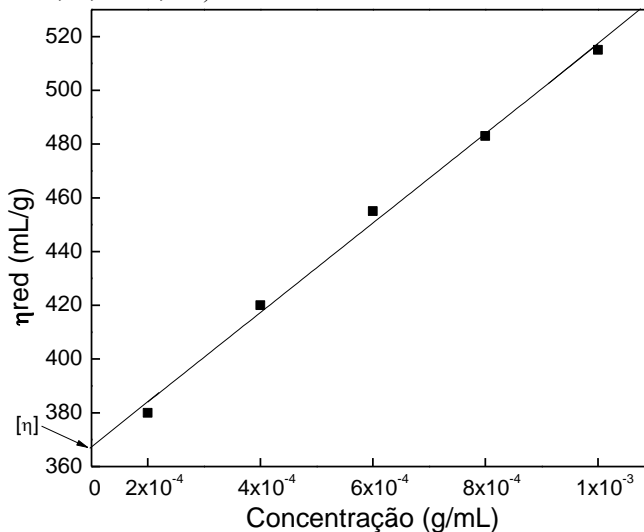
Tabela 3. Concentrações das soluções de quitosana com os respectivos tempos médios de escoamento obtidos a $25,0 \pm 0,1$ °C e os desvios padrão.

Concentração (x 10³ g/mL)	t_{médio} (s)	Desvio Padrão (s)
0,0 ^a	141,38	0,01
0,2	152,11	0,02
0,4	165,07	0,03
0,6	180,40	0,01
0,8	196,01	0,02
1,0	214,19	0,01

^a Representa o solvente puro

Os valores definidos de $K = 0,075$ e $\alpha = 0,76$, considerando o grau de desacetilação (< 85 %), a temperatura e o solvente utilizado, foram os mesmos utilizados por BRUGNEROTTO & Colaboradores^[86] e KASAAI^[87]. O valor da $[\eta] = 367,15$ corresponde ao coeficiente linear do gráfico representado na Figura 26. Utilizando esses valores na equação de Mark-Houwink-Sakurada, temos que a massa molar viscosimétrica média da quitosana foi de aproximadamente 70.000 g/mol.

Figura 26. Determinação da viscosidade intrínseca $[\eta]$ da quitosana a $25,0 \pm 0,1$ °C ($[\eta] = 367,15$; $R = 0,997$).



5.2 DERIVADOS DE QUITOSANA: MODIFICAÇÃO QUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO

5.2.1 Modificação química da quitosana

Foram sintetizados três derivados de quitosana modificadas pelas reações de carboximetilação com ácido cloroacético, produzindo um derivado hidrofílico, o derivado N,O-carboximetilquitosana (QTMA). Pela reação de alquilação redutiva com octanal, produzindo um derivado hidrofóbico, o derivado N-octilquitosana (QTMO). E pela combinação das reações de carboximetilação e de alquilação redutiva, produzindo um derivado anfílico, o derivado N,O-carboximetil-N-octilquitosana (QTM2). Os mecanismos de cada reação são apresentados nas subseções seguintes.

5.2.1.1 Derivado hidrofílico

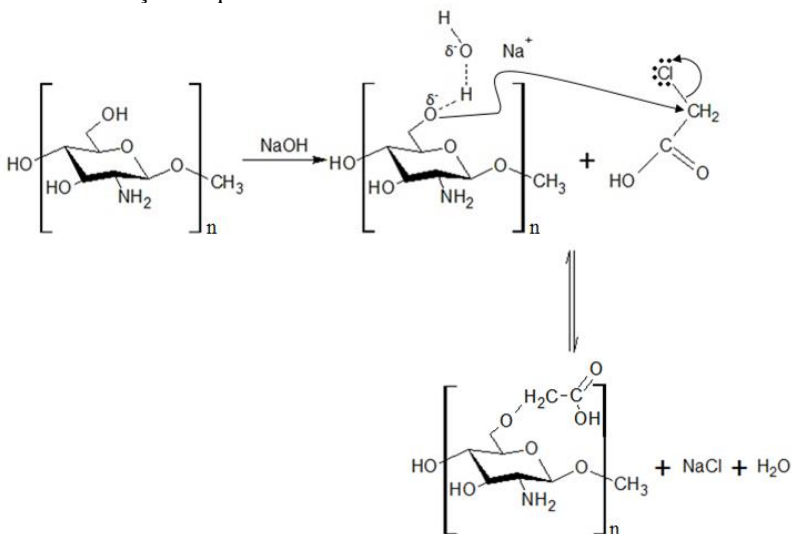
A modificação da quitosana para um composto mais solúvel em meio aquoso pode ser alcançada através da reação de carboximetilação, resultando num derivado carboximetilquitosana. Obtido pela reação dos

grupos amins e/ou grupos hidroxilas da quitosana com um agente carboxilante, tal como o ácido cloroacético ou o ácido glioxílico.

Devido à presença de grupos hidroxila e amina, ambos contendo par de elétrons disponíveis, pode-se obter derivados N-, O-, ou N,O-substituídos, através do controle de alguns parâmetros reacionais, tais como solvente, temperatura e tempo de reação.

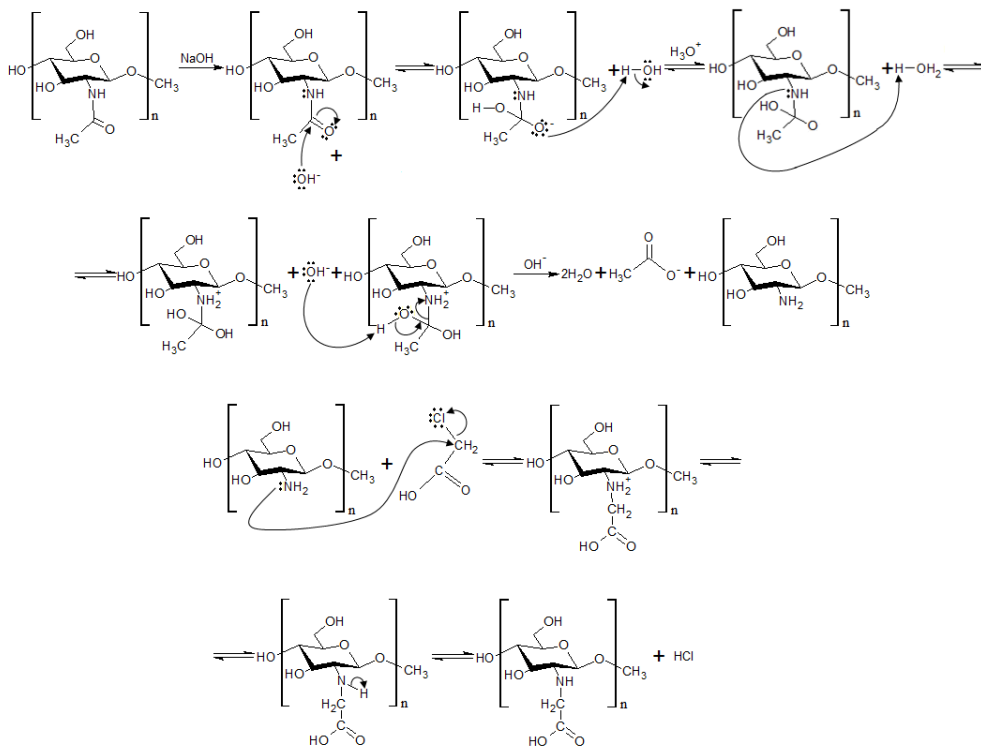
Para se obter preferencialmente o O-carboximetil derivado, a reação deve ser realizada em meio fortemente alcalino, pois como o grupo hidroxila é um nucleófilo mais fraco do que o grupo amina, o uso do hidróxido de sódio (NaOH) ativa os grupos hidroxilas, conforme demonstrado na Figura 27.

Figura 27. Representação esquemática do mecanismo de reação de O-carboximetilação da quitosana.



Mas como a quitosana utilizada não é 100 % desacetilada, o meio fortemente alcalino favorece a ocorrência da reação de desacetilação. A reação de desacetilação da quitosana é uma reação de amida em solução básica, a qual possibilita a obtenção de mais grupos amina livres, que ocorre pela adição nucleofílica de OH⁻ para o grupo carbonila na amida, seguida pela desprotonação do grupo OH⁻ e eliminação do ácido carboxílico, fazendo com que os grupos amins fiquem disponíveis para reagirem e originarem o N-carboximetil derivado em menor quantidade, como mostra a Figura 28.

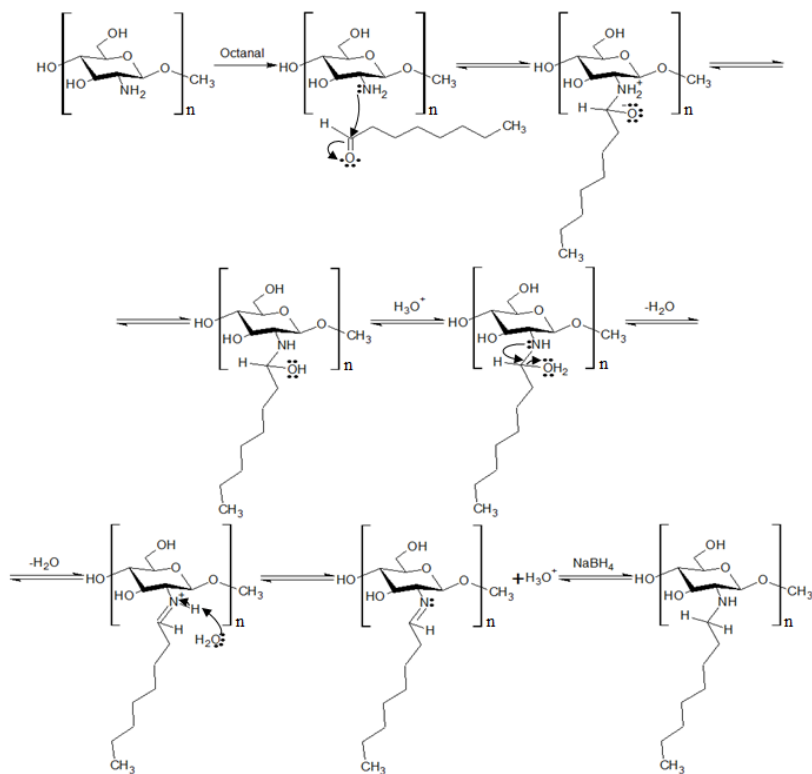
Figura 28. Representação esquemática do mecanismo de reação de desacetilação e N-carboximetilação da quitosana.



5.2.1.2 Derivado hidrofóbico

O processo de alquilação da quitosana consiste numa reação de adição nucleofílica que envolve duas etapas: primeiramente com a formação da imina (base de Schiff), pela reação entre o nitrogênio presente na cadeia da quitosana e o carbono da carboxila do aldeído. Em seguida ocorre a segunda etapa, com a redução da dupla ligação da base de Schiff e a formação de uma ligação covalente simples, obtendo-se o N-alkil derivado (Figura 29).

Figura 29. Representação esquemática do mecanismo de reação de N-alquilação redutiva da quitosana.



5.2.1.3 Derivado anfífilo

Para a obtenção do derivado anfífilo da quitosana é realizada ambas as reações descritas nas subseções 5.2.1.1 e 5.2.1.2 para a inserção de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. Primeiramente é realizada a reação de carboximetilação, o carboximetil derivado em seguida é utilizado para realizar a reação de alquilação redutiva, originando o N,O-carboximetil-N-alquil derivado.

5.2.2 Caracterização por infravermelho

A técnica de infravermelho é uma ferramenta valiosa na caracterização de polissacarídeos como a quitosana, sendo possível classificar as principais bandas referentes aos grupos funcionais da sua estrutura e os novos grupos inseridos após as reações de modificação química da quitosana. A Figura 30 apresenta os espectros de infravermelho e a Tabela 4 as principais bandas de absorção no infravermelho obtidos para a quitosana e seus derivados.

Figura 30. Espectros de IR da QT (-) e dos derivados QTMA (-), QTMO (-) e QTM2 (-) produzidos em pastilhas de KBr.

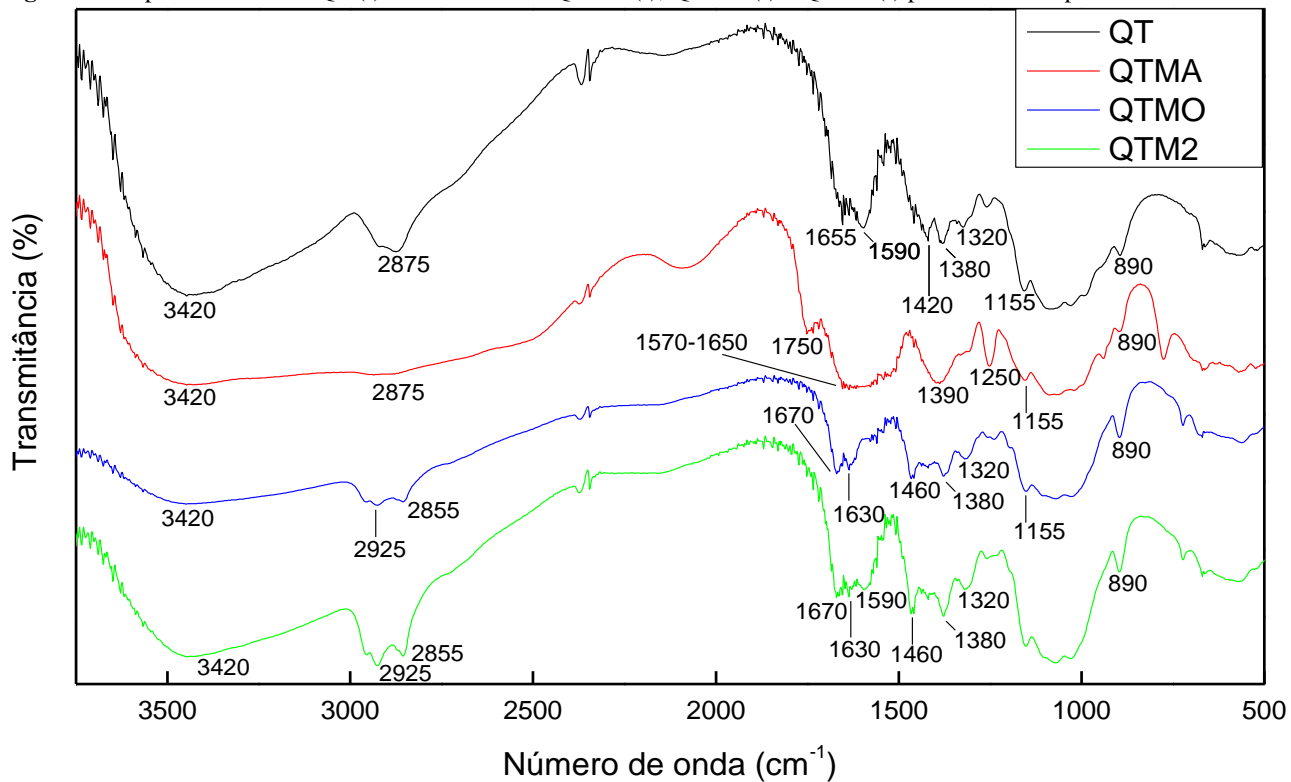


Tabela 4. Principais bandas de absorção no infravermelho observadas para a quitosana e seus derivados.

Atribuições	Número de onda (cm ⁻¹)			
	QT	QTMA	QTMO	QTM2
Estiramento axial (O-H)	3420	3420	3420	3420
Estiramento axial (N-H)	3340	3340	3340	3340
Estiramento assimétrico (C-H)	2875	2875	2855 e 2925	2855 e 2925
Estiramento axial (C=O)	1655	1750	1670	1670
Estiramento angular (N-H)	1590	1570 a 1650	1630	1590
Estiramento axial (C-N)	1420	1390	1460	1460
Estiramento angular (C-H)	1380	1380	1380	1380
Estiramento axial (C-N)	1320	1320	1320	1320
Função álcool (C-O)	1250	1250	1250	1250
Estrutura polissacarídica	890 a 1155	890 a 1155	890 a 1155	890 a 1155

Como pode ser observado, o espectro da quitosana apresenta suas bandas características, uma banda intensa em 3420 cm⁻¹, referente ao estiramento axial da ligação O-H e, sobposta a ela, uma banda de estiramento axial de N-H em 3340 cm⁻¹; o estiramento assimétrico de C-H em 2875 cm⁻¹; o estiramento axial C=O em 1655 cm⁻¹, referente ao grupo acetila; o estiramento angular de amina (N-H) em 1590 cm⁻¹; o estiramento axial de amida (C-N) em 1420 cm⁻¹; o estiramento angular de C-H em 1380 cm⁻¹; o estiramento axial de amina (C-N) em 1320 cm⁻¹; a banda característica de função álcool (C-O) em 1250 cm⁻¹; e as bandas características da estrutura polissacarídica na região de 890 a 1155 cm⁻¹, muito semelhantes às apresentadas anteriormente na literatura^[83,84,88].

O espectro do derivado QTMA apresenta algumas mudanças em relação ao espectro da quitosana, como o deslocamento e diminuição da intensidade da banda do estiramento axial de C=O de 1655 cm⁻¹ para 1750 cm⁻¹; o deslocamento, aumento e alargamento da banda referente amina secundária entre 1570 cm⁻¹ a 1650 cm⁻¹; o alargamento e deslocamento da banda referente ao estiramento axial de amina (C-N) de 1320 cm⁻¹ para 1390 cm⁻¹; e o aumento da intensidade da banda característica da função álcool (C-O) em 1250 cm⁻¹, resultados estes em conformidade com os apresentados na literatura^[46,83].

O espectro do derivado QTMO apresenta como principais alterações, quando comparado ao espectro da quitosana e do derivado QTMA, o deslocamento e aumento da intensidade das bandas do estiramento assimétrico de C-H alifático em 2855 cm^{-1} e 2925 cm^{-1} , com um pequeno ombro em 2960 cm^{-1} ; o deslocamento da banda do estiramento axial de C=O de 1655 cm^{-1} para 1670 cm^{-1} ; o deslocamento da banda do estiramento axial de amida (C-N) de 1420 cm^{-1} para 1460 cm^{-1} ; e o aumento da intensidade da banda do estiramento angular de C-H em 1380 cm^{-1} , resultados que corroboram com os apresentados por QU & Colaboradores^[84] e HUO & Colaboradores^[88].

Já o espectro do derivado QTM2 apresenta muitas semelhanças com o espectro do derivado QTMO, com algumas alterações em intensidades e deslocamentos, além de um pequeno aumento da intensidade da banda referente ao estiramento angular de amina (N-H) de 1590 cm^{-1} , resultados que não foram comparados com a literatura, pela ausência de estudos semelhantes utilizando este derivado.

Todos esses resultados apresentados pelos espectros de infravermelho obtidos são indicativos que confirmam que as reações de conjugação para a produção dos derivados de quitosana ocorreram conforme esperado.

5.2.3 Determinação do grau de substituição dos derivados de quitosana

As técnicas de potenciometria e condutimetria são frequentemente utilizadas para a determinação do grau de substituição de um polímero após uma reação de modificação química. Assim como a quitosana, os derivados originados pelas reações de modificação são polieletrólitos fracos contendo grupos carboxila e amina distribuídos ao longo da sua estrutura polimérica, portanto, as técnicas de potenciometria e condutimetria podem ser utilizadas para avaliar o comportamento desses derivados de quitosana em solução em função do pH e da condutividade do meio.

O grau de substituição para os derivados de quitosana, calculados pelo método da segunda derivada e da Equação 27, estão dispostos na Tabela 5. Como podemos observar nas Figura 31 e Figura 32, os pontos de inflexão destacados estão relacionados à titulação dos grupos protonados carboxila e amina, respectivamente.

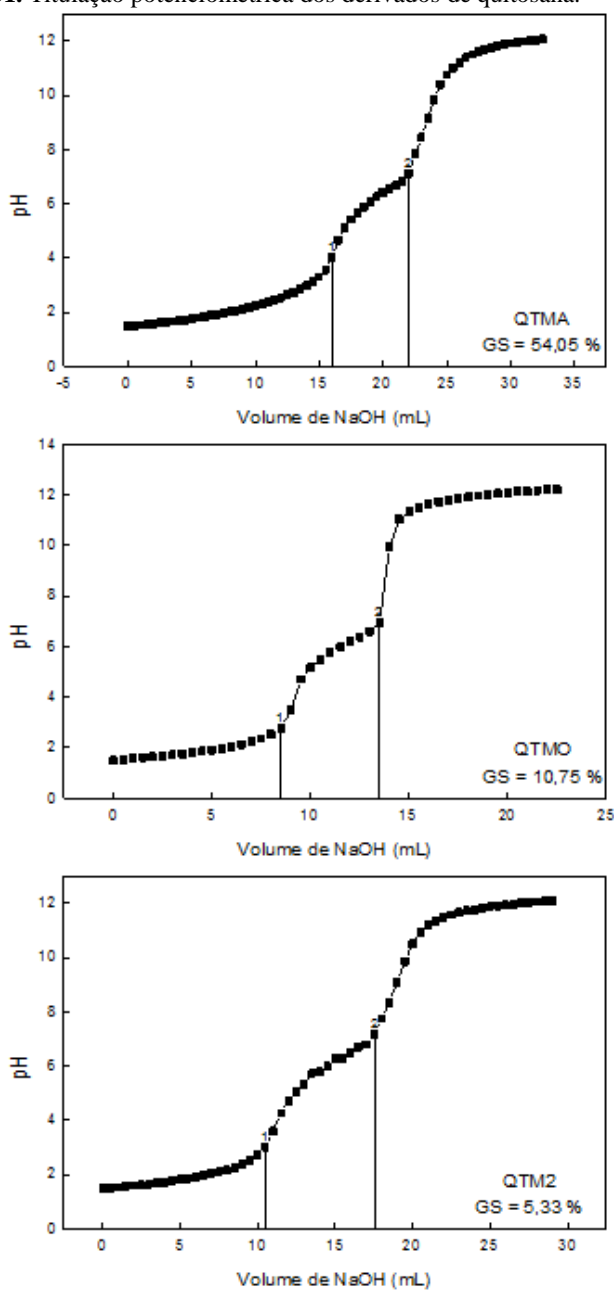
Figura 31. Titulação potenciométrica dos derivados de quitosana.

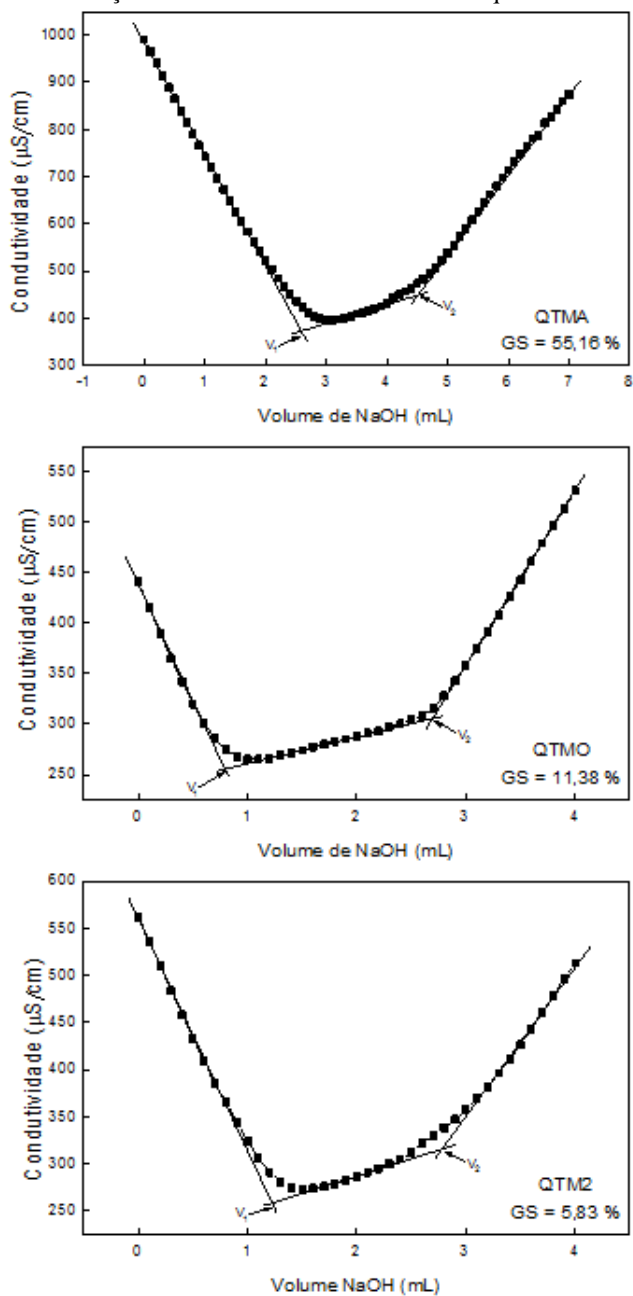
Figura 32. Titulação condutimétrica dos derivados de quitosana.

Tabela 5. Valores de grau de substituição obtidos pelas técnicas de titulação potenciométrica e condutimétrica dos derivados de quitosana.

Derivado (Grupo pesquisado)	Potenciometria (%)	Condutimetria (%)
QTMA (Carboximetila)	54,05	55,16
QTMO (Octila)	10,75	11,38
QTM2 (Octila)	5,33	5,83

Como podemos observar pela Tabela 5, por se tratarem de técnicas bastante parecidas, os resultados obtidos não apresentaram diferenças claramente significativas.

5.3 NANOPARTÍCULAS: REVESTIMENTO E CARACTERIZAÇÃO

5.3.1 Revestimento das nanopartículas com quitosana e derivados de quitosana

O processo de decoração das nanopartículas de PS-*b*-PAA com quitosana e seus derivados ocorreu pela simples mistura da suspensão de nanopartículas com soluções de quitosana e seus derivados em diferentes concentrações, conforme detalhado na seção 4.2.4.

A decoração das nanopartículas de PS-*b*-PAA é regida basicamente por interações eletrostáticas entre a sua superfície negativamente carregada, obtida pela ionização do bloco PAA em água, e polieletrólitos de carga oposta. Essas interações provocam alterações dinâmicas que são perceptíveis através das medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS), medidas de potencial zeta e de microscopia eletrônica de transmissão (TEM).

Por isso, serão reportados os resultados obtidos por DLS, potencial zeta e TEM, analisando comparativamente as amostras antes e após o processo de decoração com quitosana e os três derivados de quitosana produzidos.

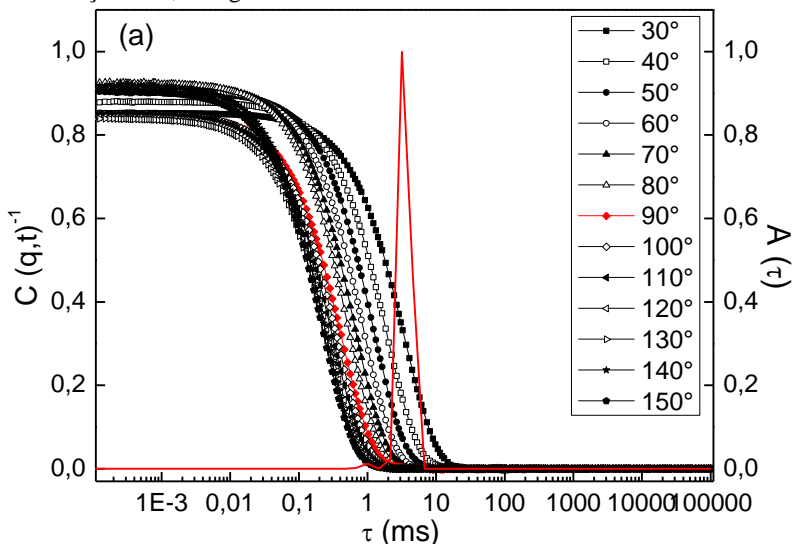
5.3.2 Caracterização por Espalhamento de Luz Dinâmico

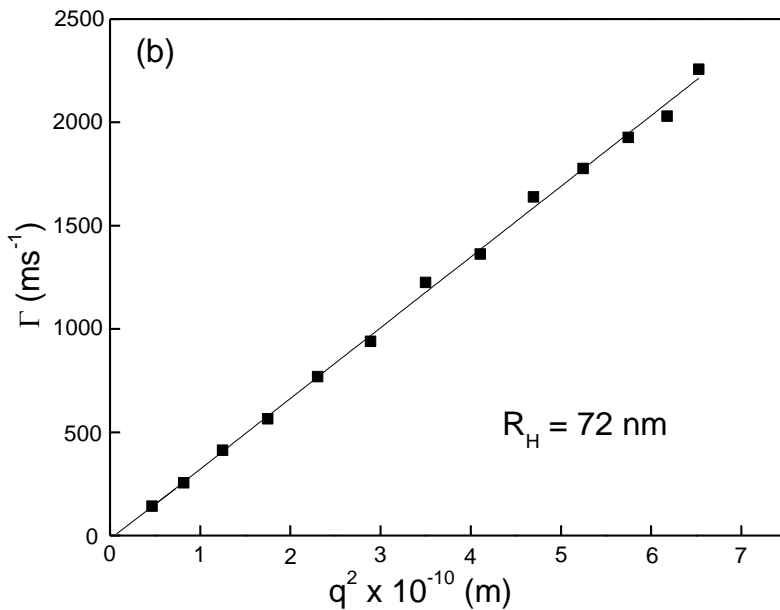
A técnica de DLS é uma excelente ferramenta para estudar polímeros e nanoestruturas em solução, pois não perturba o equilíbrio do

sistema e é muito sensível às mudanças estruturais. Neste trabalho o DLS foi utilizado para determinar o tamanho das nanopartículas de PS-*b*-PAA, através do R_H , e estudar os efeitos da decoração das nanopartículas a partir da adsorção de diferentes concentrações de quitosana e outros três derivados de quitosana.

A Figura 33 mostra a função de autocorrelação $g^2(q,\tau)$ medida para diferentes ângulos de espalhamento e a distribuição dos tempos de relaxação medido no ângulo de 90° (a) e a respectiva dependência de q^2 em função da frequência de relaxação (Γ), utilizando o método de CONTIN (b), para uma suspensão de nanopartículas de PS-*b*-PAA na concentração de 0,25 mg/mL e pH 5. Para todos os ângulos analisados do sistema de nanopartículas de PS-*b*-PAA observa-se uma distribuição dos tempos de relaxação bastante estreita e um índice de polidispersão (PDI) a 90° de 0,106, indicando uma estreita faixa de distribuição de tamanho. Com a distribuição dos tempos de relaxação nos diversos ângulos é possível ainda calcular o raio hidrodinâmico da nanopartícula de PS-*b*-PAA, utilizando a equação de Stokes-Einstein, que como mostra a Figura 34.b, foi de 72 nm.

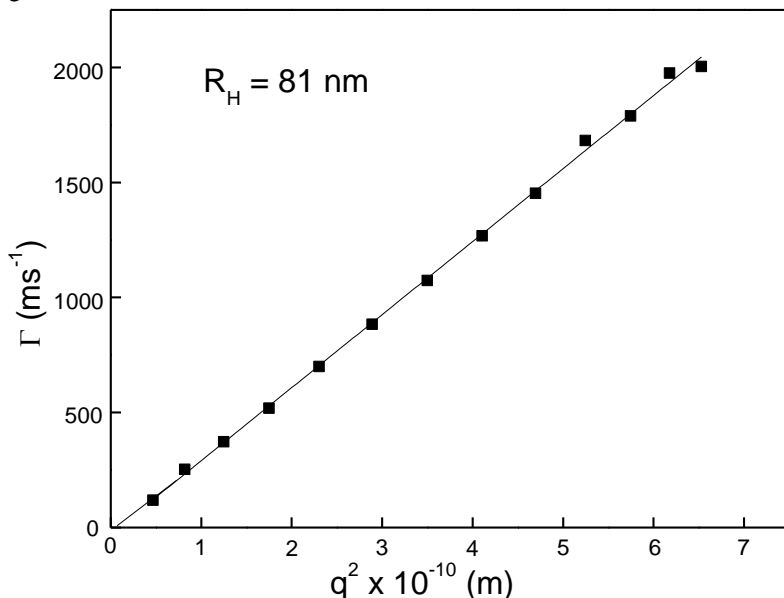
Figura 33. Função de autocorrelação $g^2(q,\tau)$ em ângulos de espalhamento de 30° a 150° (a) e a respectiva dependência de q^2 em função da frequência de relaxação (Γ) (b) para uma suspensão de nanopartículas de PS-*b*-PAA na concentração de 0,25 mg/mL.





O sistema desenvolvido por PS-*b*-PAA tem a característica de variar os valores de raio hidrodinâmico em função da concentração. A medida que o conteúdo de água aumenta, aumenta o estiramento do bloco hidrofílico, conduzindo a um aumento nas dimensões e favorecendo possíveis transições morfológicas^[29]. Como observado na Figura 34, uma diminuição na concentração de PS-*b*-PAA, cerca de cinco vezes menor que a concentração utilizada na Figura 33.b, proporciona um aumento do conteúdo de água e, conseqüentemente, um aumento no valor do R_H de aproximadamente 10 nm.

Figura 34. Dependência de q^2 em função da frequência de relaxação (Γ) para uma suspensão de nanopartículas de PS-*b*-PAA na concentração de 0,05 mg/mL.



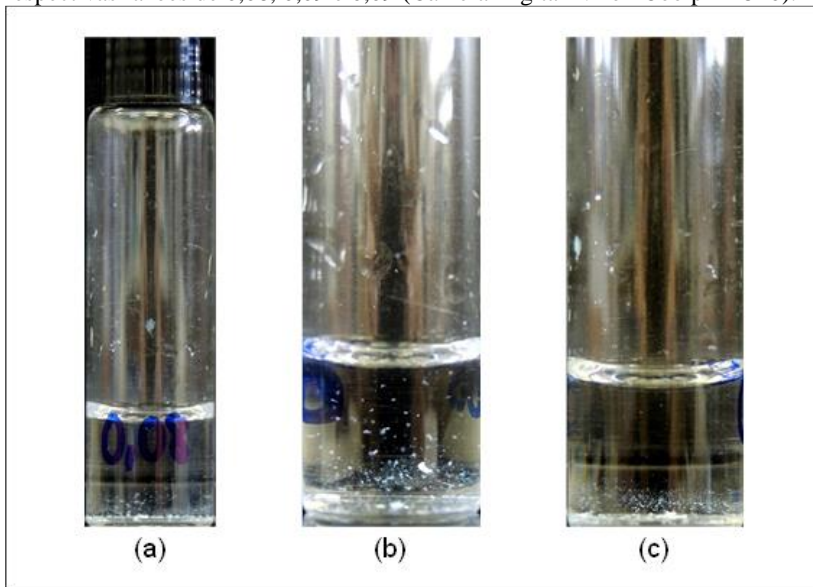
A morfologia das nanopartículas pode ser estimada por medidas de espalhamento de luz, através da relação entre o R_H com o R_g , conhecido como parâmetro (ρ). Entretanto, para o sistema de PS-*b*-PAA os valores de ρ não podem ser estimados justamente por estarem fora da região de Guinier ($qR_g < 1$).

As forças eletrostáticas de atração e repulsão provenientes do revestimento das nanopartículas de PS-*b*-PAA com polieletrólitos como a quitosana e derivados de quitosana resultam, a baixas concentrações do polieletrólito (QT-x), em valores de R_H próximos aos obtidos para as nanopartículas não decoradas. A medida que a concentração do polieletrólito aumenta surgem agregados maiores, da ordem de micrometros (visíveis a olho nu), presentes numa faixa de concentração, até um valor máximo, próximo ao ponto de neutralização, que pode ser melhor observado pelo método de potencial zeta, o qual será discutido na seção seguinte.

A formação dos agregados possivelmente ocorre porque em determinadas concentrações não existe uma quantidade suficientemente considerável de QT-x para decorar toda a superfície das nanopartículas,

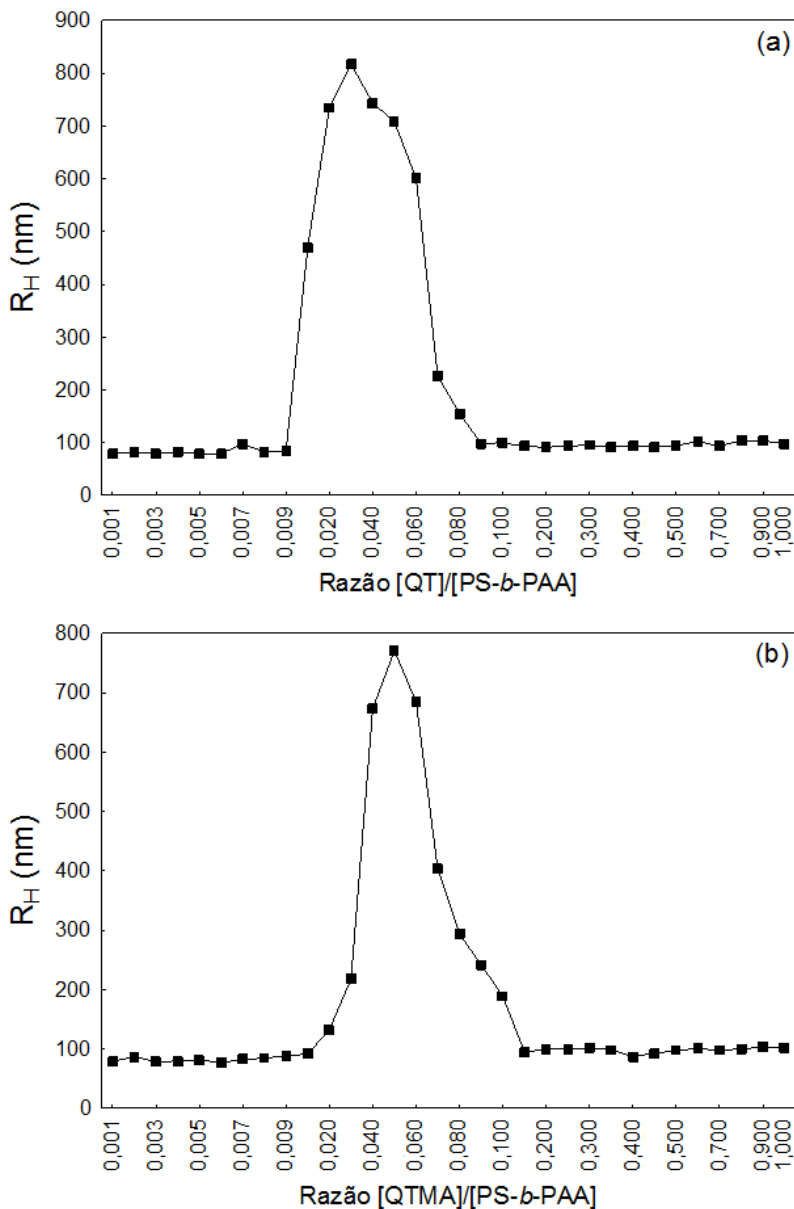
fazendo com que as moléculas de QT-x próximas, mesmo já adsorvidas em outras nanopartículas, sejam atraídas pela carga negativa das mesmas, formando os agregados. A Figura 35 apresenta os agregados visivelmente aderidos à parede de vidro dos frascos.

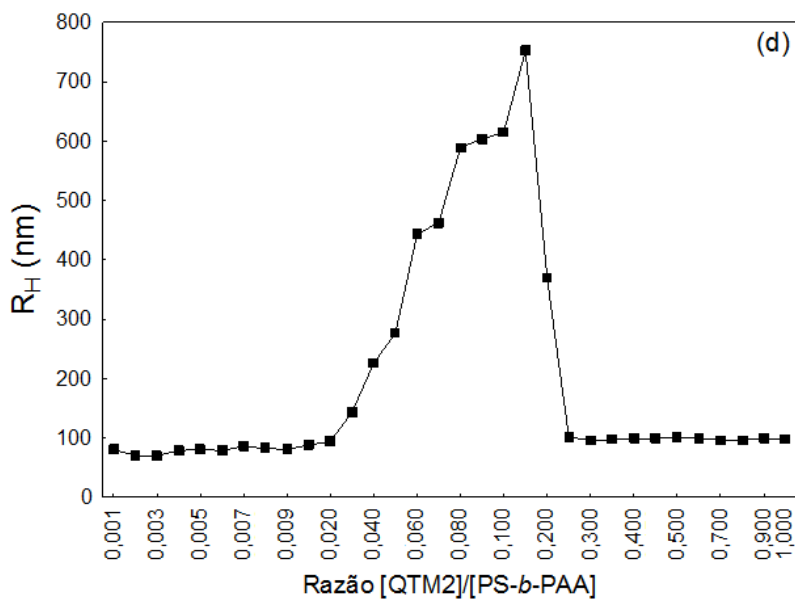
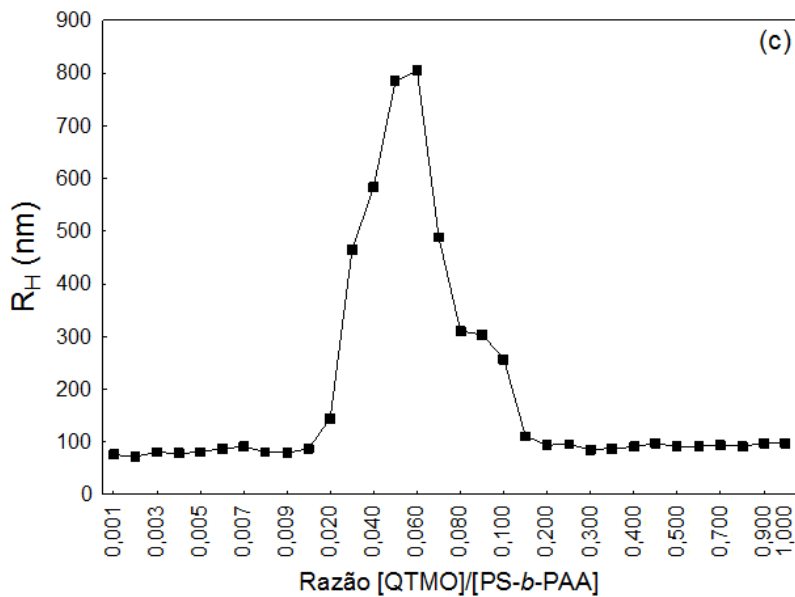
Figura 35. Frascos contendo misturas de nanopartículas e derivados de quitosana em concentrações em que existe a formação de agregados visivelmente aderidos ao vidro, onde QTMA (a), QTMO (b) e QTM2 (c) nas respectivas razões de 0,08, 0,09 e 0,09 (Câmera Digital Nikon Coolpix P510).



Para possibilitar a análise por DLS dessas concentrações contendo agregados foi preciso realizar a filtração com filtros de seringa de $0,45\ \mu\text{m}$. A Figura 36 mostra a variação do R_H em função da razão da concentração de quitosana (QT) ou derivados (QT-x) adicionados pela concentração de nanopartículas de PS-*b*-PAA ($[\text{QT-x}]/[\text{PS-}b\text{-PAA}]$), sendo que esta última permaneceu em concentração constante de $0,05\ \text{mg/mL}$.

Figura 36. Variação do raio hidrodinâmico (R_H) em função da razão da concentração de QT (a), QTMA (b), QTMO (c), QTM2 (d) pela concentração de nanopartículas de PS-*b*-PAA.





Como pode ser observado, a cinética de agregação continua, mesmo após a filtração, eliminando somente os macro-agregados. A Figura 36 mostra que existe uma ampla variação do R_H até um valor máximo, seguido do retorno para um valor constante, cerca de 20 nm maior que o inicial. Esse perfil ocorre para a decoração com quitosana e igualmente para a decoração com os demais derivados de quitosana.

A massa molar exibe uma grande influência na adsorção de polímeros em interfaces, o aumento da massa molar aumenta a capacidade de adsorção, como evidenciado por BOOMGAARD & Colaboradores^[89]; CHIBOWSKI^[90]; CHAMOVSKA & Colaboradores^[91]; O'SHEA & Colaboradores^[92] e PORTO^[32]. Este trabalho demonstra que a quitosana e os derivados de quitosana estudados possuem diferenças significativas nos perfis de adsorção nas nanopartículas de PS-*b*-PAA, que são mais bem detalhados na Tabela 6, a qual apresenta as razões [QT-x]/[PS-*b*-PAA] com as respectivas concentrações de QT-x e o potencial zeta em que se inicia e finda-se a formação dos agregados, além do R_H médio inicial, máximo e final para cada sistema, lembrando que a concentração de nanopartículas de PS-*b*-PAA permaneceu constante ([PS-*b*-PAA] = 0,05 mg/mL).

Tabela 6. Razão de [QT-x]/[PS-*b*-PAA], as respectivas concentrações de QT-x e de potencial zeta em que se inicia e finda-se a formação dos agregados e o R_H médio inicial, máximo e final para cada sistema.

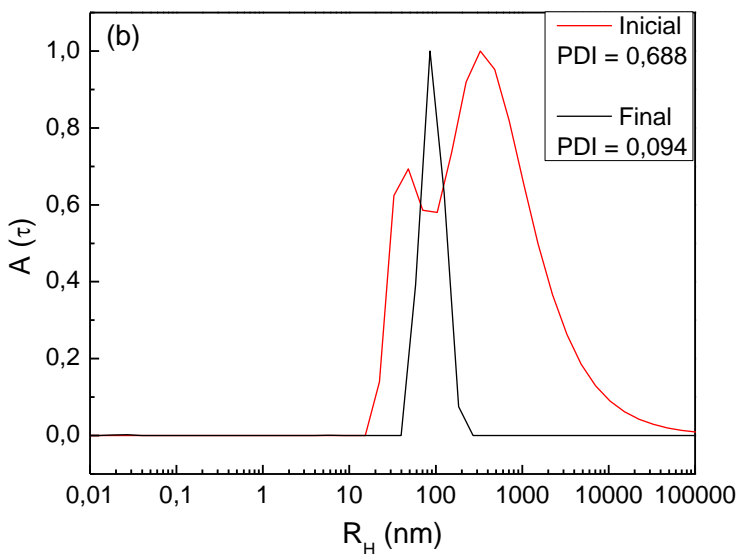
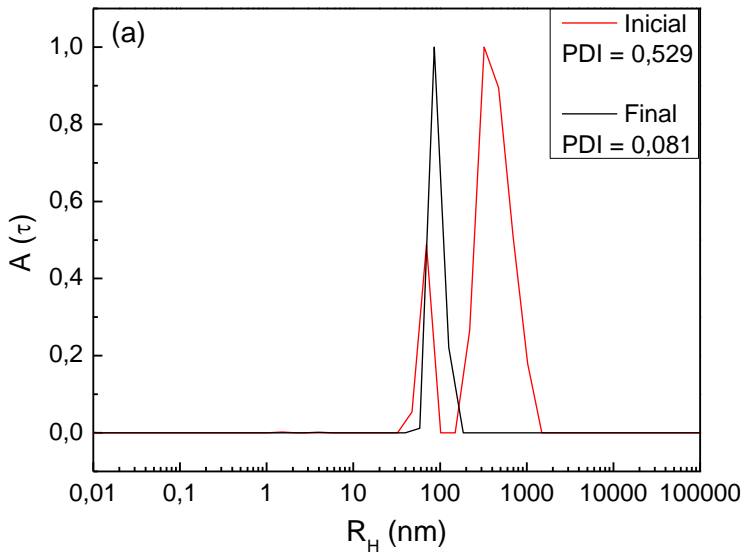
	Razão [QT-x]/ [PS- <i>b</i> -PAA]		[QT-x] (x 10 ⁻³ mg/mL)		Potencial Zeta (mV)		R _H médio (nm)		
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Máx.	Final
QT	0,01	0,09	0,5	4,5	-18,9	16,9	78	817	102
QTMA	0,02	0,15	1,0	7,5	-21,1	14,7	79	771	100
QTMO	0,02	0,15	1,0	7,5	-17,4	19,9	75	805	97
QTM2	0,03	0,25	1,5	12,5	-17,1	19,4	80	752	98

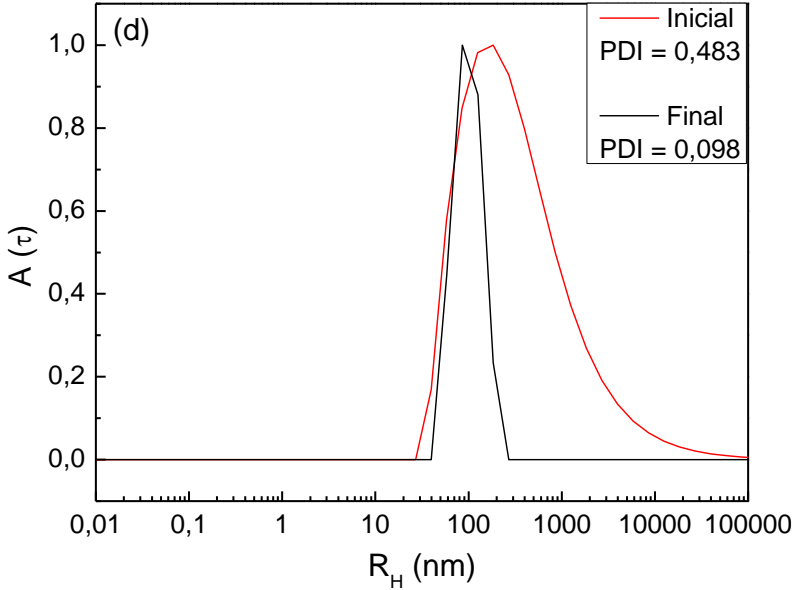
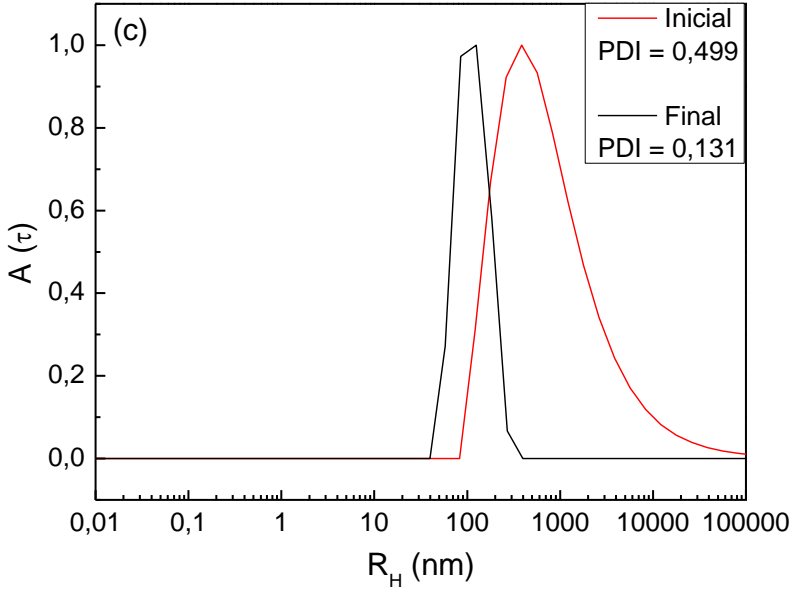
Como podemos observar na Tabela 6, a quitosana tem uma interação maior com as vesículas de PS-*b*-PAA, visto que é necessária uma concentração menor para que a formação de agregados se inicie. Isso possivelmente ocorre porque a quitosana possui um número maior de grupos ionizáveis disponíveis, diferentemente dos demais derivados de quitosana, onde esses grupos foram modificados com outros grupos, podendo apresentar ambas as cargas, tanto positivas quanto negativas, a exemplo do derivado N,O-carboximetilquitosana (QTMA).

A Figura 37 apresenta a distribuição de tamanhos (R_H nm) nas primeiras e últimas razões de concentração de [QT-x]/[PS-*b*-PAA], onde

inicia a formação de agregados (linha vermelha) e cessa a formação de agregados (linha preta) e seus respectivos índices de polidispersão.

Figura 37. Distribuições de tamanho (R_H nm) medido no ângulo de 90° para as concentrações inicial e final da formação dos agregados e seus respectivos índices de polidispersão (PDI) para QT (a), QTMA (b), QTMO (c) e QTM2 (d).





A partir do início da formação dos agregados o R_H perde a sua linearidade e o PDI aumenta consideravelmente, isso mostra que existe mais de um tamanho de nanopartículas em solução e, como podemos

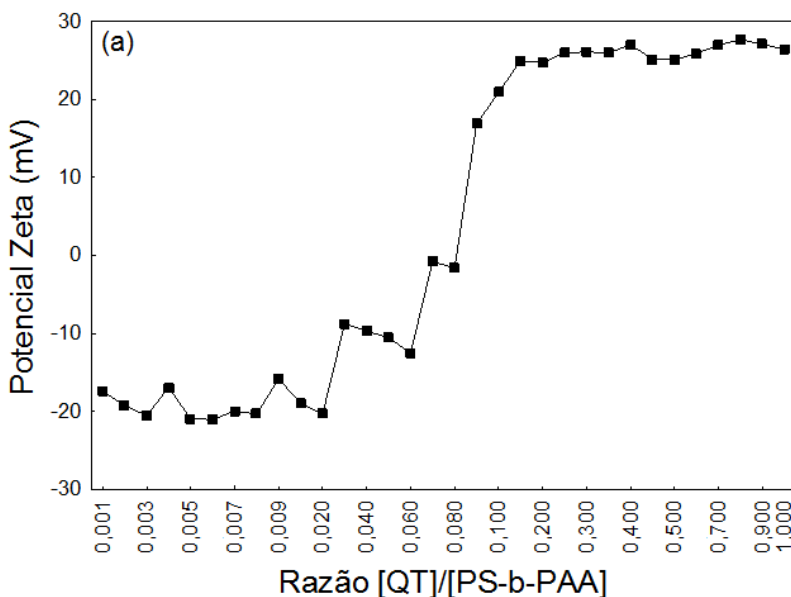
observar, após atingir o máximo de adsorção o R_H se estabiliza, volta a ser linear, também diminuindo o PDI.

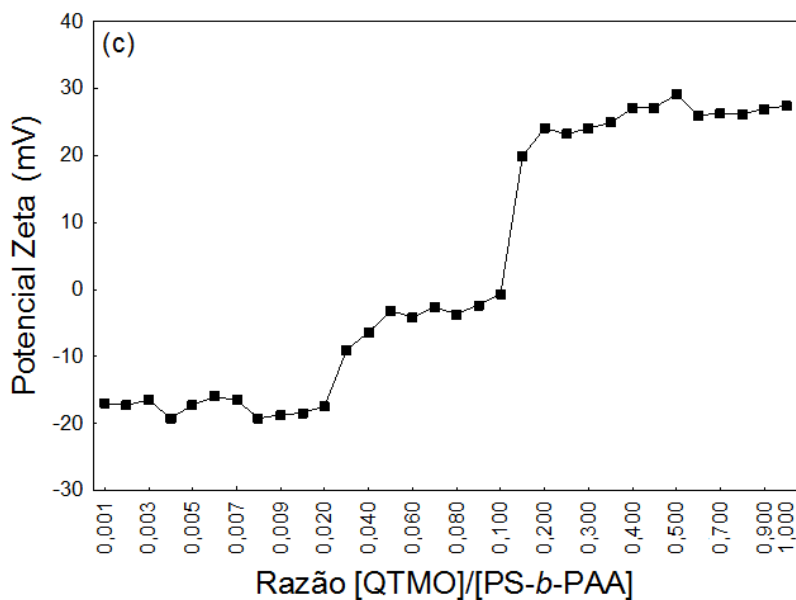
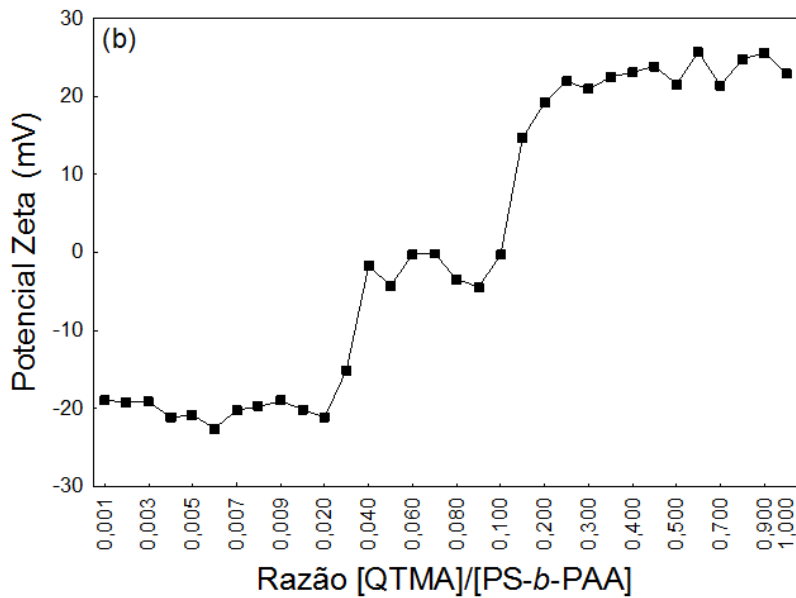
5.3.3 Caracterização por Potencial Zeta

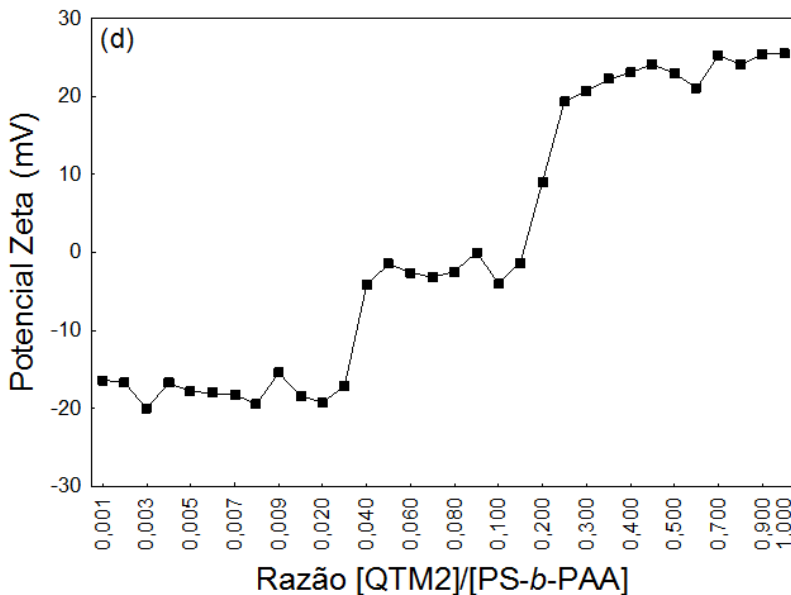
O potencial zeta é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento, sob a influência do movimento browniano este plano se movimenta como parte da partícula. O potencial zeta é função da carga superficial da partícula ou de qualquer camada adsorvida na sua interface e da natureza e composição do dispersante. Este potencial reflete a carga efetiva da partícula, correlaciona-se com a repulsão eletrostática e a estabilidade da suspensão^[93].

As nanopartículas de PS-*b*-PAA não decoradas apresentam um potencial zeta negativo de $-37,5 \pm 3,2$ mV devido à dissociação das porções de ácido carboxílico do bloco hidrofílico (PAA), contudo, como mostra a Figura 38, para os sistemas decorados inicialmente os valores de potencial zeta também são negativos ($-21,4 \pm 2,9$ mV) e tornam-se positivos a medida que a concentração de polieletrólitos aumenta.

Figura 38. Variação do potencial zeta (ζ) em função da razão da concentração de QT (a), QTMA (b), QTMO (c), QTM2 (d) pela concentração de nanopartículas de PS-*b*-PAA.







Graficamente, existem três diferentes regiões de transição, observados para todos os quatro sistemas utilizados para decoração. Próximo ao potencial zero existe uma região de transição onde ocorre a formação de agregados nos sistemas $[QT-x]/[PS-b-PAA]$, originados pelo processo de neutralização das cargas negativas do bloco hidrofílico (bloco de PAA), pela adição contínua de polieletrólitos, até a inversão do potencial zeta para um valor positivo médio de $26,7 \pm 4,1$ mV, formando uma espécie de platô que sugere um limite máximo de adsorção e, conseqüentemente, uma diminuição do tamanho dos agregados, devido a estabilização do sistema.

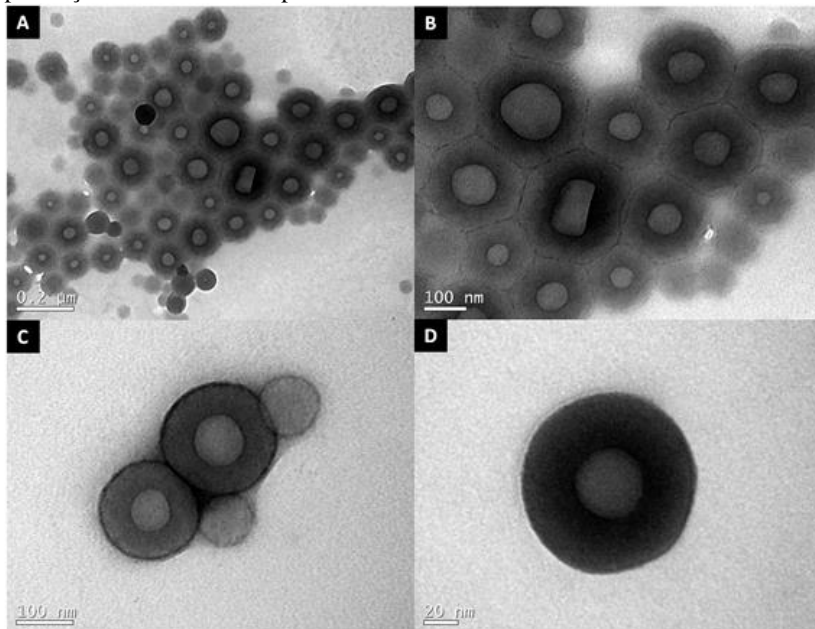
5.3.4 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão

As suspensões de nanopartículas preparadas a partir do copolímero em bloco $PS-b-PAA$, foram observadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e revelaram morfologias vesiculares bem definidas e dimensões inferiores a 200 nm, resultados que corroboram com os obtidos por DLS.

Este copolímero possui um ótimo contraste por TEM, sendo possível destacar com clareza a morfologia das nanoestruturas obtidas, isso ocorre porque o bloco PS possui uma densidade eletrônica maior do

que o bloco PAA, fazendo com que o bloco hidrofóbico seja observado na região mais escura das micrografias, já o bloco hidrofílico frequentemente não é visível^[24], como pode ser observado na Figura 39.

Figura 39. Micrografias em menores e maiores magnificações das nanopartículas de PS-*b*-PAA, onde (A) e (B) são micrografias apenas das vesículas, (C) as vesículas com um problema de contraste e (D) uma vesícula na presença de minoxidil encapsulado.



Nota-se que na Figura 39.c, obteve-se um problema de contraste, entretanto é possível observar uma morfologia vesicular bem definida. Já na Figura 39.d, a presença do fármaco minoxidil encapsulado não gerou mudanças claramente visíveis na micrografia, impossibilitando diferenciá-la das vesículas sem fármaco.

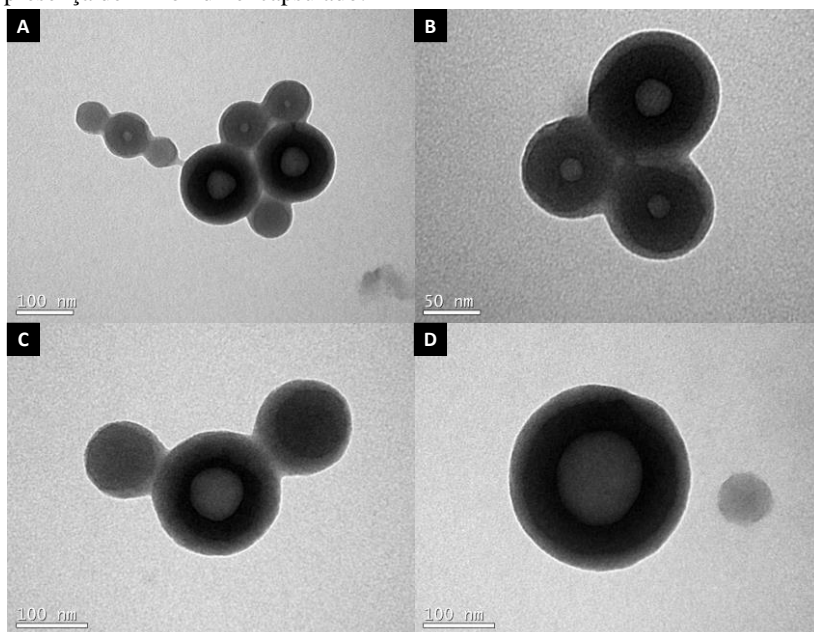
Além da morfologia e do diâmetro das vesículas, as imagens de TEM podem indicar a espessura da camada hidrofóbica, a qual foram medidas a partir das micrografias com o auxílio do software GIMP 2.8 (GNU Image Manipulation Program), utilizando uma média aritmética de aproximadamente 50 determinações inter e intra-partículas. Diferentemente do observado por DLS, as vesículas apresentaram uma grande faixa de distribuição de tamanho por TEM, as diferenças

calculadas foram de $142,3 \pm 36,8$ nm de diâmetro e espessura do bloco hidrofóbico relativamente constante de $71,3 \pm 7,9$ nm de espessura.

Essas diferenças de tamanho são explicadas porque por DLS as amostras são analisadas em solução, medindo-se o diâmetro hidrodinâmico das partículas, contudo por TEM as amostras precisam passar por um processo de secagem (desidratação), esse processo causa uma deformação na estrutura da partícula, além de uma diminuição do tamanho. Entretanto, como essa desidratação não é homogênea, geram partículas com um alto grau de polidispersão.

A adsorção dos polieletrólitos sobre a superfície das vesículas de PS-*b*-PAA pode ser evidenciada por imagens de TEM. A Figura 40 mostra que existem diferenças a nível superficial, relativo a adsorção da quitosana e dos derivados de quitosana à superfície das nanopartículas.

Figura 40. Micrografias em alta magnificação das nanopartículas de PS-*b*-PAA decoradas com (A) quitosana, (B) QTMO, (C) QTM2 e (D) QTMA, todos na presença de minoxidil encapsulado.



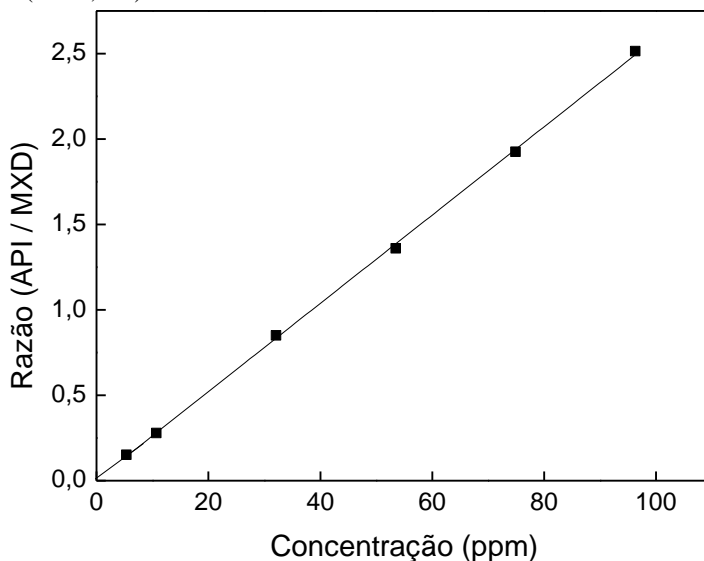
Representada por uma camada externa mais clara, como pode ser observada na Figura 40, essa adsorção não ocorre de forma uniforme, confirmada pela espessura e distribuição bastante variável da camada

adsorvida ($17,0 \pm 7,5$ nm de espessura). E diferentemente das medidas de DLS e potencial zeta, as imagens de TEM não apresentam diferenças morfológicas claramente visíveis entre a adsorção da quitosana ou dos demais derivados de quitosana.

5.4 MINOXIDIL: ENCAPSULAÇÃO

O método desenvolvido para quantificação do minoxidil em suspensões de nanopartículas baseou-se no método de PATTERSON & Colaboradores^[94] com adaptações, como detalhado na seção 4.2.7, para que o eletrólito apresentasse as mesmas características. Para a determinação quantitativa das amostras e verificação da validade do método, foi primeiramente construída uma curva de calibração. Para tanto, foi utilizado como solução padrão interno imidazol (50 ppm = 50 $\mu\text{g/mL}$), que foi mantido constante em todos os pontos da curva e concentrações de amostra de minoxidil na faixa entre 5,0 a 90 ppm. Cada ponto foi preparado em duplicata e analisado em triplicata. Os resultados mostraram-se lineares, conforme mostra a Figura 41 e apresentando um coeficiente de correlação (R) de 0,999.

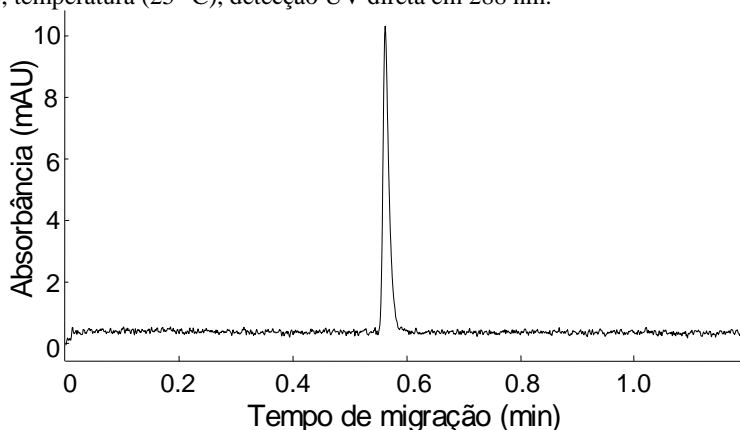
Figura 41. Curva de calibração para o minoxidil realizado em eletroforese capilar (R = 0,999).



Os valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram de 0,08 e 0,24 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, determinados a partir do ruído, indicando que o método desenvolvido por eletroforese capilar é suficientemente sensível para a quantificação do fármaco minoxidil.

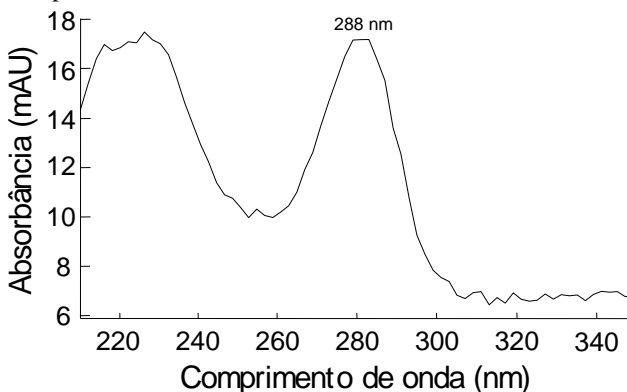
O perfil eletroforético do minoxidil é apresentado na Figura 42.

Figura 42. Eletroferograma do minoxidil na concentração de 50 ppm. Condições: eletrólito composto por 20 mmol/L de glicina e 20 mmol/L de ácido málico (pH 3,0), injeção hidrodinâmica (50 mbar, 5 s), tensão aplicada (+ 30 kV), temperatura (25 °C), detecção UV direta em 288 nm.



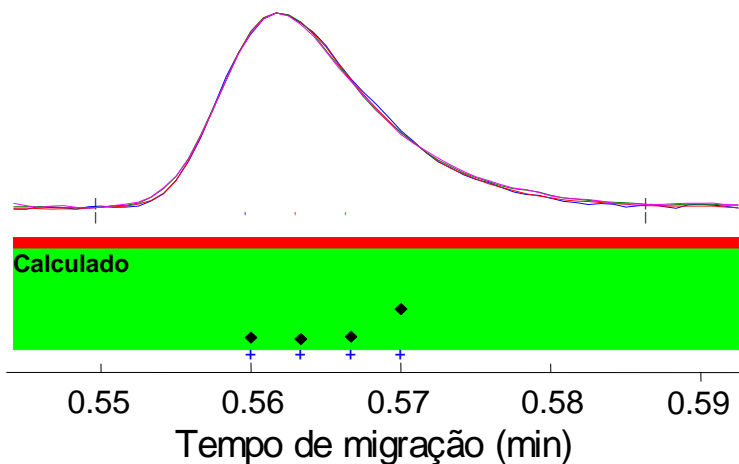
A Figura 43, por sua vez, traz o espectro de ultravioleta (UV) do minoxidil com a banda de absorção característica em 288 nm.

Figura 43. Espectro de ultravioleta do minoxidil.



A eletroforese capilar é uma técnica valiosa na separação e quantificação de fármacos. O seu software possibilita a elaboração de um gráfico referente à pureza da banda do fármaco no UV, realizando uma média geral das determinações, como ilustrado na Figura 44. Os pontos pretos do gráfico estão todos dentro da região verde, representando que a banda de absorção do minoxidil no UV é puro.

Figura 44. Pureza da banda de absorção no UV do fármaco minoxidil em eletroforese capilar.



Os valores de teor e eficiência de encapsulação para as amostras testadas são apresentados na Tabela 7.

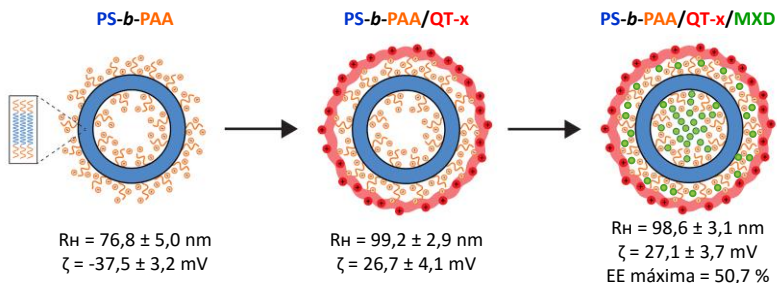
Tabela 7. Teor e eficiência de encapsulação (EE) para cada concentração de minoxidil inicialmente utilizada.

Concentração de MXD ($\mu\text{g/mL}$)	Teor (DP) ($\mu\text{g/mL}$)	EE (%)
40	17,11 ($\pm 0,38$)	42,5
60	30,45 ($\pm 0,71$)	50,7
80	30,21 ($\pm 0,08$)	37,8
100	37,94 ($\pm 0,40$)	37,9
120	36,47 ($\pm 1,10$)	30,4
150	42,32 ($\pm 2,89$)	28,2
200	44,48 ($\pm 0,72$)	22,2

Como podemos observar, a EE variou entre 22,2 % a 50,7 %. O minoxidil possui uma boa solubilidade em água e como estes sistemas poliméricos são desenvolvidos em meio aquoso, o minoxidil pode se encontrar tanto no interior da vesícula (encapsulado) quanto no meio externo (revestimento), interagindo com ambas as cargas superficiais tanto do copolímero quanto da QT-x. Ou ainda permanecer em solução, fazendo com que uma EE máxima de 50,7 % seja considerado um ótimo resultado.

A Figura 45 mostra um resumo dos parâmetros de R_H e potencial zeta para as vesículas de PS-*b*-PAA e as vesículas de PS-*b*-PAA decoradas. Para as vesículas contendo o minoxidil encapsulado, os valores de R_H e potencial zeta variaram muito pouco, quando comparado ao sistema decorado, estando, portanto, dentro das incertezas experimentais.

Figura 45. Representação esquemática das vesículas de PS-*b*-PAA, as vesículas decoradas e as vesículas com minoxidil encapsulado e seus respectivos valores de R_H , potencial zeta (ζ) e eficiência de encapsulação (EE).



5.5 DIOXANO: REMANESCENTE

A presença de solventes orgânicos em formulações, sejam elas farmacêuticas ou cosméticas, podem comprometer o organismo humano. No caso de formulações tópicas, por exemplo, o solvente orgânico, dependendo de qual for, pode ser irritante ou causar danos maiores à pele.

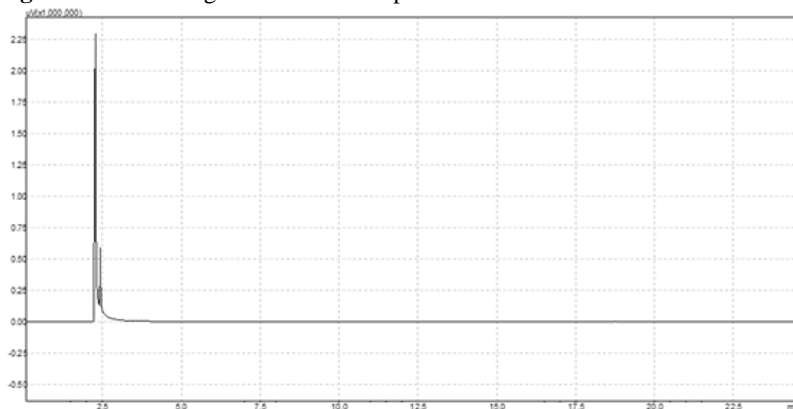
Normalmente, o desenvolvimento de sistemas poliméricos nanoparticulados emprega solventes orgânicos para o seu preparo, sendo a posterior eliminação destes solventes uma grande preocupação dos pesquisadores.

No sistema utilizado neste trabalho tem-se duas rotas de eliminação do resíduo de solvente orgânico (1,4-dioxano): a diálise e a

rotaevaporação. Sendo assim, testou-se essas duas rotas, conforme já detalhado na seção 4.2.8, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, para verificar a efetiva eliminação do resíduo de solvente orgânico e quantificar, quando existente, o remanescente de dioxano das suspensões de nanopartículas.

Para tanto, foi realizada uma análise do solvente puro que foi utilizado como padrão (Figura 46).

Figura 46. Cromatograma do dioxano puro.



As Figuras 47 e 48 mostram, respectivamente, a análise da amostra de suspensão de nanopartículas dialisada e a análise da amostra rotaevaporada.

Figura 47. Cromatograma da amostra de suspensão de nanopartículas dialisada.

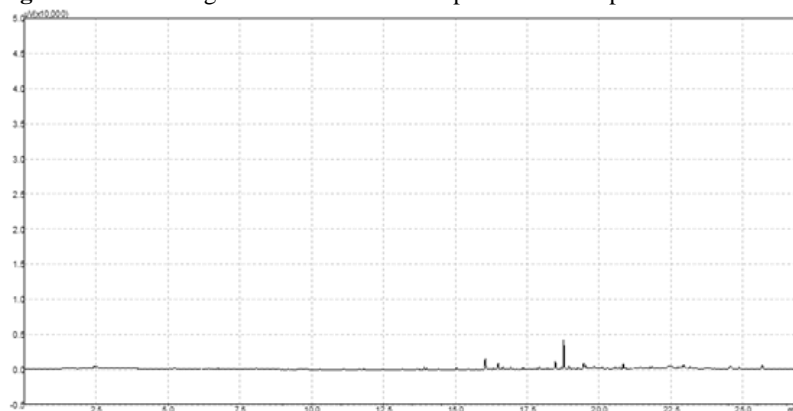
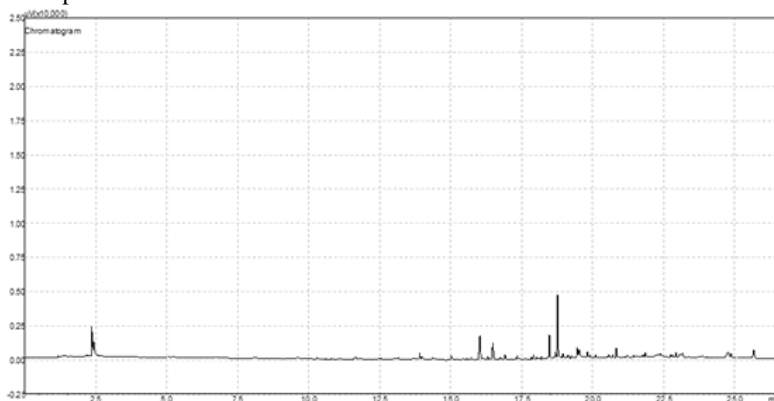


Figura 48. Cromatograma da amostra de suspensão de nanopartículas rotaevaporada.



Nota-se que existe a total eliminação do resíduo de solvente orgânico pelo processo de diálise (Figura 47), resultando na ausência do pico de dioxano na região característica (aproximadamente em 2,5 min). Já pelo processo de rotaevaporação (Figura 48), não houve a completa eliminação do solvente orgânico, permanecendo uma pequena porcentagem remanescente de resíduo de dioxano, que segundo cálculos foi inferior a 0,01% e que possivelmente não compromete futuras formulações utilizando estes sistemas, nem, tão pouco, o usuário final.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

De acordo com os resultados apresentados, os processos para obtenção dos derivados de quitosana foram efetivos, gerando os derivados esperados, como evidenciado pelas técnicas de espectroscopia de infravermelho, titulações potenciométricas e condutimétricas.

O método de co-solvente seguido de diálise foi um método validado para a produção de vesículas de PS-*b*-PAA bem definidas morfológicamente, com dimensões em torno de 150 nm e baixo índice de polidispersão (inferiores a 0,15), comprovadas pelas técnicas de espalhamento de luz dinâmico e microscopia eletrônica de transmissão.

A presença de cargas negativas na superfície das nanopartículas de PS-*b*-PAA possibilitou o revestimento com outros polímeros de carga oposta, como, por exemplo, a quitosana e derivados de quitosana.

A decoração com quitosana apresentou diferenças claramente visíveis quando comparada com o sistema não decorado, como um pequeno aumento do R_H e a inversão do potencial zeta, inicialmente negativo e, a medida que se aumentou a concentração de quitosana e seus derivados, o potencial zeta tornou-se positivo.

Foram observadas sutis diferenças entre a decoração com os derivados produzidos e a quitosana, demonstradas principalmente pelas técnicas de DLS e potencial zeta.

O potencial zeta é um indicativo da estabilidade de dispersões coloidais e, neste trabalho, possibilitou estudar e melhorar essa propriedade nos sistemas desenvolvidos.

A técnica de eletroforese capilar permitiu o desenvolvimento de um método sensível para a determinação do teor e a eficiência de encapsulação do fármaco minoxidil nos sistemas desenvolvidos.

Como o sistema foi desenvolvido em meio aquoso e o fármaco minoxidil possui uma boa solubilidade em água, uma eficiência de encapsulação máxima de 50,7 % foi muito satisfatória.

O processo de diálise conseguiu eliminar totalmente o resíduo de solvente orgânico do sistema, diferentemente do processo de rotaevaporação, que permaneceu com um remanescente de solvente orgânico, contudo inferior a 0,01 %, o que não compromete possíveis formulações.

E por fim, espera-se ser possível aprofundar os estudos em alguns pontos que, devido aos prazos serem bastante reduzidos, não foram realizados, como, por exemplo: analisar o potencial zeta isoladamente de cada um dos derivados de quitosana produzidos; analisar através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) os derivados de quitosana, com

o intuito de calcular de forma mais precisa os graus de substituição; e, realizar os estudos de liberação, toxicidade e permeação cutânea dos sistemas desenvolvidos.

REFERÊNCIAS

- [1] SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, p. 20-31, 2007.
- [2] ZHANG, Y.; CHAN, H. F.; LEONG, K. W. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 104-120, 2013.
- [3] ALLEN, T. M.; CULLIS, P. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 36-48, 2013.
- [4] NANJWADE, B. K.; et al. Dendrimers: Emerging polymers for drug-delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, p. 185-186, 2009.
- [5] SINGH, A.; GARG, G. SHARMA, P. K. Nanospheres: a novel approach for targeted drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 5, n. 3, p. 84-88, 2010.
- [6] MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010.
- [7] SHINDE, N. G.; ALOORKAR, N. H.; KULKARNI, A. S. Recent Advances in Vesicular Drug Delivery System. **Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology**, v. 6, n. 2, p. 110-120, 2014.
- [8] GAUCHER, G.; et al. Polymeric micelles for oral drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, p. 147-158, 2010.
- [9] WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 1257-1272, 2004.

- [10] DJUPESLAND, G. Nasal drug delivery devices: characteristics and performance in a clinical perspective—a review. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 3, p. 42-62, 2013.
- [11] KOMPELLA, U. B.; KADAM, R. S.; LEE, V. H. L. Recent advances in ophthalmic drug delivery. **Therapeutic Delivery**, v. 1, n. 3, p. 435-456, 2010.
- [12] SINICO, C.; FADDA, A. M. Vesicular carriers for dermal drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 6, n. 8, p. 813-825, 2009.
- [13] PRAUSNITZ, M. R.; LANGER, R. Transdermal drug delivery. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1261-1268, 2008.
- [14] UCHECHI, O.; OGBONNA, J. D. N.; ATTAMA, A. A. Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery. In: SEZER, A. D. **Application of Nanotechnology in Drug Delivery**. Rijeka: InTech, 2014, p. 193-235.
- [15] MALMSTEN, M. Block copolymers in pharmaceuticals. In: ALEXANDRILIS, P.; LINDMAN, B. **Amphiphilic block copolymers: Self-Assembly and Applications**. Amsterdam: Elsevier, 2000, p. 319-346.
- [16] VALENTA, C.; AUNER, B. G. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 279-289, 2004.
- [17] LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda., 2001, 366p.
- [18] CANEVAROLO JR, S. V. **Ciência dos polímeros: um teste básico para tecnólogos e engenheiros**. 2. ed. São Paulo: Artliber Editora, 2006, 280p.
- [19] SUN, S. F. **Physical chemistry of macromolecules: Basic Principles and Issues**. 2. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2004, 549p.

- [20] KUMAR, N.; RAVIKUMAR, M. N. V.; DOMB, A. J. Biodegradable block copolymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 53, p. 23-44, 2001.
- [21] LINDMAN, B.; ALEXANDRILIS, P. Amphiphilic molecules: small and large. In: ALEXANDRILIS, P.; LINDMAN, B. **Amphiphilic block copolymers: Self-Assembly and Applications**. Amsterdam: Elsevier, 2000, p. 1-12.
- [22] RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, J.; et al. Toward 'smart' nano-objects by self-assembly of block copolymers in solution. **Progress in Polymer Science**, v. 30, p. 691-724, 2005.
- [23] DU, J.; O'REILLY, R. K. Advances and challenges in smart and functional polymer vesicles. **Soft Matter**, v. 5, p. 3544-3561, 2009.
- [24] MAI, Y.; EISENBERG, A. Self-assembly of block copolymers. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 5969-5985, 2012.
- [25] DISCHER, D. E.; EISENBERG, A. Polymer Vesicles. **Science**, v. 297, p. 967-973, 2002.
- [26] GIACOMELLI, C.; et al. Phosphorylcholine-Based pH-Responsive Diblock Copolymer Micelles as Drug Delivery Vehicles: Light Scattering, Electron Microscopy, and Fluorescence Experiments. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 817-828, 2006.
- [27] XIONG, D.; et al. Temperature-responsive multilayered micelles formed from the complexation of PNIPAM-*b*-P4VP block-copolymer and PS-*b*-PAA core-shell micelles. **Polymer**, v. 49, p. 2548-2552, 2008.
- [28] YANG, Q.; et al. Redox-responsive micelles self-assembled from dynamic covalent block copolymers for intracellular drug delivery. **Acta Biomaterialia**, v. 17, p. 193-200, 2015.
- [29] PEARSON, S.; et al. Light-responsive azobenzene-based glycopolymer micelles for targeted drug delivery to melanoma cells. **European Polymer Journal**, v. 69, p. 616-627, 2015.

[30] ZHANG, L.; EISENBERG, A. Multiple Morphologies of "Crew-Cut" Aggregates of Polystyrene-*b*-poly(acrylic acid) Block Copolymers. **Science**, v. 268, p. 1728-1731, 1995.

[31] YU, Y.; EISENBERG, A. Control of Morphology through Polymer-Solvent Interactions in Crew-Cut Aggregates of Amphiphilic Block Copolymers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 35, p. 8383-8384, 1997.

[32] YU, K.; EISENBERG, A. Bilayer Morphologies of Self-Assembled Crew-Cut Aggregates of Amphiphilic PS-*b*-PEO Diblock Copolymers in Solution. **Macromolecules**, v. 31, p. 3509-3518, 1998.

[33] PORTO, L. C. **Estudo de filmes finos e de nanopartículas obtidos pela auto-associação de copolímeros em bloco e sua interação com um oligo/polissacarídeo**. 2011. 171 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2011.

[34] BELLETTINI, I. C.; et al. PS-*b*-PAA nanovesicles coated by modified PEIs bearing hydrophobic and hydrophilic groups. **Journal of Molecular Liquids**, v. 210, p. 29-36, 2015.

[35] HOAGLAND, D. Polyelectrolytes. In: MATYJASZEWSKI, K. **Encyclopedia of Polymer Science and Technology**, 4. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2003, p. 439-504.

[36] KAJIWARA, K.; MIYAMOTO, T. Progress in Structural Characterization of Functional Polysaccharides. In: DUMITRIU, S. **Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility**, New York: Marcel Dekker, 1998, p. 1-40.

[37] YANG, J.; et al. Preparation and application of micro/nanoparticles based on natural polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 53-66, 2015.

[38] LE TIEN, C.; et al. *N*-acylated chitosan: hydrophobic matrices for controlled drug release. **Journal of Controlled Release**, v. 93, p. 1-13, 2003.

[39] LIU, Z.; et al. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1650-1662, 2008.

[40] SANTOS, J. E.; et al. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

[41] RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.

[42] EL-SHERBINY, I. M. Synthesis, characterization and metal uptake capacity of a new carboxymethyl chitosan derivative. **European Polymer Journal**, v. 45, p. 199-210, 2009.

[43] LUO, Y.; WANG, Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 353-367, 2014.

[44] THANOU, M.; JUNGINGER, H. E. Pharmaceutical Applications of Chitosan and Derivatives. In: DUMITRIU, S. **Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility**, New York: Marcel Dekker, 1998, p. 661-677.

[45] LARSSON, M.; et al. Biomedical applications and colloidal properties of amphiphilically modified chitosan hybrids. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1307-1328, 2013.

[46] MOURYA, V. K.; INAMDAR, N. N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. **Reactive & Functional Polymers**, v. 68, p. 1013-1051, 2008.

[47] KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

[48] KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. **Progress in Polymer Science**, v. 26, p. 1921-1971, 2001.

[49] ABREU, F. R.; CAMPANA-FILHO, S. P. Preparation and Characterization of Carboxymethylchitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 2, p. 79-83, 2005.

- [50] DING, P.; et al. Preparation and properties of modified chitosan as potential matrix materials for drug sustained-release beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 125-131, 2007.
- [51] MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C. Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences. **Advances in Polymer Science**, v. 186, p. 151-209, 2005.
- [52] LEMARCHAND, C.; GREF, R.; COUVREUR, P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 327-341, 2004.
- [53] CAMETTI, C. Polyion-induced aggregation of oppositely charged liposomes and charged colloidal particles: The many facets of complex formation in low-density colloidal systems. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 155, p. 63-73, 2008.
- [54] COAN, T.; et al. Chitosan-decorated polystyrene-*b*-poly(acrylic acid) polymersomes as novel carriers for topical delivery of finasteride. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 165-172, 2014.
- [55] BARBAULT-FOUCHER, S.; et al. Design of poly- ϵ -caprolactone nanospheres coated with bioadhesive hyaluronic acid for ocular delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 83, p. 365-375, 2002.
- [56] DU, H.; et al. The synthesis, self-assembling, and biocompatibility of a novel *O*-carboxymethyl chitosan cholate decorated with glycyrrhetic acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 753-761, 2014.
- [57] PRADHAN, R.; et al. Hyaluronic acid-decorated poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for combined delivery of docetaxel and tanespimycin. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 313-323, 2015.
- [58] VOOHEERS, J. J. Topical Minoxidil, Experimental and Clinical Results: Editor's Introduction. **Dermatologica**, v. 175, s. 2, p. 1-2, 1987.
- [59] HAN, J. H.; et al. Effect of minoxidil on proliferation and apoptosis in dermal papilla cells of human hair follicle. **Journal of Dermatological Science**, v. 34, p. 91-98, 2004.

- [60] MESSENGER, A. G.; RUNDEGREN, J. Minoxidil: mechanisms of action on hair growth. **British Journal of Dermatology**, v. 150, p. 186-194, 2004.
- [61] SHIM, J.; et al. Transdermal delivery of minoxidil with block copolymer nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 97, p. 477-484, 2004.
- [62] MURA, S.; et al. Penetration enhancer-containing vesicles (PEVs) as carriers for cutaneous delivery of minoxidil. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 380, p. 72-79, 2009.
- [63] SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005, 502p.
- [64] DAUTZENBERG, H.; et al. **Polyelectrolytes: formation, characterization, application**. München: Carl Hanser Verlag, 1994, 343p.
- [65] TERAOKA, I. **Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties**, New York: John Wiley & Sons, 2002, 332p.
- [66] MODOLON, S. M.; et al. Auto-associação do dodecilsulfato de sódio (SDS) com o polímero hidrofobicamente modificado etil(hidroxi)etil celulose (EHEC). **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2046-2050, 2009.
- [67] LIEBL, M., Blue Skies, Coffee Creamer, and Rayleigh Scattering. **The Physics Teacher**, v. 48, n. 5, p. 300-301, 2010.
- [68] SCHÄRTL, W. **Light scattering from polymer solutions and nanoparticle dispersions**. Berlin: Springer-Verlag, 2007, 191p.
- [69] ZIMM, B. H. The Dependence of the Scattering of Light on Angle and Concentration in Linear Polymer Solutions. **The Journal of Physical and Colloid Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 260-267, 1948.
- [70] ZIMM, B. H.; DANDLIKER, W. B. Theory of Light Scattering and Refractive Index of Solutions of Large Colloidal Particles. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 644-648, 1954.

- [71] SHAW, D. J. **Introduction to colloid and surface chemistry**. 4. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1992, 306p.
- [72] MALVERN INSTRUMENTS. **Zetasizer nano user manual**. Inglaterra: Malvern Instruments Ltd, 2007.
- [73] WILLIAMS, D. B. & CARTER, C. B. **Transmission Electron Microscopy**: a Textbook for Materials Science, New York: Plenum Press, 1996, 760p.
- [74] WATT, I. M. **The Principles and Practice of Electron Microscopy**. 2. ed, Cambridge: Cambridge University Press: Nova Iorque, 1997, 484p.
- [75] RUSKA, E. The emergence of the electron microscope: Connection between Realization and First Patent Application, Documents of an Invention. **Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research**, v. 95, p. 3-28, 1986.
- [76] TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1995.
- [77] TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.
- [78] WESTON, A. & BROWN, P.R. **HPLC and CE**: Principles and Practice. Academic Press, 1997, 280p.
- [79] ANASTOS, N.; BARNETT, N. W.; LEWIS, S. W. Capillary electrophoresis for forensic drug analysis: A review. **Talanta**, v. 67, p. 269-279, 2005.
- [80] CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a gás**. 2. ed. São Paulo: E. Blucher, 1985, 231p.
- [81] COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2006, 453p.
- [82] HÜBSCHMANN, H. J. **Handbook of GC/MS**: Fundamentals and Applications. 2. ed. Weinheim: WILEY-VCH, 2009, 719p.

- [83] LIU, T. Y.; et al. Synthesis and Characterization of Amphiphatic Carboxymethyl-hexanoyl Chitosan Hydrogel: Water-Retention Ability and Drug Encapsulation. **Langmuir**, v. 22, p. 9740-9745, 2006.
- [84] QU, D.; et al. In vitro evaluation on novel modified chitosan for targeted antitumor drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 545-554, 2013.
- [85] GE, H. C.; LUO, D. K. Preparation of carboxymethyl chitosan in aqueous solution under microwave irradiation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1351-1356, 2006.
- [86] BRUGNEROTTO, J.; et al. Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. **Polymer**, v. 42, p. 9921-9927, 2001.
- [87] KASAAI, M. R. Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 477-488, 2007.
- [88] HUO, M.; et al. Synthesis and characterization of low-toxic amphiphilic chitosan derivatives and their application as micelle carrier for antitumor drug. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 394, p. 162-173, 2010.
- [89] BOOMGAARD, T. V. D.; et al. The Influence of Temperature on the Adsorption and Adsorbed Layer Thickness of Various Molecular Weight Fractions of Poly(vinyl alcohol) on Polystyrene Latex Particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 66, n. 1, 1978.
- [90] CHIBOWSKI, S. Dependence of the Adsorption Behavior of Polyvinyl Alcohol at the Polystyrene Latex-Solution Interface on the Molecular Weight. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 134, n. 1, 1990.
- [91] CHAMOVSKA, D. B.; GRCHEV, T. P.; CVETKOVSKA, M. V. The Impact of Polyacrylamide Molecular Weight on Its Adsorption Behavior at the Gold/Acidic Solution Interface. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 30, p. 653-661, 2006.

[92] O'SHEA, J. P.; QIAO, G. G.; FRANKS, G. V. Solid-liquid separations with a temperature-responsive polymeric flocculant: Effect of temperature and molecular weight on polymer adsorption and deposition. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 348, p. 9-23, 2010.

[93] DELGADO, A. V.; et al. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 309, p. 194-224, 2007.

[94] PATTERSON, S. C.; RAMSTAD, T.; MILLS, K. A. Development and validation of a procedure for the determination of minoxidil in hair-regrowth formulations using two variants of capillary zone electrophoresis. **Il Farmaco**, v. 60, p. 547-554, 2005.