



HAL
open science

**Study of thin films and nanoparticles obtained by
self-assembly of block copolymers and their interactions
with an oligo / polysaccharide**

Ledilege Cucco Porto

► **To cite this version:**

Ledilege Cucco Porto. Study of thin films and nanoparticles obtained by self-assembly of block copolymers and their interactions with an oligo / polysaccharide. *Polymers*. Université de Grenoble; Universidade federal de Santa Catarina (Brésil), 2011. English. NNT : 2011GRENU011 . tel-00604207

HAL Id: tel-00604207

<https://theses.hal.science/tel-00604207>

Submitted on 28 Jun 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE en co-tutelle

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Sciences des Polymères**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

« Ledilege / CUCCO PORTO »

Thèse dirigée par « **Redouane/BORSALI** » et « **Valdir/SOLDI** »

préparée au sein du **Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales** et **Grupo de Estudos em Materiais Poliméricos**

dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant** et **Departamento de Pós-Graduação em Química/UFSC**

Etude de films minces et de nanoparticules obtenus par auto-assemblage de copolymères à blocs et leurs interactions avec un oligo / polysaccharide

Thèse soutenue publiquement le « **27/04/2011** », devant le jury composé de :

M. Christophe, CHASSENIEUX

Professeur/Université du Maine Le Mans-UMR (Rapporteur)

Mme. Adriana, POHLMANN

Professeur/Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS (Rapporteur)

M. Redouane, BORSALI

Directeur de Recherche CNRS/CERMAV (Directeur de thèse)

M. Valdir, SOLDI

Professeur/Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC (Directeur de thèse)

Mme. Véronique, COMA

Professeur/Université de Bordeaux 1-LCPO (Examineur)

M. Edvani, MUNIZ

Professeur/Universidade Estadual de Maringá-UEM (Examineur)





Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Pós-Graduação em
Química



Université Joseph Fourier
Ecole Doctorale Chimie et Science du Vivant
Centre de Recherches sur les
Macromolécules Végétales

**Estudo de filmes finos e de nanopartículas
obtidos pela auto-associação de copolímeros em
bloco e sua interação com um
oligo/polissacarídeo**

TESE DE DOUTORADO

Ledilege Cucco Porto

Florianópolis, Abril de 2011

Ledilege Cucco Porto

**Estudo de filmes finos e de nanopartículas
obtidos pela auto-associação de copolímeros em
bloco e sua interação com um
oligo/polissacarídeo**

Tese em regime de co-tutela submetida à
Universidade Federal de Santa Catarina e à
Universidade Joseph Fourier como parte dos
requisitos para a obtenção do grau de
Doutor em Química.

Área de Concentração: Físico-Química

Orientação: Prof. Dr. Valdir Soldi e Dr.
Redouane Borsali

Florianópolis, Abril de 2011

Dedico este trabalho às pessoas que mais amo: aos meus pais, meu irmão e minhas avós, pelo carinho e amor dedicado todos estes anos.

Ao Renan, pela paciência, apoio e principalmente pelo seu amor

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre presente.

Ao orientador Prof. Dr. Valdir Soldi, pela oportunidade, confiança, orientação e paciência, proporcionando-me liberdade e independência na realização deste trabalho.

Ao orientador Dr. Redouane Borsali que me recebeu em Grenoble, pela orientação e apoio durante os dois anos de minha estadia na França.

Aos pesquisadores e funcionários do CERMAV Cyrille Rochas, Sonia Ortega, Jean-Luck Puteaux, à secretária Isabelle Caldara e em especial Isabelle Pignot-Paintrand, pela amizade, apoio e grande contribuição para a realização dos experimentos.

Aos grandes amigos que foram minha família na França, em especial, Cris, Elton, Karol, Raquel e Windson por estarem presentes nos momentos mais especiais e enriquecedores da minha vida.

À minha família e a família do Renan pelo carinho, compreensão, por me fazerem acreditar que sou capaz e pelo constante incentivo, em especial aos meus pais e meu irmão.

Aos amigos Adri, Cláudia, Dani, Deivide, Ismael, Joyce, Maria, Marly, Rodrigo C., Rodrigo B., Samira, Silvia, a todos que fazem parte do grupo POLIMAT e todos que, mesmo não citados, colaboraram direta e indiretamente para a fosse possível a realização e conclusão deste trabalho.

Ao Thiago e a Andréa pela grande colaboração nos experimentos de permeação.

Ao Cristiano, Karin e Fernando pela valiosa contribuição.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrona (LNLS), ao European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) e ao Laboratório Central de Microscopia (LCME) da UFSC pela possibilidade da realização dos experimentos de SAXS e microscopias.

À UFSC, a coordenadoria de pós-graduação em química e aos professores e funcionários por terem possibilitado minha formação acadêmica.

Ao CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

Em especial ao meu namorado Renan pela paciência e amor.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIACÕES.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
1.1. Introdução e Justificativa	2
1.2. Objetivo Geral.....	3
1.3. Objetivos Específicos.....	3
CAPÍTULO 2	
REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. Nanotecnologia e Copolímeros em bloco	6
2.2. Comportamento auto-associativo dos copolímeros em bloco em estado sólido.....	10
2.2.1. Filmes nanoestruturados.....	12
2.2.2. PMPC- <i>b</i> -PDPA.....	13
2.3. Associação dos copolímeros em bloco em solventes seletivos.....	14
2.3.1. Vesículas poliméricas	18
2.3.2. PS- <i>b</i> -PAA.....	20
2.3.3. Interação entre partículas e polieletrólitos	21
2.3.4. Quitosana	22
2.3.5. Permeação cutânea	24
2.3.6. Finasterida.....	27
2.4. Referências	30
CAPÍTULO 3	
FILMES NANOETRUTURADOS A BASE DE PMPC- <i>b</i> -PDPA	39
3.1. Materiais.....	41

3.2. Metodologia	41
3.2.1. Preparação dos filmes	41
3.2.2. Caracterização morfológica	41
3.2.3. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)	42
3.3. Resultados e Discussão	43
3.4. Conclusões	55
3.5. Referências	56
CAPÍTULO 4	
DECORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS A BASE DE PS-<i>b</i>-PAA COM QUITOSANA	57
4.1. Materiais	59
4.2. Metodologia	59
4.2.1. Preparação das nanopartículas	59
4.2.2. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	60
4.2.3. Potencial Zeta	61
4.2.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	61
4.2.5. Crio-Microscopia Eletrônica de Transmissão (cryo-MET)	62
4.2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (MEV-FEG)	62
4.3. Resultados e Discussão	63
4.3.1. Caracterização das vesículas poliméricas de PS-<i>b</i>-PAA	66
4.3.2. Decoração das vesículas poliméricas com quitosana	75
4.4. Conclusões	91
4.5. Referências	93
CAPÍTULO 5	
PERMEAÇÃO CUTÂNEA DA FINASTERIDA ENCAPSULADA NO SISTEMA PS-<i>b</i>-PAA/QUITOSANA	94
5.1. Materiais	96
5.2. Metodologia	96
5.2.1. Preparação das nanopartículas encapsuladas com finasterida	96

5.2.2. Determinação do teor e da eficiência de encapsulação da finasterida nas suspensões de nanopartículas.....	97
5.2.2.1. Validação do método cromatográfico	98
5.2.2.2. Doseamento da Finasterida nas suspensões aquosas de nanopartículas.....	100
5.2.3. Determinação de tamanho da partícula e potencial zeta.....	100
5.2.4. Avaliação morfológica	101
5.2.5. Estudos de permeação cutânea da Finasterida	101
5.3. Resultados e Discussão	103
5.3.1. Validação da metodologia empregada para a quantificação da finasterida.....	103
5.3.2. Eficiência de encapsulação e teor de finasterida nas suspensões	106
5.3.3. Características físico-químicas das nanopartículas encapsuladas	108
5.3.4. Avaliação da permeação cutânea da Finasterida	115
5.4. Conclusões	123
5.5. Referências	124
CAPÍTULO 6	
CONCLUSÕES E PERSPECTIVA	126
RÉSUMÉ EM FRANÇAIS	130

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1.** Representação esquemática das principais morfologias que podem ser formadas a partir de um copolímero em bloco. Em solução: micelas, micelas cilíndricas e vesículas; em estado sólido: esferas cúbicas de face centrada (FCC), esferas cúbicas de corpo centrado (BCC), cilindros hexagonalmente empacotados (HEX), estrutura de fase intermediária (giroide, superfície F e superfície P), lamelas simples, moduladas e perfuradas (adaptado de FÖRSTER & PLANTENBERG, 2002).....7
- Figura 2.2.** Representação esquemática das morfologias que podem ser obtidas a partir de um copolímero em bloco linear P_A-b-P_B em função da fração em volume do bloco A (f_A). Quatro morfologias de equilíbrio estão representadas: S (esferas cúbicas de corpo centrado), C (cilindros), G (giróide), e L (lamela) (BATES & FREDRICKSON, 1999).....11
- Figura 2.3.** Formação de nanoestruturas do tipo micelas em meio aquoso.....15
- Figura 2.4.** Representação esquemática da contribuição das forças de atração e repulsão, para o mecanismo de formação das micelas em meio aquoso (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2005).....16
- Figura 2.5.** Exemplo de incorporação do princípio ativo no interior hidrofóbico da micela. ..17
- Figura 2.6.** Representação esquemática de uma vesícula polimérica (direita), acompanhada de uma imagem de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). O bloco hidrofóbico está representado em vermelho e as cadeias hidrofílicas solvatadas em azul. Na imagem de TEM somente as cadeias hidrofóbicas são visíveis (DU & O'REILLY, 2009).19
- Figura 2.7.** Diagrama representativo da sessão transversal da pele (adaptado de EL MAGHRABY et al., 2008).25
- Figura 2.8.** A enzima *5-alfarredutase* transforma a testosterona (T) em diidrotestosterona (DHT). A Finasterida (FIN) age como inibidor competitivo da enzima *5-alfarredutase* evitando a formação de DHT, hormônio responsável pela atrofia dos folículos capilares. .28
- Figura 3.1.** Representação esquemática do copolímero em bloco poli[(2-metacrilóiloxi)etilfosforilcolina]-*b*-poli[(2-diisopropilamino) metacrilato de etila] (PMPC-*b*-PDPA).....44
- Figura 3.2.** (a) e (b) Micrografias de TEM das seções dos filmes finos do copolímero PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀ preparados a partir de etanol e submetidos a 170°C durante 24h produzindo padrões altamente organizados. O detalhe em (b) mostra a correspondente Transformada Rápida de Fourier da imagem de maior magnificação com dois picos de Bragg decorrentes da ordem de longo alcance. As regiões mais escuras correspondem aos domínios de PDPA, de densidade eletrônica maior.....45
- Figura 3.3.** Micrografias de TEM das seções dos filmes finos do copolímero PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀ preparados a partir de etanol e submetidos a 170°C durante 24h em que a fase lamelar e hexagonal compacta co-existem. O detalhe a direita mostra em maior magnificação um arranjo hexagonal composto da fase minoritária.47

Figura 3.4. Padrão de SAXS dos filmes do copolímero PMPC ₃₀ - <i>b</i> -PDPA ₆₀ preparados a partir de uma solução em etanol a 10%, a temperatura ambiente e após tratamento térmico 170 °C por 24 h, como indicado. Este padrão de SAXS evidencia claramente a co-existência de morfologia lamelar e cilíndrica.....	49
Figura 3.5. Padrão de SAXS dos filmes do copolímero PMPC ₃₀ - <i>b</i> -PDPA ₆₀ preparados a partir de uma solução em metanol a 10%, a temperatura ambiente e após tratamento térmico 170 °C por 24 h, como indicado. Estes padrões de SAXS revelam claramente que em ambas as temperaturas os domínios são pobremente organizados.....	51
Figura 3.6. Imagem de TEM de uma seção fina do copolímero PMPC ₃₀ - <i>b</i> -PDPA ₆₀ preparado em metanol e subseqüentemente submetido à temperatura de 170°C durante 24h formando estruturas pobremente organizadas.....	52
Figura 3.7. Padrão de SAXS dos filmes do copolímero PMPC ₃₀ - <i>b</i> -PDPA ₆₀ preparados a partir de uma solução ácida diluída, a temperatura ambiente e após tratamento térmico 170 °C por 24 h, como indicado. O padrão de SAXS obtido a temperatura ambiente indica que os domínios são organizados em estruturas lamelares. Após tratamento térmico, a fase lamelar torna-se significativamente mais organizada.....	53
Figura 4.1. Representação esquemática do copolímero em bloco poliestireno- <i>b</i> -poli(ácido acrílico) (PS- <i>b</i> -PAA).	63
Figura 4.2. Micrografias de TEM das nanopartículas do copolímero PS ₁₃₉ - <i>b</i> -PAA ₁₇ (C3) preparado a partir de THF (A) e de dioxano (B), acompanhada de uma representação esquemática.	65
Figura 4.3. Função de correlação $C(q, t)$ em ângulos de espalhamento de 40° a 140° (A) e a respectiva dependência de q^2 em função da freqüência de relaxação (Γ) (B) para uma suspensão aquosa de C3 a uma concentração de 0,50 mg/mL e pH 5.	67
Figura 4.4. Função de correlação $C(q, t)$ em ângulos de espalhamento de 40° a 140° (A) e a respectiva dependência de q^2 em função da freqüência de relaxação (Γ) (B) para uma suspensão aquosa de C7 a uma concentração de 0,50 mg/mL e pH 5.	69
Figura 4.5. Plote de Guinier ($\ln I$ versus q^2) calculado a partir da intensidade de espalhamento de luz para nanopartículas do copolímero C3 (A) e C7 (B) em suspensão aquosa. A partir do coeficiente angular da reta é possível calcular o valor de R_g	71
Figura 4.6. Micrografias para as nanopartículas do copolímero PS ₁₃₉ - <i>b</i> -PAA ₁₇ (C3) (A e B) em maior e menor magnificação.....	73
Figura 4.7. Micrografia exemplificando o cálculo estimativo para a espessura da camada hidrofóbica da vesícula polimérica do copolímero C3, através do software MeasureIT (Olympus Soft Imaging Solutions).....	74
Figura 4.8. Micrografias para as nanopartículas do copolímero PS ₄₀₄ - <i>b</i> -PAA ₆₃ (C7) em maior e menor magnificação (A e B).	75
Figura 4.9. Representação esquemática da estrutura da quitosana (CS).	76

Figura 4.10. Representação de uma nanopartícula, na forma de vesícula polimérica de PS- <i>b</i> -PAA decorada com quitosana.	78
Figura 4.11. Variação do potencial zeta em função do pH para suspensões aquosas das nanopartículas do copolímero C7 a uma concentração de 0,01 mg/mL.....	79
Figura 4.12. Variação do potencial zeta em função da fração da concentração de quitosana ($M_v = 37000$ g/mol) pela concentração das nanopartículas, para o sistema C3 (A) e para o sistema C7 (B).	80
Figura 4.13. Variação do R_H em função da fração da concentração de quitosana ($M_v = 37000$ g/mol) pela concentração das nanopartículas, para o sistema C3 (A) e para o sistema C7 (B).....	81
Figura 4.14. Variação do potencial zeta em função da fração da concentração de quitosana oligossacarídeo pela concentração das nanopartículas, para o sistema C3 (A) e para o sistema C7 (B).	82
Figura 4.15. Variação do R_H em função da fração da concentração de quitosana ($M_v = 37000$ g/mol) pela concentração das nanopartículas, para o sistema C3 (A) e para o sistema C7 (B).....	83
Figura 4.16. Função de correlação $C(q,t)$ e distribuição dos tempos de relaxação obtidos à 90° , respectivos valores de raio hidrodinâmico (R_H), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ζ) para suspensões aquosas do copolímero C3, C3 decorado com as quitosanas oligossacarídeo (C3/CS-oligo) e quitosana ($M_v = 37000$ g/mol) (C3/CS-37). Condições experimentais: (1) $[CH]/[C3] = 2$ e (2) após uma diluição de 10 vezes.....	85
Figura 4.17. Função de correlação $C(q,t)$ e distribuição dos tempos de relaxação obtidos à 90° , respectivos valores de raio hidrodinâmico (R_H), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ζ) para suspensões aquosas do copolímero C7, C7 decorado com as quitosanas oligossacarídeo (C7/CS-oligo) e quitosana ($M_v = 37000$ g/mol) (C7/CS-37). Condições experimentais: (1) $[CH]/[C7] = 2$ e (2) após uma diluição de 10 vezes.....	87
Figura 4.18. Micrografia de cryo-TEM em alta magnificação para as nanopartículas do copolímero C7 (A) e C7 decoradas com quitosana CS-37 (B).....	88
Figura 4.19. Micrografia de TEM em alta magnificação para as nanopartículas do copolímero C3 (A) e C3 decoradas com quitosana CS-37, evidenciando uma camada de absorção de aproximadamente 10 nm (B), C7 (C) e C7 decorada com CS-37 (D).	89
Figura 4.20. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo. As imagens em alta resolução evidenciam as diferenças a nível de superfície para as nanopartículas preparadas a partir do copolímero em bloco PS ₄₀₄ - <i>b</i> -PAA ₆₃ (C7), antes (A) e após a decoração com CS-oligo (B) ou com CS-37 (C).	91
Figura 5.1. Esquema representativo da câmara de difusão de Franz (PERMEGEAR, INC. disponível em http://www.permegear.com/franz.htm).	102
Figura 5.2. Análise dos resíduos da curva de calibração da finasterida obtida por CLAE.....	105

Figura 5.3. Imagens de TEM para as nanopartículas de PS ₄₀₄ -b-PAA ₆₃ (C7) (A), C7 decorada com quitosana oligossacarídeo (C7/CS-oligo) (B) e C7 decorada com quitosana M _v = 37000 g/mol (C7/CS-37) (C), ambas encapsuladas com finasterida.....	110
Figura 5.4. Imagens de TEM para uma nanopartícula de PS ₁₃₉ -b-PAA ₁₇ (C3) encapsulada com finasterida e decorada com quitosana oligossacarídeo (CS-oligo).....	111
Figura 5.5. Representação esquemática para uma esfera do tipo vesícula bi-camada, cujos valores de raio do núcleo aquoso, da camada hidrofóbica e da camada hidrofílica (em contato com o solvente) foram determinados para as nanopartículas do tipo C3.	113
Figura 5.6. Perfil da intensidade de espalhamento de raios-X para as nanopartículas de PS ₁₃₉ -b-PAA ₁₇ (C3) (A) e para C3 encapsulada com finasterida (B). Os círculos pretos correspondem aos dados experimentais e a linha vermelha corresponde ao perfil de espalhamento calculado para partículas do tipo vesículas bi-camada.	114
Figura 5.7. Perfis de permeação da finasterida através da pele de orelha suína a partir de diferentes formulações. (média ± SD, n = 3).....	117
Figura 5.8. Perfis de permeação da finasterida através da pele de orelha suína a partir de diferentes formulações. (média ± SD, n = 3). Valores calculados considerando uma concentração fixa de FIN de 40 µg/mL no compartimento doador.....	118
Figura 5.9. Porcentagem de finasterida retida na derme e na epiderme após 24 horas. Média ± SDM (n = 3). Utilizou-se os testes ANOVA/SNK (p<0.05). As diferentes letras indicam as diferenças estatísticas significantes entre os tratamentos.....	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Variação do R_H calculado para o copolímero C7 em função do pH.....	70
Tabela 4.2. Valores de ρ para partículas com morfologias típicas (SCHÄRTL, 2007).	71
Tabela 5.1. Efeito da quantidade inicial de finasterida sobre os parâmetros físico-químicos das nanopartículas formadas pelo copolímero C3.	107
Tabela 5.2. Efeito da composição da formulação sobre o teor e a eficiência de encapsulação (EE) da finasterida.	108
Tabela 5.3. Parâmetros de permeação das diferentes preparações de finasterida (n = 3). Resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão.	119

LISTA DE ABREVIÇÕES

A(t)	Distribuições do tempo de relaxação
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC	Concentração micelar crítica
C(q,t)	Função de auto-correlação
CS-oligo	Quitossana oligosacarídeo
CS-37	Quitossana de massa molar viscosimétrica média de 37000 g/mol
C3	PS ₁₃₉ - <i>b</i> -PAA ₁₇
C7	PS ₄₀₄ - <i>b</i> -PAA ₆₃
D	Coefficiente de difusão
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
FIN	Finasterida
I (q)	Intensidade de espalhamento em função da magnitude do vetor de espalhamento
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mn	Massa molar numérica média
Mv	Massa molar viscosimétrica média
PAA	Poli(ácido acrílico)
PDPA	Poli(2-(diisopropilamina) metacrilato de etila)
PMPC	Poli(2-(metacrilóiloxi)etilfosforilcolina)
PS	Poliestireno
Q	Vetor de espalhamento
R _g	Raio de giração
R _H	Raio hidrodinâmico

SAXS	Espalhamento de raios-X a baixos ângulos
T_g	Temperatura de transição vítrea
Γ	Frequência de relaxação
2θ	Ângulo entre o feixe incidente de raio X e o detector
λ	Comprimento de onda
ζ	Potencial zeta

RESUMO

Este trabalho descreve a microseparação de fases em estado sólido do filme preparado a partir de um copolímero em bloco composto do bloco poli(2-(metacriloiloxi)etilfosforilcolina), um bloco altamente biocompatível, e do bloco Poli(2-(diisopropilamina) metacrilato de etila), sensível ao pH. A auto-associação em solução do copolímero a base de poliestireno (PS) e de poliácido acrílico (PAA) e sua decoração com quitosana foram estudados, verificando a sua habilidade para incorporar e liberar transdermicamente o fármaco finasterida, um medicamento inibidor da enzima 5-alfa-redutase, que tem sido recomendada para o tratamento de alopecia androgenética.

A morfologia de filmes de PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀ foi analisada utilizando SAXS e (S)TEM. Os filmes preparados pelo método *casting* a partir de soluções em etanol exibem uma morfologia cilíndrica, que sofre uma transição do tipo ordem-ordem sob tratamento térmico a 170°C, resultando em uma estrutura lamelar que coexiste com uma menor proporção de cilindros organizados em uma fase hexagonal compacta. Por outro lado, filmes do copolímero preparados em metanol não sofrem a mesma transição morfológica, obtendo-se estruturas pobremente organizadas, independente do tratamento térmico. Finalmente, estruturas lamelares são obtidas diretamente a partir de uma solução aquosa a pH 4, sem necessidade de tratamento térmico. Estes sistemas oferecem uma nova alternativa para a fabricação de estruturas lamelares que consiste de um material biomimético e anti-incrustante, expandindo a gama de possibilidades no campo de engenharia macromolecular.

Outra estratégia adotada neste trabalho foi baseada no desenvolvimento de nanopartículas organizadas com propriedades de superfície biocompatíveis, formadas por vesículas poliméricas negativamente carregadas, a base de copolímeros em bloco de

poliestireno (PS) e poli(ácido acrílico) (PAA), decoradas com quitosana, um polissacarídeo de carga oposta. A adsorção da quitosana com duas massas moleculares distintas (quitosana oligossacarídeo e quitosana de baixa massa molecular) sobre a superfície opostamente carregada de nanopartículas de PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ e PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ foi demonstrada por medidas de espalhamento de luz dinâmico, potencial zeta e caracterização morfológica. Na presença de quitosana, o potencial zeta das nanopartículas (na forma de vesículas poliméricas) torna-se positivo. Este resultado foi interpretado em termos de interações eletrostáticas, que induz a adsorção das cadeias de quitosana sobre a superfície das nanopartículas. Resultado que foi confirmado por observações comparativas a partir de técnicas microscópicas. Vesículas poliméricas decoradas ou não com dimensões inferiores a 200 nm e com uma estreita faixa de distribuição de tamanho foram obtidas para todos os sistemas investigados.

O efeito da decoração das nanopartículas com quitosana sobre a permeação cutânea da finasterida, incorporada na parede hidrofóbica das vesículas poliméricas também foi avaliado. A permeação cutânea da finasterida foi estimada por parâmetros de permeabilidade como fluxo, tempo de latência e coeficiente de permeabilidade do fármaco através de peles de orelha suína (modelo *in vitro*). Foi observada uma melhora na permeação da finasterida a partir do sistema nanoparticulado, especialmente para nanopartículas decoradas com quitosana. Nanopartículas preparadas pelo copolímero PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ decorado com quitosana demonstrou ser o sistema mais apropriado uma vez que promoveu uma maior retenção do fármaco na pele e baixos valores de fluxo de permeação, sugerindo que o sistema fornece uma alternativa como veículo de liberação transdérmica para finasterida.

ABSTRACT

This work describes the microphase separation in bulk of an diblock copolymer comprising a highly biocompatible poly[2-(methacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine] block and a pH-sensitive poly[2-(diisopropylamino) ethyl methacrylate] block (PMPC-*b*-PDPA). The self-assembly of an amphiphilic diblock copolymer based on polystyrene (PS) and poly(acrylic acid) (PAA) was studied in terms of their decoration with the chitosan, verifying their ability to incorporate and transdermally release the drug finasteride, a steroidal molecule 5- α -reductase inhibitor that has been recommended for the treatment of androgenetic alopecia.

The morphology of PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀ films was analyzed using SAXS and (S)TEM. PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀ films cast from ethanol solution at room temperature exhibit a thermodynamically quasi-stable cylindrical morphology, which undergoes an order-order transition upon thermal annealing at 170 °C: the resulting lamellar structure coexists with a minor proportion of cylinders organized into a hexagonal compact phase. In contrast, copolymer films cast from methanol do not undergo the same morphological transition. Instead, short-range liquid-like structures are obtained regardless of the annealing processes. Finally, direct self-assembly to form a lamellar morphology *at room temperature* can be achieved by solvent-casting from aqueous solution at pH 4. These systems offer a new alternative for the fabrication of lamellar structures in which one layer is biomimetic and non-fouling, expanding the range of possibilities in the macromolecular engineering field.

Another strategy adopted in this work was based on the development of well-organized nanoparticles with nature-bioinspired surface properties, formed between negatively charged polymersomes based on polystyrene (PS) and poly(acrylic acid) (PAA) block

copolymers decorated with chitosan, an oppositely charged polysaccharide. The role of chitosan with two distinct molecular weights (chitosan oligosaccharide and low molecular weight chitosan) adsorption on the surface of oppositely charged PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ and PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ nanoparticles were demonstrated by dynamic light scattering measurements, zeta potential and morphological characterization. In the presence of chitosan, the zeta potential of polymersomes becomes positive. This result was interpreted in terms of electrostatic interactions, which induce a flat adsorption of the chitosan on the surface of the polymersomes. This result was further confirmed by a comparative observation by microscopy of bare and chitosan-decorated polymersomes. Polymersomes with a diameter < 200 nm and a relatively narrow size distribution were obtained for both systems. The effect of chitosan decoration of self-assembled nanoparticles on skin penetration *in vitro* of finasteride was also evaluated, once incorporated in the wall hydrophobic of polymersomes. The skin permeation through pig ear skin of finasteride was estimated by the permeability parameters such as flux, lag time and permeability coefficient of finasteride. An improved permeation of finasteride from the nanoparticle system was observed, especially from nanoparticles decorated with chitosan. The PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ polymersome decorated with chitosan seems to be the most appropriate system since it provided higher drug retention in skin and low permeation flux values, suggesting that the PS-*b*-PAA/chitosan system provides an alternative for transdermal drug delivery system of finasteride.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. Introdução e Justificativa

Tendo em vista a importância dos materiais poliméricos na área nanotecnológica, os copolímeros em bloco são objeto de investigação constante devido às suas propriedades de auto-associação tanto em estado sólido, na forma de filmes finos nanoestruturados, quanto em suspensão, formando objetos com morfologias diversas em escala nanométrica.

Aproveitando as características de auto-associação dos copolímeros em bloco, este trabalho de tese foi destinado a encontrar um método de fácil preparação e caracterização físico-química de filmes finos e de nanopartículas decoradas com um polímero de origem natural.

Filmes finos com nanoestruturas bem definidas preparados a partir do copolímero em bloco poli[(2-metacrilóiloxi) etilfosforilcolina]-*b*-poli[(2-diisopropilamino) metacrilato de etila] (PMPC-*b*-PDPA) foram obtidos e caracterizados. A morfologia de um copolímero dibloco compreendendo um bloco altamente biocompatível, PMPC, e um bloco pH sensitivo, PDPA, foi investigada através de medidas de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) e por técnicas de imagem, demonstrando transições morfológicas como uma função do solvente e do tratamento térmico empregados.

Para as nanopartículas, o sistema de investigação foi o copolímero poliestireno-*b*-poli(ácido acrílico) (PS-*b*-PAA) decorado com quitosana, cuja combinação polímero sintético/polissacarídeo proporciona uma estratégia original para o desenvolvimento de estruturas bem definidas, com propriedades de superfície biologicamente compatíveis e biodegradáveis. Neste caso específico, a decoração é principalmente dirigida por interações eletrostáticas entre grupos carregados positivamente do polissacarídeo (grupos NH_3^+) com a superfície carregada negativamente das nanopartículas (grupos COO^-).

As nanopartículas são em geral empregadas na encapsulação, transporte e liberação de forma controlada e vetorizada de princípios ativos, e o desenvolvimento de sistemas coloidais apropriados para a liberação de moléculas bioativas é de grande importância para as áreas farmacêuticas, cosméticas, assim como de grande interesse acadêmico. Dentro deste contexto as nanopartículas de PS-*b*-PAA decoradas com quitosana foram testadas quanto a sua capacidade de incorporar e liberar transdermicamente o fármaco finasterida, utilizado para o tratamento de alopecia androgenética (calvície).

1.2. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi o de preparar e caracterizar filmes e nanopartículas preparados pela auto-associação de copolímeros em bloco, utilizando para tal os copolímeros poli[(2-metacrilóiloxi) etilfosforilcolina]-*b*-poli[(2-diisopropilamino) metacrilato de etila] (PMPC-*b*-PDPA) e poliestireno-*b*-poli(ácido acrílico) (PS-*b*-PAA), bem como estudar as alterações físico-químicas ocorrida nas nanopartículas de PS-*b*-PAA na presença de quitosana. Além disso, avaliar a viabilidade de aplicação das nanopartículas decoradas com quitosana como um sistema de encapsulação e liberação do princípio ativo finasterida.

1.3. Objetivos Específicos

- ✓ Preparação de filmes finos a partir do copolímero em bloco poli[(2-metacrilóiloxi) etilfosforilcolina]-*b*-poli[(2-diisopropilamino) metacrilato de etila] (PMPC-*b*-PDPA);

- ✓ Caracterização das nanoestruturas obtidas através dos filmes de PMPC-*b*-PDPA por técnicas de espalhamentos de raios-x a baixos ângulos (SAXS) e por técnicas de imagens, como microscopia eletrônica de transmissão (TEM).
- ✓ Encontrar um método de fácil preparação de nanopartículas a partir do copolímero PS-*b*-PAA e caracterizá-las quanto ao seu tamanho, polidispersidade, estrutura, morfologia e carga superficial;
- ✓ Determinar o efeito da decoração das nanopartículas com quitosana sobre os seus parâmetros físico-químicos (morfologia, tamanho, polidispersidade, carga superficial e estabilidade), empregando para tal quitosanas de diferentes massas molares;
- ✓ Estudar o sistema PS-*b*-PAA/quitosana como carreador do fármaco finasterida, avaliando a eficiência de encapsula o e o teor do fármaco encapsulado, posteriormente aos testes de valida o da metodologia empregada para a quantifica o do fármaco em questão (especificidade, linearidade, precisão, exatidão e limite de detec o) pela técnica de cromatografia liquida de alta eficiência (HPLC);
- ✓ Avaliar a permea o cutânea (modelo *in vitro*) do fármaco encapsulado a partir dos diferentes sistemas PS-*b*-PAA na presença e ausência de quitosana, através dos cálculos de coeficiente de permeabilidade, fluxo e tempo de latência;

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Nanotecnologia e Copolímeros em bloco

A nanotecnologia é um dos grandes temas da atualidade, e constitui um dos principais focos das atividades de pesquisa. Materiais nanoestruturados, com características singulares, determinadas pelas suas dimensões, estruturas internas e superficiais, compõem um ramo fascinante da ciência dos materiais, devido às inúmeras possibilidades de aplicação em áreas como eletrônica (PARK et al., 2009), na liberação controlada de fármacos (HUGUES, 2005), entre outras (GLEITER, 1995) causando considerável impacto na ciência e tecnologia.

Neste contexto, os copolímeros em bloco, que são uma classe particular de polímeros compostos por no mínimo dois fragmentos de natureza química diferente, unidos por uma ligação covalente (BATES & FREDRICKSON, 1990), destacam-se por seu grande potencial de aplicação em diferentes ramos da nanotecnologia (HAMLEY, 2003). Possuem a capacidade de se auto-organizar formando nanoestruturas com morfologias e padrões característicos, que são intrinsecamente ligados à sua arquitetura e composição (KHANDPUR et al., 1995) (Figura 2.1). Em estado sólido o processo de auto-organização é por vezes designado de microseparação de fases e em solução por processo auto-associativo. Nos dois casos, cada um dos blocos distintos reside em uma fase formando domínios ordenados, com dimensões nanométricas, como resultado de um balanço entre as forças de atração e repulsão (ABETZ & SIMON, 2005).

A busca por padrões cada vez mais reduzidos tem sido um dos grandes desafios para diversas áreas, como por exemplo, na microeletrônica, onde a redução do tamanho dos componentes proporciona produtos com maior qualidade, custos reduzidos e menores gastos de energia (BLACK et al., 2007). Para que a tendência a miniaturização continue, a

tecnologia utilizada para a fabricação da microeletrônica deverá ser capaz de operar cada vez em menor escala, o que permitirá o aumento da velocidade dos computadores e de todos os aparatos eletrônicos hoje disponíveis (PARK et al., 1997).

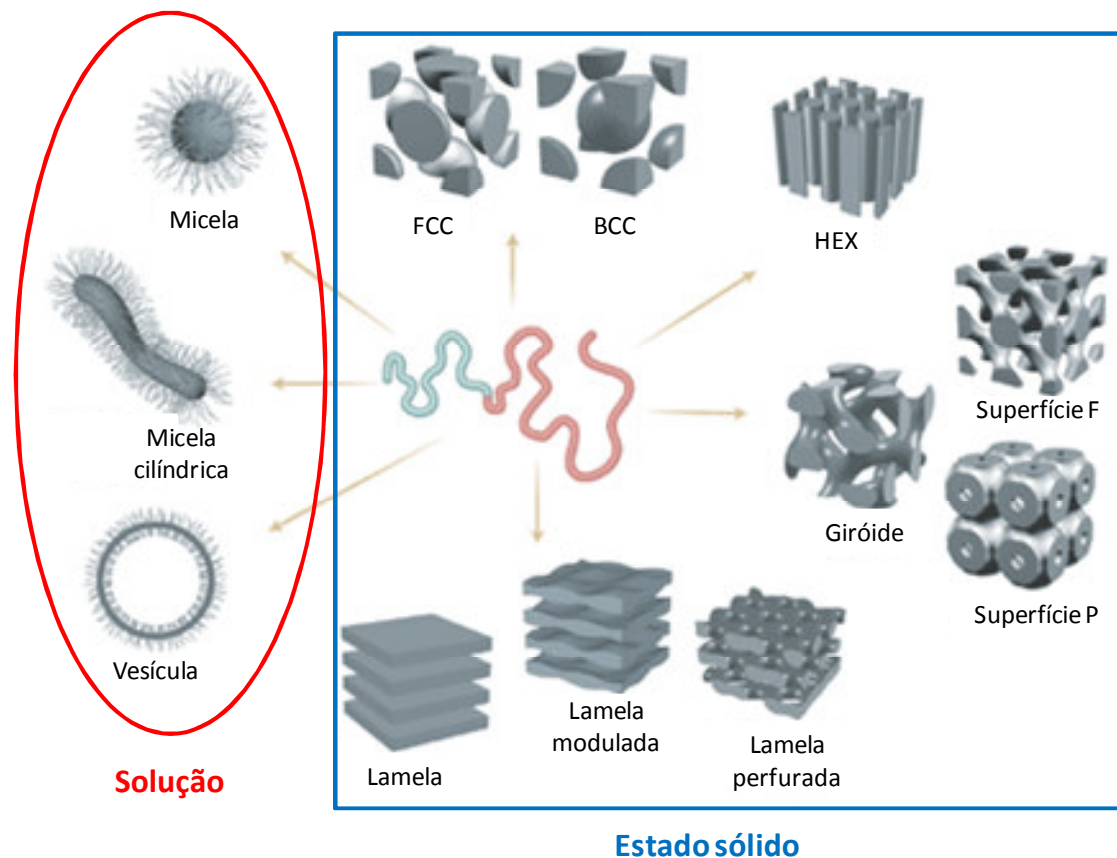


Figura 2.1. Representação esquemática das principais morfologias que podem ser formadas a partir de um copolímero em bloco. Em solução: micelas, micelas cilíndricas e vesículas; em estado sólido: esferas cúbicas de face centrada (FCC), esferas cúbicas de corpo centrado (BCC), cilindros hexagonalmente empacotados (HEX), estrutura de fase intermediária (giroide, superfície F e superfície P), lamelas simples, moduladas e perfuradas (adaptado de FÖRSTER & PLANTENBERG, 2002).

Em busca de soluções que permitam afastar os limites físicos e tecnológicos encontrados pela microeletrônica, os copolímeros em bloco representam uma ferramenta muito promissora para se conseguir alcançar estes objetivos. A idéia de se utilizar copolímeros em bloco como moldes litográficos foi proposta pela primeira vez em 1995 (MANSKY et al., 1995), e aparece hoje como uma solução tecnológica para a geração de objetos uniformes localizados e de fortes densidades, podendo substituir a litografia convencional.

Além da eletrônica, outras áreas nanotecnológicas estão tomando vantagem das características dos copolímeros em bloco na forma de filmes auto-organizáveis. Por exemplo, Yang e colaboradores (YANG et al., 2006) desenvolveram uma membrana de ultrafiltração a partir de um filme fino do copolímero em bloco de poliestireno e poli(metacrilato de metila) PS-PMMA na presença de um homopolímero para a captura do vírus HRV14.

Aplicações como células a combustível, baterias e dispositivos eletrônicos se utilizam das propriedades inerentes de cada bloco, e dependem extremamente da regularidade dos padrões de auto-organização dos copolímeros em uma larga escala (SEGALMAN, 2005). Com isto, a busca por materiais em escala cada vez menor, com propriedades específicas e padrões de organização regulares têm sido o objeto de estudo de diversos grupos de pesquisa, no que se refere ao processo de auto-associação dos copolímeros em bloco em estado sólido.

Outro foco intenso de pesquisas utilizando copolímeros em bloco como matéria-prima para o desenvolvimento de nanomateriais é o da medicina, cujo objetivo está direcionado ao preparação de novos sistemas de liberação de fármacos. Existe uma ampla literatura que

explora as características, vantagens e desvantagens da utilização destes sistemas. Fatores como a capacidade de encapsulação, cinética de liberação, tempo de circulação, biodistribuição, tamanho, distribuição de tamanho e estabilidade, são propriedades freqüentemente exploradas (ALLEN et al., 1999).

O futuro de muitos agentes terapêuticos depende do desenvolvimento apropriado de carreadores para a sua liberação no corpo. O tipo de nanoestrutura usado para transportar medicamentos é, por exemplo, um fator determinante na sua eficácia, assim como as características físico-químicas são de fundamental importância para o planejamento e o controle de suas propriedades de liberação. Diversos tipos de nanopartículas compostas de uma grande variedade de materiais têm sido desenvolvidos, resultando em sistemas com distintas propriedades e aplicações (LETCHFORD & BURT, 1997).

Portanto, estudos utilizando esta classe de polímeros fornecem as bases para uma expansão rápida de pesquisa e desenvolvimento em nanotecnologia, tanto no que diz respeito à exploração de suas propriedades em estado sólido, na forma de filmes nanoestruturados, onde a redução nas dimensões e a obtenção de padrões altamente organizados são características almejadas; quanto em solução, na forma de nanopartículas, onde características como tamanho, distribuição de tamanho, e propriedades de superfície são atributos de caráter fundamental para o design de aplicações em diversos ramos de pesquisa.

2.2. Comportamento auto-associativo dos copolímeros em bloco em estado sólido

O processo de auto-associação é definido como a construção espontânea de estruturas complexas dos componentes do sistema por forças de origem não-covalentes, como as forças repulsivas de longo alcance, hidrofílicas e hidrofóbicas, e por forças de atração de curto alcance, como por exemplo, a ligação covalente dos blocos poliméricos e incompatibilidade física ou química (BATES & FREDRICKSON, 1990).

O grande potencial de muitos destes sistemas está associado ao fato de que uma ligação covalente entre duas ou mais cadeias poliméricas diferentes e incompatíveis limitam sua separação de fases a escalas pré-definidas por suas dimensões moleculares (SMART et al., 2008). Como resultado, cada bloco residirá sobre sua própria fase enquanto permanece covalentemente ligado a outro, conduzindo à formação de domínios ordenados (FARRELL et al., 2009). O comportamento de auto-organização das cadeias de copolímeros em bloco sob a forma de nanodomínios é governado pela repulsão mútua dos blocos de composição química diferente, a fim de minimizar a energia livre do sistema (HAMLEY, 2003).

A estruturação dos copolímeros em bloco em estado sólido é amplamente estudada, seja teórica ou experimentalmente. Do ponto de vista teórico, a estruturação de um copolímero dibloco do tipo AB depende essencialmente de parâmetros como: o parâmetro de interação de Flory-Huggins χ , que mede a incompatibilidade entre os dois monômeros, do grau de polimerização N e da fração em volume f dos blocos A e B. O produto χN determina o grau de segregação dos blocos A e B, e se este valor é inferior a 10, a entropia do sistema predomina em relação à entalpia da mistura dos dois blocos, resultando em uma fase desordenada. No entanto, quando o produto χN aumenta, os dois blocos se tornam incompatíveis causando uma transição do tipo ordem-desordem (ODT) e os dois blocos se

separam. A composição $f_A = N/NA$ (onde $N = NA + NB$) do copolímero dibloco controla então a geometria da micro estruturação (KLOK & LECOMMANDOUX, 2001).

Os materiais resultantes combinam as propriedades dos dois componentes, com microestruturas de dimensões na ordem de 10-100 nm, podendo adotar uma ampla variedade de estruturas e morfologias. Para os copolímeros do tipo AB (P_A-b-P_B), quatro morfologias principais são observáveis (Figura 2.2): uma estruturação lamelar (L) onde A e B se separam em lamelas ricas em A e em B, uma estruturação do tipo hexagonal cujo bloco minoritário forma cilindros (C) que se organizam segundo uma geometria hexagonal, uma fase cúbica, onde o componente minoritário forma esferas (S) que se arranjam segundo uma estrutura cúbica e uma fase intermediária bicontínua giroidal (G).

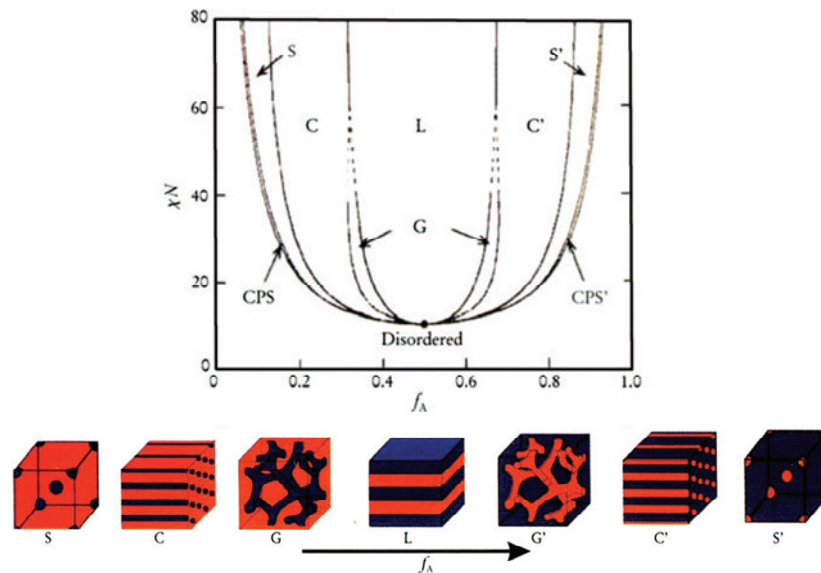


Figura 2.2. Representação esquemática das morfologias que podem ser obtidas a partir de um copolímero em bloco linear P_A-b-P_B em função da fração em volume do bloco A (f_A). Quatro morfologias de equilíbrio estão representadas: S (esferas cúbicas de corpo centrado), C (cilindros), G (giróide), e L (lamela) (BATES & FREDRICKSON, 1999).

Experimentalmente várias técnicas, tais como espalhamento de raios X, difusão de nêutrons e técnicas de microscopia, permitem a determinação da morfologia da estruturação dos copolímeros em bloco, principalmente no que se refere a preparação e caracterização de filmes nanoestruturados.

2.2.1. Filmes nanoestruturados

Sistemas a base de copolímeros em bloco têm sido utilizados com sucesso para a fabricação de nanomateriais via um processo “*bottom-up*” em que uma quantidade finita de blocos construídos elementarmente (cadeias macromoleculares) se auto-organizam hierarquicamente (SEGALMAN, 2005; van ZOELLEN & BRINKE, 2009).

Filmes finos de copolímeros em bloco podem ser facilmente preparados por spin-coating ou ainda pelo método “*casting*” a partir de soluções poliméricas, mas o estado de equilíbrio no filme resultante é raramente encontrado logo em seguida da preparação. Pós-tratamentos são então necessários a fim de se obter a morfologia desejada (tratamentos térmicos, campo elétrico ou exposições a vapores de solventes). Estas técnicas têm como objetivo o aumento da mobilidade das cadeias resultante de um efeito de plastificação, de uma modificação dos parâmetros de interação dos dois blocos e de uma modificação de energias superficiais.

Nesta área de macromoléculas auto-organizáveis em expansão, a próxima geração de filmes finos nanoestruturados a base de copolímeros em bloco compreende sistemas simultaneamente com longa ordem de alcance, com capacidade estímulo-resposta e

habilidade para participar ativamente na formação de estruturas supramoleculares versáteis (KLOK et al., 2001; KUO, 2009).

2.2.2. PMPC-*b*-PDPA

O polímero poli[2-(metacrilóiloxi)etil fosforilcolina] (PMPC) é um polímero altamente hidrofílico e encontra ampla aplicação como biomembranas e estruturas biomiméticas, devido a sua alta biocompatibilidade e propriedades anti-incrustantes (BI et al., 2006). Por outro lado, o polímero poli[2-(diisopropilamino) etil metacrilato] (PDPA) é um polímero sensível ao pH devido a presença de grupos amino terciários, que podem fazer parte da formação de estruturas supramoleculares agindo como sítios potenciais para ligações de hidrogênio (TAKTAK & BUTUN, 2010). Como uma base fraca, muitos grupos também reagem com ácidos fracos contrariamente a funções de outras moléculas, conduzindo à formação de complexos de polieletrólitos (LOMAS et al., 2010).

Esta característica tem comprovado que o PDPA e compostos relacionados, em geral poli[2-(dialquilamino) etil metacrilatos], são uma opção interessante para a fabricação de vesículas estáveis e micelas capazes de encapsular moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas (LOMAS et al., 2007; GIACOMELLI et al., 2006), com uma alta capacidade de encapsulação quando interações específicas do tipo ácido/base estão presentes (GIACOMELLI et al., 2007). Materiais nanoestruturados híbridos orgânicos em que nanopartículas metálicas estão distribuídas seletivamente nos microdomínios do PDPA também tem sido preparadas utilizando tais classes de macromoléculas (DU et al., 2005).

A literatura tem investigado o copolímero em bloco poli[2-(metacrilóiloxi)etil fosforilcolina]-*bloco*-poli[2-(diisopropilamino) etil metacrilato] PMPC-*b*-PDPA em solução aquosa na forma de micelas, nanopartículas ou vesículas poliméricas, porém nenhum estudo relacionado a nanoestruturação em estado sólido foi reportado.

Segundo a perspectiva de formação do filme, o copolímero em bloco PMPC-*b*-PDPA é bastante funcional e atrativo. Antecipa-se também que pode apresentar um complexo diagrama de fases quando comparado com sistemas clássicos devido às propriedades individuais acima citadas de cada segmento (como por exemplo, a natureza zwitteriônica do PMPC, resposta a estímulos externos, ligações de hidrogênio e interações ácido/base do PDPA), que pode ditar o equilíbrio de forças durante o processo de segregação (ALMDAL et al., 1992). Portanto, estudos mais aprofundados investigando as características e propriedades de filmes nanoestruturados do copolímero em bloco PMPC-*b*-PDPA é de amplo interesse no campo de engenharia de nanomateriais funcionais.

2.3. Associação dos copolímeros em bloco em solventes seletivos

O processo de auto-associação dos copolímeros em bloco em solução é também de grande interesse para aplicações nanotecnológicas. Em solventes seletivos, a solvatação é preferencial a um dos blocos e conduz à auto-associação do copolímero, produzindo estruturas de dimensões nanométricas e com morfologias variadas. A natureza química e a composição de cada bloco, a arquitetura, a concentração e a temperatura são parâmetros de influência nestes sistemas. Quanto mais hidrofóbico é o sistema, mais importante é o número de agregação. O tamanho ou a morfologia, desde as mais simples como as micelas

de tipo estrela ou as mais complexas como do tipo flor, são igualmente ligados à arquitetura dos blocos que os constituem (ALLEN, 1999).

Os copolímeros em bloco com caráter anfifílico são caracterizados por possuir segmentos com grande diferença de solubilidade, um hidrofílico e outro hidrofóbico, e por apresentar a particularidade de se auto-organizar formando micelas ou agregados, em um solvente seletivo para um dos blocos, acima de uma dada concentração, chamada de concentração micelar crítica (CMC) (KATAOKA et al., 2001).

No processo de micelização em água, o bloco hidrofílico é orientado para a fase contínua, formando o revestimento da nanopartícula enquanto que a parte hidrofóbica, protegida do meio externo, forma o núcleo (Figura 2.3). O núcleo hidrofóbico serve como um micro ambiente ideal para a encapsulação e liberação de princípios ativos de caráter hidrofóbico, enquanto que o bloco em contato com o solvente serve como uma interface estabilizante entre o núcleo hidrofóbico e o meio externo (CHAN et al., 2007; RIJCKEN et al., 2007).

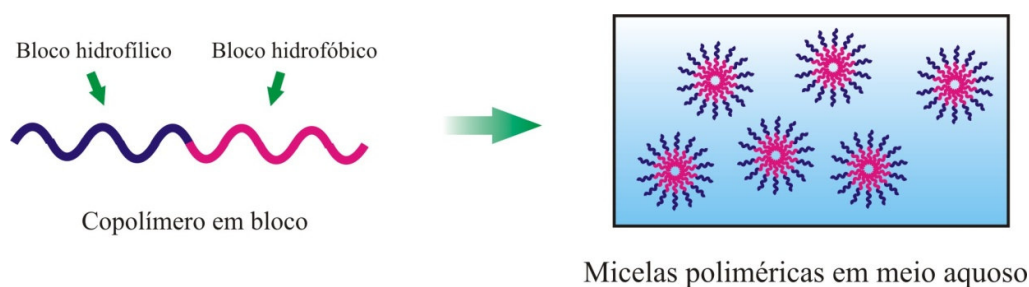


Figura 2.3. Formação de nanoestruturas do tipo micelas em meio aquoso.

Existem duas principais forças contrárias e responsáveis pela formação das nanopartículas em suspensão, uma força de atração que tende a unir as moléculas e uma força de repulsão que limita o número de moléculas que podem se associar (Figura 2.4). Em copolímeros estas tendências estão associadas com os diferentes blocos na molécula. Para um polímero não carregado são principalmente as interações das unidades monoméricas com o solvente que determinam se serão ou não atraídas umas pelas outras (STUART et al., 2005). A forma do agregado resultante será aquela que melhor satisfaça estas exigências a depender do tamanho relativo dos blocos.

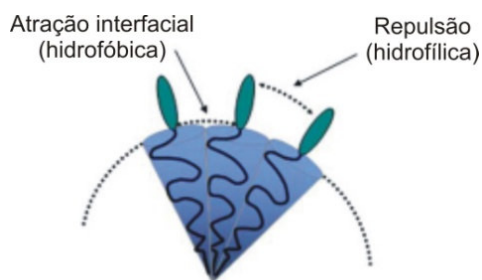


Figura 2.4. Representação esquemática da contribuição das forças de atração e repulsão, para o mecanismo de formação das micelas em meio aquoso (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2005).

Estes sistemas apresentam, portanto, a capacidade de solubilizar, estabilizar e liberar substâncias que possuam baixa solubilidade em água e/ou substâncias com elevada toxicidade de maior ou menor complexidade estrutural (Figura 2.5).

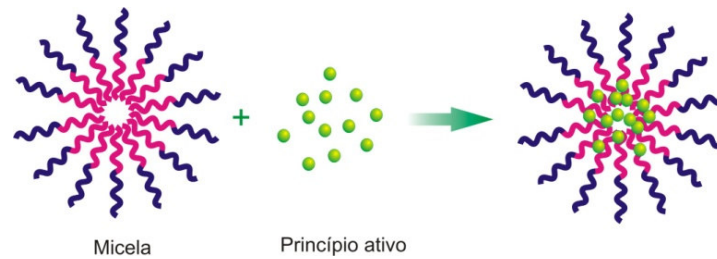


Figura 2.5. Exemplo de incorporação do princípio ativo no interior hidrofóbico da micela.

Durante a auto-associação dos copolímeros anfifílicos ocorre um decréscimo da energia livre do sistema devido a remoção dos fragmentos hidrofóbicos do meio aquoso em função da formação da nanopartícula (TORCHILIN, 2007). Com o processo de agregação há também um ganho de entropia devido ao aumento da desordem das moléculas de água que antes solvatavam as cadeias livres e, também devido a um maior número de arranjos conformacionais da cadeia hidrofóbica dentro do núcleo da nanopartícula (ASTAFIEVA et al., 1993).

Copolímeros anfifílicos em bloco podem se auto-associar formando uma ampla faixa de morfologias em solução, incluindo micelas esféricas, bastões, vesículas poliméricas e outros agregados mais complexos (DU & O'REILLY, 2009).

A obtenção de diferentes nanoestruturas, com diferentes morfologias pode ser explicada por um efeito de balanço de forças envolvendo o grau de estiramento dos segmentos que formam o núcleo, da energia interfacial entre o núcleo das nanopartículas e o solvente e das interações entre os segmentos que compõem a superfície da nanopartícula, mas deve-se principalmente ao balanço entre as frações em volume dos segmentos hidrofílico e hidrofóbico dos copolímeros. Este balanço de forças determina também

parâmetros estruturais como tamanho da partícula, dimensões do núcleo e número de agregação (ALLEN et al., 1999).

Quando o comprimento do bloco hidrofóbico é relativamente maior do que do bloco hidrofílico, a formação de estruturas do tipo vesículas é favorecida (DU & O'REILLY, 2009).

2.3.1. Vesículas poliméricas

O interesse em objetos nano-organizados como possível veículo para a encapsulação e liberação de princípios ativos tem crescido enormemente. Dentro deste contexto, as nanopartículas preparadas a partir de vesículas poliméricas que exploram a combinação de uma parede espessa hidrofóbica capaz de encapsular um princípio ativo pobremente solúvel e uma cavidade interna para a encapsulação de agente ativos hidrofílicos, têm sido extensivamente investigadas (DISCHER & EISENBERG, 2002).

Vesículas poliméricas são consideradas mais estáveis e quimicamente mais versáteis do que vesículas baseadas em fosfolipídios e outros veículos de liberação nanoparticulados (DISHER et al., 1999). Além disso, o segmento hidrofílico pode ser utilizado para conjugar biologicamente moléculas ativas, podendo assim alterar a interação da vesícula com o meio que a circunda (DU & O'REILLY, 2009).

A Figura 2.6 mostra a estrutura típica de uma vesícula polimérica, com o bloco hidrofílico (hidratado) em azul localizado no lado interno e externo da membrana hidrofóbica em vermelho (DU & O'REILLY, 2009).

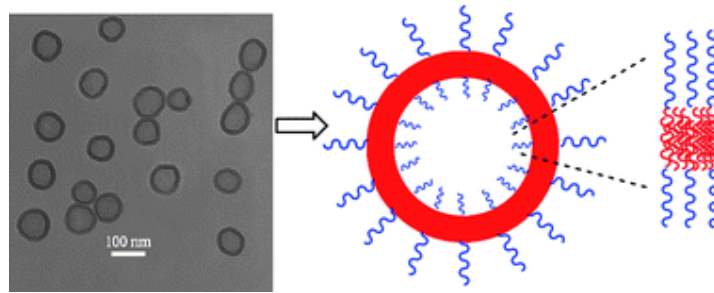


Figura 2.6. Representação esquemática de uma vesícula polimérica (direita), acompanhada de uma imagem de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). O bloco hidrofóbico está representado em vermelho e as cadeias hidrofílicas solvatadas em azul. Na imagem de TEM somente as cadeias hidrofóbicas são visíveis (DU & O'REILLY, 2009).

Como veículo de encapsulação e liberação vetorizada de princípios ativos as vesículas poliméricas são bastante atrativas, e vem sendo amplamente investigadas (XU et al., 2005; DISHER et al., 2007; LEVINE et al., 2008; SANSON et al., 2010), além de apresentar outras interessantes aplicações tecnológicas (CHEN et al., 2011). Suas propriedades de transporte versáteis, uma vez que princípios ativos hidrofóbicos podem ser inseridos na membrana e moléculas de caráter hidrofílico podem ser encapsuladas na cavidade aquosa, foram recentemente exploradas na liberação de compostos anticancerígenos como paclitaxel (hidrofóbico) e a doxorrubicina (hidrofílica) (AHMED et al., 2006). Estes sistemas, análogos aos lipossomas, podem também vetorizar os princípios ativos, em função de modificações em nível de superfície (AHMED & DISCHER, 2004) e de características como sensibilidade ao pH (CHEN et al., 2010; MUELLER et al., 2011) e temperatura (LEE ETA al., 2010).

2.3.2. PS-*b*-PAA

Nanoestruturas formadas pelo copolímero dibloco poliestireno-*b*-poli(ácido acrílico) (PS-*b*-PAA) têm sido intensivamente investigadas principalmente pelo grupo de pesquisa liderado por Adi Eisenberg (CAMERON et al., 1999). Quando em solvente seletivo para um dos blocos, por exemplo, água, este copolímero forma agregados como resultado da associação do segmento insolúvel PS para minimizar o contato com o solvente. O PAA atua como estabilizante da nanopartícula sendo de fundamental importância no processo de formação dos agregados (MOFFITT et al., 1996). A alta tensão interfacial entre o PS e a água, assim como o alto grau de curvatura do núcleo tornam possível a formação de diferentes morfologias como micelas (SI et al., 2003), bastões (BURKE & EISENBERG, 2001), vesículas (SOO & EISENBERG, 2004), e outras estruturas mais complexas (ZHANG & EISENBERG, 1996; SHI et al., 2004).

Estas estruturas são definidas principalmente pela proporção entre o bloco hidrofílico e o hidrofóbico; uma arquitetura altamente assimétrica torna-se muito interessantes do ponto de vista da sua diversidade morfológica, quando em solução aquosa (YU & EISENBERG, 1996). Outros parâmetros como interação polímero-solvente, concentração inicial, presença de aditivos (HCl, NaOH, sal, etc.) podem interferir na forma e tamanho do agregado (YU & EISENBERG, 1996), portanto não é possível assumir uma delimitação exata entre a proporção dos blocos e a morfologia. De maneira geral, quando um dos blocos apresenta uma composição de aproximadamente 90% tem-se a formação de estruturas do tipo vesículas (CHOUCAIR et al., 2004), ou micelas do tipo *crew-cut* (ZHANG et al., 1997) (56).

Vários temas foram abordados sobre este sistema, construção de diagramas de fases (SHEN & EISENBERG, 2000), o grau de influencia dos parâmetros como conteúdo de água,

concentração inicial e composição do copolímero nas morfologias destes agregados (CHOUCAIR et al., 2003; LUO & EISENBERG, 2001), preparação e caracterização de agregados na presença de íons (ZHANG et al., 1997), entre outros.

De especial interesse são abordagens relacionadas a interações entre o bloco estabilizante PAA e outras macromoléculas (BURKE & EISENBERG, 2001), devido a capacidade de formar complexos através de interações eletrostáticas.

2.3.3. Interação entre partículas e polieletrólitos

A interação entre polímero e superfície é controlada por diversos fatores, como propriedades da superfície (natureza química, rugosidade, etc.), propriedades do polímero (estrutura química, massa molar e concentração), natureza do solvente e fatores externos como temperatura e força iônica. Para polieletrólitos, interações eletrostáticas, densidade de carga da superfície e do polieletrólito, pH ou força iônica da solução também devem ser considerados.

Para caracterizar a adsorção do polímero sobre a superfície é necessário por vezes determinar a natureza das interações, a constante de associação, a quantidade de polímero adsorvido, a conformação do polímero adsorvido na superfície. As interações entre polímero e superfície podem ser de diferentes origens dependendo da estrutura química das espécies interagindo no local (hidrofobicidade, ligações de hidrogênio) e de longo alcance (associações coulômbicas).

Quando um polieletrólito é adsorvido sobre a superfície da partícula, a estrutura da dupla camada elétrica é modificada, causando uma neutralização seguida de inversão de

carga. Esta inversão de carga tem sido evidenciada em lipossomas revestidos com polieletrólitos (CAMETTI, 2008; BORDI et al., 2008/2009).

A interação entre a quitosana e membranas lipídicas tem sido bastante investigada (QUEMENEUR et al., 2007/2008). Esta interação é governada principalmente por interações eletrostáticas entre os grupos fosfatos da fosfatidilcolina e os grupos amino ionizados da quitosana. Recentemente, uma contribuição adicional atribuída a interações do tipo ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas devido a estrutura química da quitosana tem sido proposta, justificada pela maior bioatividade da quitosana do que de outros polímeros (PAVINATTO et al., 2010).

A adsorção de quitosana sobre lipossomas pode induzir a alterações na organização da molécula, mudanças mecânicas, além de melhorar a eficiência de encapsulação (GUO et al., 2003) pelo decréscimo da permeabilidade através da membrana. Por suas características biocompatíveis e biodegradáveis, os lipossomas revestidos com quitosana podem ser considerados como uma nova alternativa em formulações farmacêuticas, sendo tipicamente proposto para aplicações orais (THONGBORISUTE et al., 2006), ocular (ZHANG & WANG, 2009), ou cutânea (PERUGINI et al., 2000).

Em vesículas poliméricas a interação entre blocos polieletrólitos e moléculas de carga oposta também tem sido investigadas (LYSENKO et al., 1998).

2.3.4. Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo pseudo-natural obtido pela desacetilação da quitina, um polímero abundantemente encontrado na natureza, extraído principalmente das

carapaças de crustáceos (KAS, 1997). É um copolímero randômico linear de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, solúvel em soluções ácidas (pH < 6,5) devido a protonação dos grupos NH₂ (SINHA et al., 2004).

Graças a características singulares como biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade e por exibir excelentes propriedades antimicrobianas (KONG et al., 2010), a quitosana é considerada extremamente versátil em aplicações biomédicas (JAYAKUMAR et al., 2010; DASH et al., 2011), como também em aplicações em diferentes áreas de pesquisa (KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006).

Em sistemas de liberação controlada, a literatura tem constantemente enfatizado as vantagens da utilização deste polissacarídeo como matriz de liberação e vetorização de princípios ativos (AGNIHOTRI et al., 2004; PARK et al., 2010).

A quitosana, bem como seus derivados, tem sido também utilizada com sucesso como um agente promotor em sistemas de liberação transdérmica. Por exemplo, HE et al. (2008), investigaram a liberação transdérmica do hormônio testosterona a partir de diferentes formulações em gel da n-trimetil quitosana, mostrando que a utilização da quitosana modificada promoveu uma melhora na permeação transcutânea do fármaco a partir de estudos *in vitro* e *in vivo*. Posteriormente o mecanismo da quitosana e seus derivados utilizados como promotores de penetração transdérmica também foram estudados (HE et al., 2009).

Recentemente, nanopartículas de lecitina e quitosana encapsuladas com clobetasol-17-propionato, mostraram uma maior acumulação do princípio ativo na epiderme, que é o sítio alvo para o tratamento tópico deste fármaco, reduzindo assim taxa risco/benefício (ŞENYIĞİT, et al., 2010). A quitosana tem também sido combinada a lipossomas para

melhorar tanto a estabilidade físico-química destes sistemas carreadores, quanto para melhorar a permeação de fármacos através da pele (HASANOVIC et al., 2010), principalmente devido a sua carga positiva.

A quitosana é, portanto, considerada um excelente promotor de liberação transdérmica de princípios ativos (SAPRA et al., 2008).

2.3.5. Permeação cutânea

A permeação cutânea pode ser avaliada *in vitro* utilizando vários tipos de pele (peles humanas, de animais, ou com um produto chamado Living Skin Equivalent (LSE), desenvolvido como uma alternativa para estudos de absorção dérmica) em células de difusão, que são empregados para verificar a taxa de liberação *in vitro* de fármacos a partir de formulações tópicas, onde pele ou membranas sintéticas podem ser empregadas como barreiras ao fluxo do fármaco e do veículo (ALLEN JR et al., 2007).

A pele é composta do extrato córneo (a camada mais externa), epiderme e derme, que juntos constituem uma barreira à penetração de agentes externos, devido a sua elevada organização estrutural e hidrofobicidade (Figura 2.6). O extrato córneo é composto de aproximadamente 40% de proteína, principalmente queratina, e 40% de água, com caráter lipídico, pela presença de ácidos graxos, triglicerídeos e fosfolipídios (ALLEN JR et al., 2007; FOLDVARI, 2000; MENON, 2002).

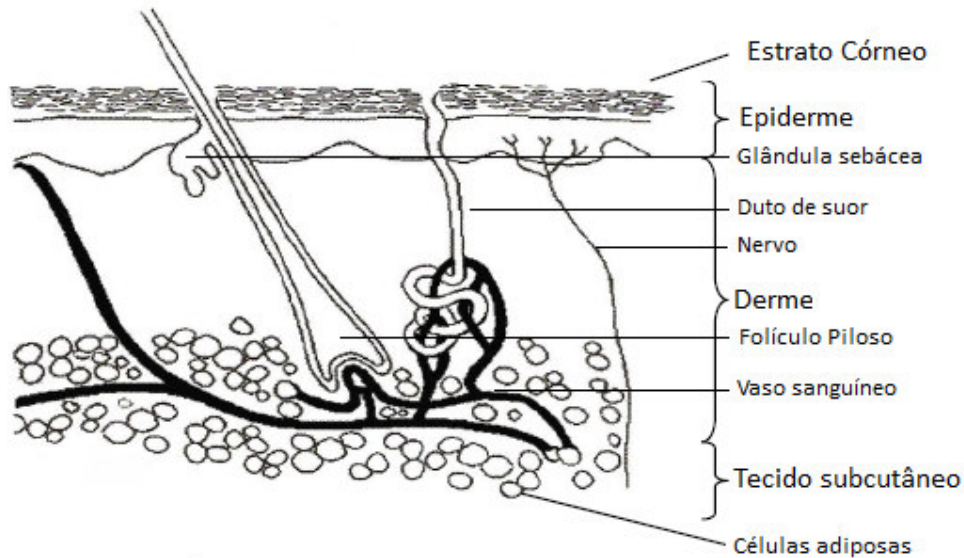


Figura 2.7. Diagrama representativo da sessão transversal da pele (SONGKRO, 2009).

A absorção cutânea descreve globalmente o transporte de moléculas da superfície externa da epiderme para a circulação sistêmica, e é dividida em três etapas: a fase de penetração, a fase de difusão e a fase de absorção (W.H.O., 2006). Na primeira etapa, a molécula se fixa em função da sua afinidade ao filme lipoproteico na superfície do estrato córneo, em seguida ele penetra a barreira semipermeável em função das suas características físico-químicas e de fatores fisiológicos. Na segunda parte, a molécula se difunde através de diferentes camadas da pele desde a região mais concentrada (estrato córneo) em direção a uma região menos concentrada (camada mais profunda da epiderme) seguindo a lei física de Fick. E finalmente, na terceira etapa, a molécula é absorvida nos diferentes tecidos vascularizados da derme e da hipoderme (W.H.O., 2006).

Existem vários fatores que podem influenciar diretamente sobre a absorção cutânea, uma das principais está ligada às características físico-químicas das moléculas, como

polaridade, grau de ionização e massa molar. Como o estrato córneo é uma barreira lipofílica e a derme a barreira hidrofílica, os compostos hidrofílicos tem mais dificuldades de se fixar na superfície e de penetrar no estrato córneo (ASBILL & MICHNIAK, 2000). As moléculas lipofílicas que passam mais facilmente através do estrato córneo difundem menos nas camadas mais profundas da epiderme e da derme. Em relação à massa molar, as moléculas menores penetram melhor através da pele, e a taxa de absorção diminui com o aumento da massa molar, porém, mesmo que estas moléculas de maior massa molar tenham maiores dificuldades em atravessar a via transdérmica, elas ainda têm a possibilidade de chegar até o sistema pilosebáceo (W.H.O., 2006).

O sistema de liberação transdérmica apresenta diversas vantagens em relação a outros sistemas convencionais, como evitar problemas relacionados à absorção gastrointestinal, pH, atividade enzimática e interações medicamentosas; evitam o efeito de primeira passagem pelo fígado; considerados não invasivos (ALLEN JR et al., 2007; PRAUSNITZ & LANGER 2008).

A permeabilidade e a permeação cutânea de fármacos tem sido objeto de estudo constante, com o objetivo de se estabelecer princípios básicos e aperfeiçoar a liberação transdérmica de fármacos. No campo de sistemas nanoparticulados para a liberação cutânea de fármacos, diferentes sistemas carreadores e materiais poliméricos são descritos na literatura: micro e nanopartículas (PROW et al., 2011), micro e nano-emulsões (HOELLER et al., 2009; WANG et al., 2009), vesículas não-iônicas (AZEEM et al., 2009), nanopartículas lipídicas sólidas (BRASKAR et al., 2009; MUNSTER et al., 2005), nanopartículas a base de quitosana (HASANOVIC et al., 2009), etc. Recentemente vesículas poliméricas também tem sido exploradas como veículo de liberação tópica. RASTOGI e colaboradores (2009)

investigaram a permeação de vesículas poliméricas de policaprolactona e polietilenoglicol, sugerindo que este sistema pode convenientemente ser utilizado como uma alternativa para lipossomas no tratamento de carcinomas.

O emprego de vesículas poliméricas para a permeação e liberação de fármacos por via tópica apresenta, portanto, vantagens quando comparado a veículos de liberação como nanopartículas lipídicas solidas e lipossomas, como estabilidade e capacidade de encapsular moléculas de diferentes polaridades, além de dimensões que podem ser ajustáveis de acordo com as características inerentes de cada segmento do copolímero em bloco e de protocolos experimentais.

2.3.6. Finasterida

Poucos estudos têm reportado o processo de liberação cutânea do fármaco finasterida. A Finasterida é um 4-azasteróide, análogo à testosterona que bloqueia a conversão de testosterona (T) em diidrotestosterona (DHT) causando uma significativa diminuição do nível de DHT no couro cabeludo e no sangue. Sob a ação de uma enzima, a *5-alfarredutase* (que está presente em maior concentração em torno dos folículos capilares), a T transforma-se em DHT, hormônio responsável pelo afinamento dos cabelos e diminuição progressiva dos folículos até a sua atrofia (KRAUSE & FOITZIK, 2006), o medicamento atua como inibidor competitivo e específico da enzima 5-alfarredutase do tipo II (Figura 2.7), impedindo a atrofia dos folículos capilares e ajuda na restauração dos folículos já atrofiados (BULL et al., 1996; FALLER et al., 1993; SAWAYA, 1998; TRÜEB, 2004).

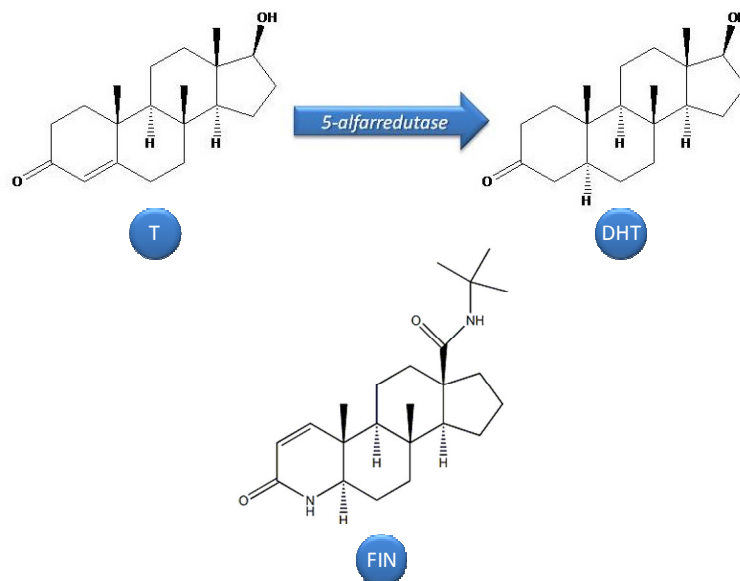


Figura 2.8. A enzima 5-*alfarredutase* transforma a testosterona (T) em diidrotestosterona (DHT). A Finasterida (FIN) age como inibidor competitivo da enzima 5-*alfarredutase* evitando a formação de DHT, hormônio responsável pela atrofia dos folículos capilares.

Este medicamento foi primeiramente utilizado no tratamento de hiperplasia prostática benigna (em baixas doses) e em doses maiores (5 mg/dia) no tratamento do câncer de próstata. Após constatar-se que este medicamento era eficiente também para a redução da Alopecia Androgenética (calvície), a FDA (Food and Drug Administration), em 1997 aprovou a sua administração para o tratamento de calvície na dose de 1 mg/dia de finasterida para induzir o crescimento capilar em homens, após estudos clínicos que comprovaram a sua eficácia na dose oral (LIBECCO & BERGFELD, 2004).

A possibilidade de utilização deste medicamento por via tópica tem sido investigada por BIRUSS & VALENTA (2006) que demonstraram que a finasterida exibe uma boa difusão, em estudos que investigaram a permeação cutânea de diferentes hormônios a partir de

formulações de lipossomas revestidos com polímeros. A permeação da finasterida em estudos *in vivo* e *in vitro* foi também investigada utilizando lipossomas e niossomas como veículo para a liberação da finasterida, demonstrando um significativo aumento no efeito de retenção na permeação do fármaco, comparado à solução hidroalcoólica, mostrando o potencial destes sistemas como veículo de liberação transdérmica (TABBAKHIAN et al., 2006). Em outro trabalho, a habilidade de formulações tópicas de finasterida também foram testadas (SINTOV et al., 2000), demonstrando um melhor efeito comparado à solução hidroalcoólica, sugerindo que a formulação tópica pode resultar efetivamente em uma regressão da perda de cabelo masculina. Estes resultados, portanto, serviram de motivação para a utilização de vesículas poliméricas como um sistema de liberação transdérmica deste medicamento.

2.4. Referências

- ABETZ, V.; SIMON, P. F. W. Phase Behaviour and Morphologies of Block Copolymers. **Advances in Polymer Science**, v. 189, p. 125–212, 2005.
- AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, p. 5–28, 2004.
- AHMED, F.; DISCHER, D. E. Self-porating polymersomes of PEG–PLA and PEG–PCL: hydrolysis-triggered controlled release vesicles. **Journal of Controlled Release**, v. 96, p. 37–53, 2004.
- AHMED, F.; PAKUNLU, R. I.; BRANNAN, A.; BATES, F.; MINKO, T.; DISCHER, D. E.; Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug. **Journal of Controlled Release**, v. 116, p. 150–158, 2006.
- ALLEN, C.; MAYSINGER, D.; EISENBERG, A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 16, p. 3–27, 1999.
- ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. V.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**, Porto Alegre: Artmed, p. 325–340, 2007.
- ALMDAL, K.; KOPPI, K. A.; BATES, F. S.; MORTENSEN, K. Multiple ordered phases in a block copolymer melt. **Macromolecules**, v. 25, p. 1743–1751, 1992.
- ASBILL, C. S.; MICHNIAK, B. B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. **PSTT**, v. 3, p. 36–41, 2000.
- ASTAFIEVA, I.; Zhong, X. F.; Eisenberg, A. Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions. **Macromolecules**, v. 26, p. 7339–7352, 1993.
- AZEEM, A.; AHMAD, F. J.; TALEGAONKAR, S. Exploration of skin permeation mechanism of frusemide with proniosomes. **Pharmazie**, v. 64, p. 735–740, 2009.
- BATES, F. S.; FREDRICKSON, G. H. Block copolymer thermodynamics: Theory and Experiment. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 41, p. 525–527, 1990.
- BATES, F. S.; FREDRICKSON, G. H. Block copolymers-Designer soft materials. **Physics Today**, v. 52, p. 32–38, 1999.
- BHASKAR, K.; MOHAN, C. K.; LINGAM, M.; MOHAN, S. J.; VENKATESWARLU, V.; RAO, Y. M.; ANBU, J.; RAVICHANDRAN, V. Development of SLN and NLC enriched hydrogels for transdermal delivery of nitrendipine: in vitro and in vivo characteristics. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, p. 98–113, 2009.

BI, H.; ZHONG, W.; MENG, S.; KONG, J.; YANG, P.; LIU, B. Construction of a Biomimetic Surface on Microfluidic Chips for Biofouling Resistance. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 3399-3405, 2006.

BIRUSS, B.; VALENTA, C. Skin permeation of different steroid hormones from polymeric coated liposomal formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 62, p. 210–219, 2006.

BLACK, C. T.; GUARINI, K. W.; RUIZ, R.; SIKORSKI, E. M.; BABICH, I. V.; SANDSTROM, R. L.; ZHANG, Y. Polymer Self-Assembly in semiconductor microelectronics. **IBM Journal of Research and Development**, v. 51, p. 605-633, 2007.

BORDI, F.; CAMETTI, C.; MARIANECCI, C.; SENNATO, S. Equilibrium particle aggregates in attractive colloidal Suspensions. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 17, p. S3423–S3432, 2005.

BORDI, F.; SENNATO, S.; TRUZZOLILLO, D. Polyelectrolyte-induced aggregation of liposomes: a new cluster phase with interesting applications. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 21, p. 203102-203128, 2009.

BULL, H.; GARCIA-CALVO, M.; ANDERSSON, S.; BAGINSKY, W. F.; CHAN, H. K.; ELLSWORTH, D. E.; MILLER, R. R.; STEARNS, R. A.; BAKSHI, R. K.; RASMUSSEN, G. H.; TOLMAN, R. L.; MYERS, R. W.; KOZARICH, J. W.; HARRIS, G. S. Mechanism-Based Inhibition of Human Steroid 5 α -Reductase by Finasteride: Enzyme-Catalyzed Formation of NADP-Dihydrofinasteride, a Potent Bisubstrate Analog Inhibitor. **Journal of American Chemical Society**, v. 118, p. 2359-2365, 1996.

BURKE S. E.; EISENBERG, A. Effect of Sodium Dodecyl Sulfate on the Morphology of Polystyrene-*b*-Poly(acrylic acid) Aggregates in Dioxane-Water Mixtures. **Langmuir**, v. 17, p. 8341-8347, 2001.

BURKE S. E.; EISENBERG, A. Kinetics and Mechanisms of the Sphere-to-Rod and Rod-to-Sphere Transitions in the Ternary System PS310-*b*-PAA52/Dioxane/Water. **Langmuir**, v. 17, p. 6705-6714, 2001.

CAMERON, N. S.; CORBIERRE, M. K.; EISENBERG, A. 1998 E.W.R. Steacie Award Lecture Asymmetric amphiphilic block copolymers in solution: a morphological wonderland. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 77, p. 1311–1326, 1999.

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.

CHAN, S-C.; KUO, S-W.; LEE, H-F.; CHANG, F-C. Synthesis and characterizations of the multiple morphologies formed by the self-assemble of the semicrystalline P4VP-*b*-PCL diblock copolymers. **Polymer**, v. 48, p. 5059-5068, 2007.

CHEN, W.; MENG, F.; CHENG, R.; ZHONG, Z. pH-Sensitive degradable polymersomes for triggered release of anticancer drugs: A comparative study with micelles. **Journal of Controlled Release**, v. 142, p. 40-46, 2010.

CHEN, Q.; DE GROOT, G. W.; SCHÖNHERR, H.; VANCISO, G. J. Patterns of surface immobilized block copolymer vesicle nanoreactors. **European Polymer Journal**, v. 47, p. 130–13, 2011.

CHOUCAIR, A. A.; KYCIA, A. H.; EISENBERG, A. Kinetics of Fusion of Polystyrene-b-poly(acrylic acid) Vesicles in Solution. **Langmuir**, v. 19, p. 1001-1008, 2003.

CHOUCAIR, A. A.; LAVIGUEUR, C.; EISENBERG, A. Polystyrene-b-poly(acrylic acid) Vesicle Size Control Using Solution Properties and Hydrophilic Block Length. **Langmuir**, v. 20, p. 3894-3900, 2004.

DASH, M.; CHIellini, F.; OTTENBRITE, R.M.; CHIellini, E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, 2011.

DISCHER, B. M.; WON, Y.-Y.; EGE, D. S.; LEE, J. C.-M.; BATES, F. S.; DISCHER, D. E.; HAMMER, D. A. Polymersomes: Tough Vesicles Made from Diblock Copolymers. **Science**, v. 284, p. 1143-1146, 1999.

DISCHER, D. E.; EISENBERG, A. Polymer Vesicles. **Science**, v. 297, p. 967-973, 2002.

DISCHER, D. E.; ORTIZ, V.; SRINIVAS, G.; KLEIN, M. L.; KIM, Y.; CHRISTIAN, D.; CAI, S.; PHOTOS, P.; AHMED, F. Emerging applications of polymersomes in delivery: From molecular dynamics to shrinkage of tumors. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 838-857, 2007.

DU, J.; TANG, Y.; LEWIS, A.; ARMES, S. P. pH-Sensitive Vesicles Based on a Biocompatible Zwitterionic Diblock Copolymer. **Journal of American Chemical Society**, v. 127, p. 17982-17983, 2005.

DU, J.; O'REILLY, R. K. Advances and challenges in smart and functional polymer vesicles. **Soft Matter**, v. 5, p. 3544–3561, 2009.

FALLER, B.; FARLEY, D.; NICK, H. Finasteride: A Slow-Binding 5 α -Reductase Inhibitor. **Biochemistry**, v. 32, p. 5705-5710, 1993.

FARRELL, R. A.; FITZGERALD, T. G.; BORAH, D.; HOLMES, J. D.; MORRIS, M. A. Chemical Interactions and Their Role in the Microphase Separation of Block Copolymer Thin Films. **International Journal of Molecular Science**, v. 10, p. 3671-3712, 2009.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, p. 417-425, 2000.

GIACOMELLI, C.; LE MEN, L.; BORSALI, R.; LAI-KEE-HIM, J.; BRISSON, A.; ARMES, S. P.; LEWIS, A. L. 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.

FÖRSTER, S.; PLANTENBERG, T. From self-organizing polymers to nanohybrid and biomaterials. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, v. 41, p. 689-714, 2002.

GIACOMELLI, C.; SCHMIDT, V.; BORSALI, R. Specific interactions improve the loading capacity of block copolymer micelles in aqueous media. *Langmuir*, v. 23, p. 6947-6955, 2007.

GLEITER, H. Nanostructured Materials: Stat of the art and perspectives. **Nanostructured Materials**, v. 6, p. 3-14, 1995.

GUO, J.; PING, Q.; JIANG, G.; HUANGA, L.; AND TONGA, Y. Chitosan coated liposomes: characterization and interaction with leuprolide. **International Journal of Pharmacy**, v. 260, p. 167-173, 2003.

HAMLEY, I. W. Nanotechnology with Soft Materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, p. 1692 –1712, 2003.

HAMLEY, I. W. Nanostructure fabrication using block copolymers. **Nanotechnology**, v. 14, p. R39–R54, 2003.

HASANOVIC, A.; ZEHL, M.; REZNICEK, G.; VALENTA, C. Chitosan-tripolyphosphate nanoparticles as a possible skin drug delivery system for aciclovir with enhanced stability. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p. 1609–1616, 2009.

HASANOVIC, A.; HOLLICK, C.; FISCHINGER, K.; VALENTA, C. Improvement in physicochemical parameters of DPPC liposomes and increase in skin permeation of aciclovir and minoxidil by the addition of cationic polymers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, p. 148–153, 2010.

HE, W. GUO, X.; ZHANG, M. Transdermal permeation enhancement of N-trimethyl chitosan for testosterone. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, p. 82–87, 2008.

HE, W.; GUO, X.; XIAO, L.; FENG, M. Study on the mechanisms of chitosan and its derivatives used as transdermal penetration enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 382, p. 234–243, 2009.

HOELLER, S.; SPERGER, A.; VALENTA, C. Lecithin based nanoemulsions: a comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 370, p. 181–186, 2009.

HUGHES, G. A. Nanostructure-mediated drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 1, p. 22 – 30, 2005.

JAYAKUMAR, R.; MENON, D.; MANZOOR, K.; NAIR, S. V.; TAMURA, H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 227–232, 2010.

KAS, H. S. Chitosan: Properties, preparations and application to microparticulate systems. **Journal of Microencapsulation**, v.14, p.689-711, 1997.

KATAOKA, K.; HARADA, A.; NAGASAKI, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 113-131, 2001.

KHANDPUR, A. K.; FORSTER, S.; BATES, F.S. Polyisoprene-Polystyrene Diblock Copolymer Phase Diagram near the Order-Disorder Transition. **Macromolecules**, v. 28, p. 8796-8806, 1995.

KLOK, H-A.; LECOMMANDOUX, S. Supramolecular Materials via Block Copolymer Self-Assembly. **Advanced Materials**, v. 13, p. 1217-1229, 2001.

KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 51-56, 2010.

KRAUSE, K.; FOITZIK, K. Biology of the Hair Follicle: The Basics. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 25, p. 2-10, 2006.

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

KUO, S. W. Hydrogen bond-mediated self-assembly and supramolecular structures of diblock copolymer mixtures. **Polymer International**, v. 58, p. 455-464, 2009.

LEE, J. S.; ZHOU, W.; MENG, F.; ZHANG, D.; OTTO, C.; FEIJEN, J. Thermosensitive hydrogel-containing polymersomes for controlled drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 46, p. 400-408, 2010.

LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticles structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, p. 259-269, 2007.

LEVINE, D. H.; GHOROGHCHIAN, P. P.; FREUDENBERG, J.; ZHANG, G.; THERIEN, M. J.; GREENE, M. I.; HAMMER, D. A.; MURALI, R. Polymersomes: A new multi-functional tool for cancer diagnosis and therapy. **Methods**, v. 46, p. 25-32, 2008.

LIBECCO, J. F.; BERGFELD, W. F. Finasteride in the treatment of alopecia. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 5, p. 933-940, 2004.

LOMAS, H.; CANTON, I.; MACNEIL, S.; DU, J.; ARMES, S. P.; RYAN, A. J.; LEWIS, A. L.; BATTAGLIA, G. Biomimetic pH sensitive polymersomes for efficient DNA encapsulation and delivery. **Advanced Materials**, v. 19, p. 4238-4243, 2007.

LOMAS, H.; DU, J. Z.; CANTON, I.; MADSEN, J.; WARREN, N.; ARMES, S. P.; LEWIS, A. L.; BATTAGLIA, G. Efficient Encapsulation of Plasmid DNA in pH-Sensitive PMPC-PDPA Polymersomes: Study of the Effect of PDPA Block Length on Copolymer-DNA Binding Affinity. **Macromolecular Bioscience**, v. 10, p. 513-530, 2010.

LYSENKO, E. A.; BRONICH, T. K.; EISENBERG, A.; KABANOV, V. A.; KABANOV, A. V. Block Ionomer Complexes from Polystyrene-block-polyacrylate Anions and N-Cetylpyridinium Cations. **Macromolecules**, v. 31, p. 4511-4515, 1998.

MANSKY, P.; CHAIKIN, P.; THOMAS, L. Monolayer films of Diblock Copolymer Microdomains for Nanolithographic Applications. **Journal of Materials Science**, v. 30, p. 1987-1992, 1995.

LUO, L. ; EISENBERG, A. Thermodynamic Size Control of Block Copolymer Vesicles in Solution. **Langmuir**, v. 17, p. 6804-6811, 2001.

MA, L.; EISENBERG, A. Relationship between Wall Thickness and Size in Block Copolymer Vesicles. **Langmuir**, v. 25, p. 13730–13736, 2009.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S3–S17, 2002.

MOFFITT, M.; KHOUGAZ, K.; EISENBERG, A. Micellization of Ionic Block Copolymers. **Accounts of Chemical Research**, v. 29, p. 95-102., 1996.

MUELLER, W.; KOYNOV, K.; PIERRAT, S.; THIERMANN, R.; FISCHER, K.; MASKOS, M. pH - change protective PB-b-PEO polymersomes. **Polymer**, v. 52, p. 1263-1267, 2011.

MUNSTER, U.; NAKAMURA, C.; HABERLAND, A.; JORES, K.; MEHNERT, W.; RUMMEL, S.; SCHALLER, M.; KORTING, H. C.; CH, C. Z.; BLUME-PEYTAVI, U.; SCHÄFER-KORTING, M.; RU 58841-myristate—prodrug development for topical treatment of acne and androgenetic alopecia, **Pharmazie**, v. 60, p. 8–12, 2005.

PARK, M.; HARRISON, C.; CHAIKIN, P. M.; REGISTER, R. A.; ADAMSON, D. H. Block copolymer Lithography: Periodic Arrays of $\sim 10^{11}$ Holes in 1 square Centimeter. **Science**, v. 276, p. 1401-1404, 1997.

PARK, S.; LEE, D. H.; XU, J.; KIM, B.; HONG, S. W.; JEONG, U.; XU, T.; RUSSELL, T. P. Macroscopic 10-terebit-per-square-inch arrays from block copolymers with lateral order. **Science**, v. 323, p. 1030-1033, 2009.

PARK, J. H.; SARAVANAKUMAR, G.; KIM, K.; KWON, I. C. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, p. 28–41, 2010.

PAVINATTO, A.; PAVINATTO, F. J.; BARROS-TIMMONS, A.; OLIVEIRA JR, O. N. Electrostatic interactions are not sufficient to account for chitosan bioactivity. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 2, p. 246-251, 2010.

PERUGINI, P.; GENTA, I.; PAVANETTO, F.; CONTI, B.; SCALIA, S.; BARUFFNI, A. Study on glycolic acid delivery by liposomes and microspheres. **International Journal of Pharmacy**, v. 196, p. 51-61, 2000.

PROW, T. W.; GRICE, J. E.; LIN, L. L.; FAYE, R.; BUTLER, M.; BECKER, W.; WURM, E. M.T.; YOONG, C.; ROBERTSON, T. A.; SOYER, H. P.; ROBERTS, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2011.

PRAUSNITZ, M. R.; LANGER, R. Transdermal drug delivery. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 1261-1268, 2008.

QUEMENEUR, F.; RAMMAL, A.; RINAUDO, M.; PEPIN-DONAT, B. Large and Giant Vesicles “Decorated” with Chitosan: Effects of pH, Salt or Glucose Stress, and Surface Adhesion. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 2512-2519, 2007.

QUEMENEUR, F.; RAMMAL, A.; RINAUDO, M.; PEPIN-DONAT, B. Influence of Molecular Weight and pH on Adsorption of Chitosan at the Surface of Large and Giant Vesicles. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 396-402, 2008.

RIJCKEN, C. J. F.; SOGA, O.; HENNINK, W. E.; VAN NOSTRUM, C. F. Triggered destabilisation of polymeric micelles and vesicles by changing polymers polarity: An attractive tool for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 120, p. 131-148, 2007.

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

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, J.; CHÉCOT, F.; GNANOU, Y.; LECOMMANDOUX, S. Towards “smart” nano-objects by self assembly of block copolymers in solution. **Progress in Polymer Science**, v. 30, p. 691-724, 2005.

SANSON, C.; SCHATZ, C.; LE MEINS, J.-F.; SOUM, A.; THEVENOT, J.; GARANGER, E.; LECOMMANDOUX, S. A simple method to achieve high doxorubicin loading in biodegradable polymersomes. **Journal of Controlled Release**, v. 147, p. 428-435, 2010.

SAPRA, B.; JAIN, S.; TIWARY, A. K. Transdermal Delivery of Carvedilol Containing Glycyrrhizin and Chitosan as Permeation Enhancers: Biochemical, Biophysical, Microscopic and Pharmacodynamic Evaluation. **Drug Delivery**, v. 15, p. 443-454, 2008.

SAWAYA, M. E. Novel Agents for the Treatment of Alopecia. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 17, p. 276-282, 1998.

SEGALMAN, R. A. Patterning with block copolymer thin films. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 48, p. 191-226, 2005.

ŞENYİĞİT, T.; SONVICO, F.; BARBIERI, S.; ÖZER, Ö.; SANTI, P.; COLOMBO, P. Lecithin/chitosan nanoparticles of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin. **Journal of Controlled Release**, v. 142, p. 368-373, 2010.

SHEN, H.; EISENBERG, A. Block Length Dependence of Morphological Phase Diagrams of the Ternary System of PS-b-PAA/Dioxane/H₂O. **Macromolecules**, v. 33, p. 2561-2572, 2000.

SHI, L.; ZHANG, W.; YIN, F.; AN, Y.; WANG, H.; GAO, L.; HE, B. Formation of flower-like aggregates from assembly of single polystyrene-b-poly(acrylic acid) micelles. **New Journal of Chemistry**, v. 28, p. 1038-1042, 2004.

SI, Z. H.; WANG, G. C.; LI, H. X.; YUAN, J. L.; HE, B. L. Studies on Micellization of a Polystyrene-b-poly(acrylic acid) Copolymer in Aqueous Media by Pyrene Fluorescence. **Chinese Chemical Letters**, v. 14, p. 39-41, 2003.

SINHA, V.R.; SINGLA, A.K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, p. 1-33, 2004.

SINTOV, A.; SERAFIMOVICH, S.; GILHAR, A. New topical antiandrogenic formulations can stimulate hair growth in human bald scalp grafted onto mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 194, p. 125-134, 2000.

SMART, T.; LOMAS, H.; MASSIGNANI, M.; FLORES-MERINO, M. V.; PEREZ, L. R.; BATTAGLIA, G. Block copolymer nanostructures. **Nanotoday**, v. 3, p. 38-46, 2008.

SONGKRO, S. An overview of skin penetration enhancers: penetration enhancing activity, skin irritation potential and mechanism of action. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 31, p. 299-321, 2009.

SOO, L. P.; EISENBERG, A. Preparation of Block Copolymer Vesicles in Solution. **Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics**, v. 42, p. 923-938, 2004.

STUART, M. A. C.; HOF, B.; VOETS, I. K.; KEIZER, A. Assembly of polyelectrolyte-containing block copolymers in aqueous media. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, p. 30-36, 2005.

TABBAKHIAN, M.; TAVAKOLI, N.; JAAFARI, M.R.; DANESHAMOUZ, S. Enhancement of follicular delivery of finasteride by liposomes and niosomes. 1. In vitro permeation and in vivo deposition studies using hamster flank and ear models. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 323, p. 1-10, 2006.

TAKTAK, F. F.; BUTUN, V. Synthesis and physical gels of pH- and thermo-responsive tertiary amine methacrylate based ABA triblock copolymers and drug release studies. **Polymer**, v. 51, p. 3618-3626, 2010.

THONGBORISUTE, J.; TAKEUCHI, H.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Visualization of the penetrative and mucoadhesive properties of chitosan and chitosan-coated liposomes through the rat intestine. **Journal of Liposome Research**, v. 16, p. 127-141, 2006.

TORCHILIN V. P. Micelar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. **Pharmaceutical Research**, v. 24, p. 1-16, 2007.

TRÜEB, R. M. Finasterid Treatment of Pattered Hair Loss in Normoandrogenic Postmenopausal Women. **Dermatology**, v. 209, p. 202-207, 2004.

van ZOELLEN, W.; TEN BRINKE, G. Thin films of complexed block copolymers. **Soft Matter**, v. 5, p. 1568-1582, 2009.

WANG, J. J.; LIU, K. S.; SUNG, K. C.; TSAI, C. Y.; FANG, J. Y. Skin permeation of buprenorphine and its ester prodrugs from lipid nanoparticles: lipid emulsion, nanostructured lipid carriers and solid lipid nanoparticles, *Journal of Microencapsulation*, p. 1–14, 2009.

W.H.O. - World Health Organization. **Environmental Health Criteria 235: Dermal Absorption**, 2006. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc235.pdf>

XU, J.-P.; JI, J.; CHEN, W.-D.; SHEN, J.-C. Novel biomimetic polymersomes as polymer therapeutics for drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 107, p. 502-512, 2005.

YANG, S. Y.; RYU, I.; KIM, H. Y.; KIM, J. K.; JANG, S. K.; RUSSELL, T. P. Nanoporous membranes with ultrahigh selectivity and flux for the filtration of viruses. **Advanced Materials**, v.18, p. 709-712, 2006.

YU, K.; ZHANG, L.; EISENBERG, A. Novel Morphologies of “Crew-Cut” Aggregates of Amphiphilic Diblock Copolymers in Dilute Solution. **Langmuir**, v. 12, p. 5980-5984, 1996.

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

ZHANG, L.; EISENBERG, A. Multiple Morphologies and Characteristics of “Crew-Cut” Micelle-like Aggregates of Polystyrene-b-poly(acrylic acid) Diblock Copolymers in Aqueous Solutions. **Journal of American Chemical Society**, v. 118, p. 3168-3181, 1996.

ZHANG, L.; SHEN, H.; EISENBERG, A. Phase Separation Behavior and Crew-Cut Micelle Formation of Polystyrene-b-poly(acrylic acid) Copolymers in Solutions. **Macromolecules**, v. 30, p. 1001-1011, 1997.

ZHANG, J.; WANG, S. Topical use of coenzyme Q(10)-loaded liposomes coated with trimethylchitosan: Tolerance, precorneal retention and anti-cataract effect. **International Journal of Pharmacy**, v. 372, p. 66-75, 2009.

CAPÍTULO 3

FILMES NANOESTRUTURADOS A BASE DE PMPC-*b*-PDPA

CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES

Este capítulo é destinado ao estudo da preparação e caracterização estrutural e morfológica de filmes finos obtidos pelo processo auto-associativo do copolímero em bloco poli[(2-metacrilóiloxi) etilfosforilcolina]-*b*-poli[(2-diisopropilamino) metacrilato de etila] (PMPC-*b*-PDPA). Estruturas com alto grau de organização foram obtidas pela primeira vez para este sistema e caracterizadas pelas técnicas de espalhamento de raios-X a baixos ângulos, microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia eletrônica de varredura no modo transmissão (STEM). Destacam-se as diferentes morfologias que podem ser obtidas pela variação de parâmetros como solvente empregado na preparação dos filmes, e pela variação da temperatura durante o tratamento térmico empregado.

Publicação: *Nanostructured films made from zwitterionic phosphorylcholine diblock copolymer systems. Macromolecules, 2011.*

3.1. Materiais

O copolímero dibloco poli[(2-metacrilóiloxi) etilfosforilcolina]-*b*-poli[(2-diisopropilamino) metacrilato de etila] PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀ (onde os subscritos referem-se ao grau médio de polimerização de cada bloco) ($M_n = 21000$ g/mol, $M_w/M_n = 1,27$; fração em volume do DPA = 0,57) foi sintetizado por adição seqüencial de monômeros via ATRP como previamente descrito na literatura (MA et al., 2003).

3.2. Metodologia

3.2.1. Preparação dos filmes

Os filmes do copolímero dibloco PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀ foram preparados pelo método *casting* a partir de soluções a 10% (m/v) em etanol, metanol e a partir de uma solução aquosa ácida (pH 4). Este método consiste da dissolução do copolímero em um solvente, seguido da lenta evaporação sobre um substrato. As soluções do copolímero foram inicialmente agitadas durante 24 horas ou até completa solubilização e posteriormente procedeu-se a lenta evaporação do solvente a temperatura ambiente. Após completa remoção do solvente, as amostras foram deixadas em estufa à vácuo sob aquecimento na faixa de 25 à 170°C para posterior caracterização.

3.2.2. Caracterização morfológica

A microscopia eletrônica em transmissão (TEM) é muito utilizada para observar a microestrutura de materiais em escala nanométrica, e consiste no bombardeamento de uma

porção ultrafina do material com um feixe de elétrons de alta tensão. A espessura da amostra deve ser bastante fina para que o feixe a atravesse sem haver muita absorção. Para amostras poliméricas a principal técnica utilizada é a ultramicrotomia, que permite a obtenção de seções ultrafinas, na faixa de 50-100 nm. Para as medidas de TEM, um pequeno pedaço do filme previamente preparado foi mergulhado em uma resina epóxi em um molde, que foi então curado por 72 h a 60°C para permitir a polimerização da resina. As resinas tiveram as suas superfícies previamente preparadas e lapidadas com o auxílio de uma lâmina. Seções ultrafinas dos filmes com espessuras na ordem de 70 nm foram obtidas utilizando um ultramicrotomo UC6 Leica utilizando uma lâmina de diamante, que garante alta precisão e qualidade nos cortes a temperatura ambiente. As seções ultrafinas dos filmes, recém cortadas foram depositadas em um recipiente contendo água milli-Q sendo cuidadosamente coletadas e depositadas em grades de cobre previamente recobertas com uma fina camada de carbono. Os experimentos foram conduzidos em um microscópio eletrônico de transmissão CM200 Philips com uma voltagem de aceleração de 80 kV. Todas as amostras foram captadas em filmes fotográficos Kodak SO163, reveladas e digitalizadas com a ajuda de uma câmera Kodak Megaplug e do software Analysis 3.2. Utilizou-se também um microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo Zeiss ultra 55 FEG operando a uma voltagem de aceleração de 10 kV usando um detector no modo STEM para uma melhor visualização dos detalhes estruturais.

3.2.3. Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)

Para a determinação das nanoestruturas do copolímero no estado ordenado, foi utilizada a técnica de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS). Através desta técnica

é possível registrar a contribuição de todos os centros espalhadores em função do vetor de espalhamento q , que é definido como: $q = (4\pi \sin \theta)/\lambda$, onde λ é o comprimento de onda incidente, o qual foi de 1,488 Å, e 2θ o ângulo de espalhamento.

Os experimentos foram realizados na linha BM02 do European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France) (NARAYANAN et al., 2001) bem como na linha D11A-SAXS do laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, SP, Brazil). No ESRF, os filmes do copolímero foram colocados em capilares cilíndricos de vidro de 1,5 mm de diâmetro interno, e as medidas foram conduzidas a uma energia incidente de 16 keV e as intensidades de espalhamento foram registradas a uma distância de 1,6 metros usando um detector CCD bidimensional com uma área ativa de 44 cm² (Ropper Scientific). No LNLS, as medidas foram realizadas a 8,6 keV e as intensidades de espalhamento foram registradas utilizando um detector CCD Mar bidimensional com uma área ativa de 16 cm² (Rayonix) a uma distância de 1,6 metros. Dependendo da linha utilizada uma integração azimutal foi feita utilizando o software FIT2D (HAMMERSLEY, 1997) ou com o software Bm2img desenvolvido na linha BM02 (SIMON et al., 1997). Os dados de SAXS coletados foram corrigidos e normalizados levando-se em conta o decréscimo da intensidade do feixe de raios X durante a análise.

3.3. Resultados e Discussão

O copolímero dibloco PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀ ($M_n = 21000$ g/mol, $M_w/M_n = 1,27$) utilizado neste estudo está representado na Figura 3.1. As frações relativas em volume, f , dos dois blocos individuais foram estimadas em 0,43 e 0,57 para os blocos PMPC ($d = 1,30$ g.cm⁻³) (IWATA et al., 2004) e PDPA ($d = 1,33$ g.cm⁻³) (HUA & RUCKENSTEIN, 2003), respectivamente.

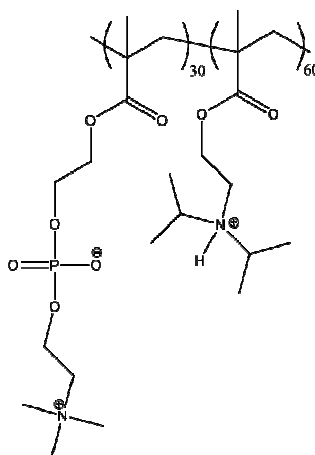


Figura 3.1. Representação esquemática do copolímero em bloco poli[(2-metacrilóiloxi)etilfosforilcolina]-*b*-poli[(2-diisopropilamino) metacrilato de etila] (PMPC-*b*-PDPA).

Imagens de TEM a alta e baixa magnificação para os filmes finos de PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀ submetidos à temperatura de 170 °C durante 24 horas são mostradas na Figura 3.2. O processo térmico é utilizado com o intuito de remover o solvente residual e minimizar os possíveis efeitos de não equilíbrio induzidos pela superfície do substrato, aumentando assim a probabilidade de se alcançar morfologias em equilíbrio termodinâmico. A temperatura deve estar acima da temperatura de transição vítrea do material. Neste caso específico, os melhores resultados foram obtidos para a temperatura de 170°C. As imagens de TEM foram realizadas sem a necessidade de utilizar um agente de coloração. Conseqüentemente, o contraste de densidade eletrônica intrínseco do PMPC-*b*-PDPA devido aos átomos de fósforo nas cadeias do PMPC produz domínios mais escuros de PMPC e domínios mais claros das cadeias do PDPA. A micrografia na Figura 3.1 exibe uma excepcional região livre de defeitos (mais do que 4.5 x 4.0 μm²) onde nanodomínios ricos em PMPC alternados a domínios ricos em PDPA são observados.

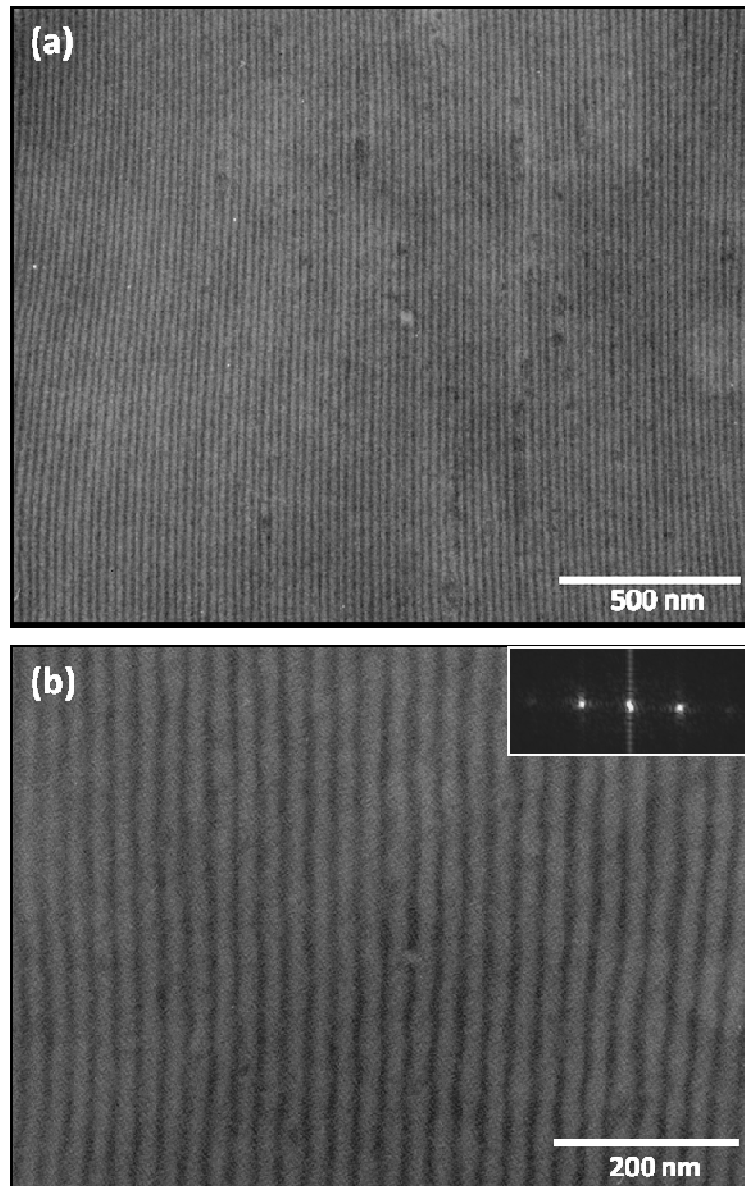


Figura 3.2. (a) e (b) Micrografias de TEM das seções dos filmes finos do copolímero PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀ preparados a partir de etanol e submetidos a 170°C durante 24h produzindo padrões altamente organizados. O detalhe em (b) mostra a correspondente Transformada Rápida de Fourier da imagem de maior magnificação com dois picos de Bragg decorrentes da ordem de longo alcance. As regiões mais escuras correspondem aos domínios de PDPA, de densidade eletrônica maior.

O alto grau de organização a uma ampla extensão, que é normalmente considerado essencial para a maioria das aplicações (SEGALMAN, 2005) é claramente evidente nesta amostra. A Figura 3.2(b) mostra uma imagem de TEM cujos padrões de linhas observados na figura 3.2(a) são observados a uma maior magnificação. A periodicidade média no plano a uma ampla extensão é confirmada por uma análise de Transformada Rápida de Fourier (FFT) associada à imagem (detalhe) em que dois principais picos de Bragg são claramente evidentes. A posição destes pontos está relacionada com o valor do espaçamento, por consequência, a partir deste FFT, um domínio com espaços de distância $d = 33,9$ nm foi extraído. Este espaçamento entre domínios corresponde grosseiramente a uma configuração de completo estiramento das cadeias poliméricas. Os filmes do copolímero em bloco preparados neste estudo também foram investigados utilizando um microscópio eletrônico de varredura no modo transmissão (STEM). Diferentemente das micrografias obtidas por TEM a imagem obtida por STEM na Figura 3.3 revela a coexistência de duas fases distintas para as mesmas condições de tratamento térmico (24 horas a 170 °C). A presença de uma fase menos distribuída exibindo uma simetria hexagonal no filme (ver detalhe) induz a ondulações da interface PMPC/PDPA na fase dominante feita de cilindros orientados paralelamente ou de lamelas orientadas verticalmente.

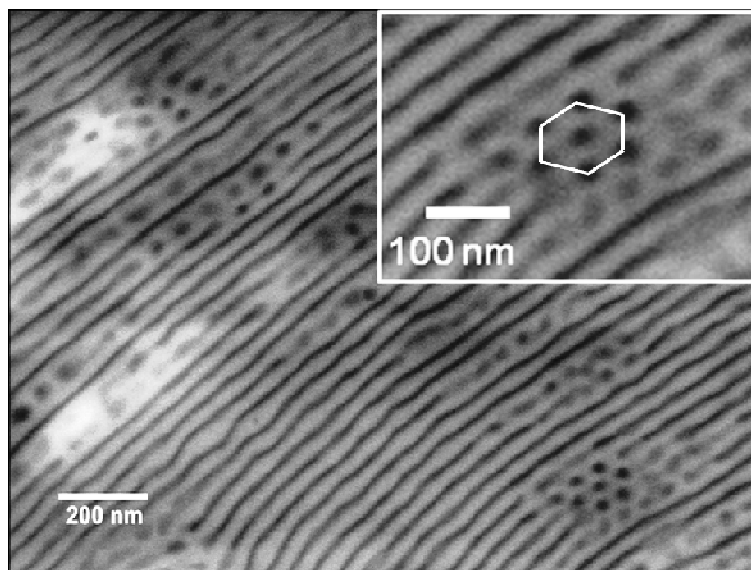


Figura 3.3. Micrografias de TEM das seções dos filmes finos do copolímero PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀ preparados a partir de etanol e submetidos a 170°C durante 24h em que a fase lamelar e hexagonal compacta co-existem. O detalhe a direita mostra em maior magnificação um arranjo hexagonal composto da fase minoritária.

Experimentos de espalhamento de raios-X a baixos ângulos também foram realizados para examinar as fases ordenadas originadas da auto-organização do copolímero dibloco a uma escala maior (100 x 100 μm^2) comparada com a técnica de microscopia. Esta técnica é bem estabelecida para o estudo da morfologia de multifases e está relacionada com a heterogeneidade na densidade eletrônica da amostra. Do ponto de vista cristalográfico, considera-se que o pico de espalhamento principal observado em espalhamento de raios X a um valor de q corresponde à difusão dos planos reticulares. A presença de um pico de correlação em q^* (pico de intensidade máxima) prova que existe uma estruturação. A forma das curvas de correlação e a distribuição dos picos nos fornecem informações a respeito da simetria de estruturação do copolímero. De maneira simplificada, para estruturas lamelares

a correlação entre os picos de espalhamento corresponde a números inteiros, ex: 1 : 2 : 3 : 4 : 5, para cilindros hexagonalmente empacotados a posição relativa dos picos é de 1 : $\sqrt{3}$: 2 : $\sqrt{7}$: 3, já para uma fase cúbica esta correlação é correspondente às posições 1 : $\sqrt{2}$: $\sqrt{3}$: 2 : $\sqrt{5}$.

Os perfis de SAXS obtidos a temperatura ambiente para os filmes do copolímero PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀ preparados a partir de uma solução em etanol e submetidos ou não ao tratamento térmico são mostrados na Figura 3.4. Para a amostra submetida à temperatura de 170 °C durante 24 horas, o perfil da curva de SAXS revela uma mistura de duas diferentes morfologias no filme, que está de acordo com a Figura 3.3. O pico de primeira ordem, de maior reflexão, localizado a $q^* = 0,19 \text{ nm}^{-1}$ e os picos de ordens superiores observados nas posições relativas de $2q^*$ e $3q^*$, correspondem a uma morfologia lamelar, a distância entre dois planos que se difundem são proporcionais ao valor de q^* e para uma fase lamelar a distância $d = \frac{2\pi}{q^*}$ corresponde à 33,0 nm. O outro pico apresenta-se somente como um ombro na posição de $q^{**} = 0,13 \text{ nm}^{-1}$. Estes resultados sugerem que o padrão de linhas observados nas imagens de TEM e STEM são alternações de lamelas com espaçamentos $d = 33,9 \text{ nm}$. Além disso, espera-se que este único pico à $q^{**} = 0,13 \text{ nm}^{-1}$ esteja relacionado com a fase de simetria hexagonal observada na Figura 3.3. O copolímero nanoestruturado examinado antes do tratamento térmico exibiu um perfil de SAXS diferente. Neste caso, a fase menos refletiva é a morfologia lamelar que é confirmada pela presença do pico principal, q^* à $0,19 \text{ nm}^{-1}$ e o pico de maior ordem a $q/q^* = 3$, enquanto que a fase mais refletiva apresenta um pico de primeira ordem a $q^{**} = 0,13 \text{ nm}^{-1}$ e também dois picos secundários nas posições relativas de $\sqrt{3}q^{**}$ e $\sqrt{7}q^{**}$. As séries de picos de espalhamento seguindo a seqüência de $q/q^* = 1 : \sqrt{3} : \sqrt{7}$ é atribuída aos domínios cilíndricos arranjados

na fase compacta hexagonal com espaçamentos entre domínios de d , em torno de 55,8 nm ($d = \frac{2\pi}{q^*} * \sqrt{\frac{4}{3}}$). Uma vez que a fração em volume do PDPA é 0,57, uma morfologia lamelar deveria ser estável à temperatura ambiente. Portanto, a transição de fase observada sob temperatura ocorre a partir de uma morfologia cilíndrica termodinamicamente estável, que foi formada via evaporação do solvente a partir de uma solução do copolímero em bloco com o solvente tendo mais afinidade pelo bloco PDPA, para uma morfologia lamelar estável.

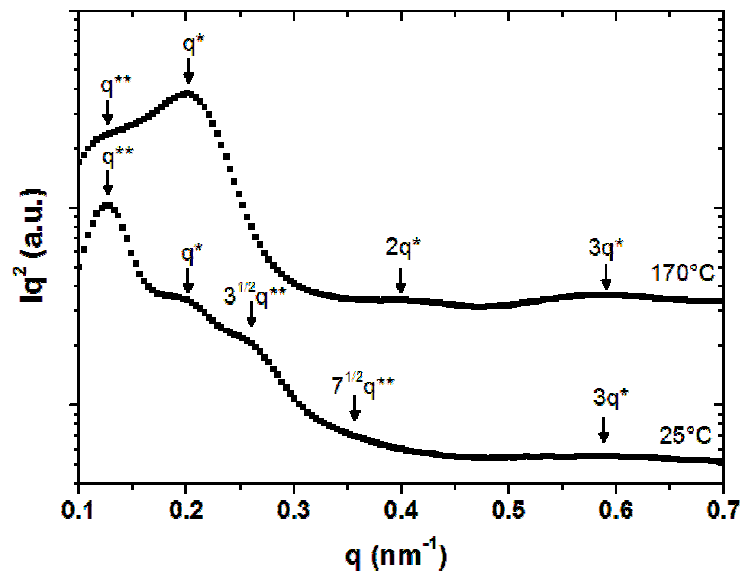


Figura 3.4. Padrão de SAXS dos filmes do copolímero PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀ preparados a partir de uma solução em etanol a 10%, a temperatura ambiente e após tratamento térmico 170 °C por 24 h, como indicado. Este padrão de SAXS evidencia claramente a co-existência de morfologia lamelar e cilíndrica.

Além disso, foram também examinadas as estruturas de filmes obtidos a partir de soluções do copolímero utilizando outros solventes, como metanol e uma solução aquosa ácida a pH 4,0. Desejou-se verificar, em um primeiro momento, a estabilidade das duas morfologias coexistentes obtidas nos filmes preparados a partir de metanol. O comportamento físico do solvente também pode influenciar a conformação do copolímero dibloco no estado ordenado. Além disso, estruturas micelares podem existir quando solventes seletivos, ou seja, solventes que são termodinamicamente bons para um bloco, mas pobre para o outro bloco, são utilizados (AHN & ZIN, 2003; SEGALMAN, 2005; SMART et al., 2008; VIVILLE et al., 2004). Interessantemente, não foi observada a mesma transição morfológica após tratamento térmico quando o filme do copolímero foi preparado a partir do metanol (Figura 3.5). Cada perfil de SAXS exibiu dois picos de reflexão largos a espaçamentos relativos q^* e $\sqrt{3}q^*$ que indicam que os domínios são empacotados em uma estrutura pobremente organizada. O pico largo a $\sqrt{3}q^*$ pode ser uma sobreposição de outras ordens de reflexão. Antes do tratamento térmico o pico de intensidade máxima a $q^* = 0,17 \text{ nm}^{-1}$ corresponde a periodicidade de 36,9 nm. Após o tratamento a 170 °C durante 24 horas, este pico se desloca para valores menores de q e o máximo é observado a $q^* = 0,14 \text{ nm}^{-1}$; refletindo uma periodicidade de 44,5 nm, que é inteiramente de acordo com a imagem de TEM mostrada na Figura 3.6. A baixa resolução do espalhamento discreto associado com as estruturas na Figura 3.5 (em que picos de ordens superiores não puderam ser identificados) é atribuída à falta de auto-organização do filme.

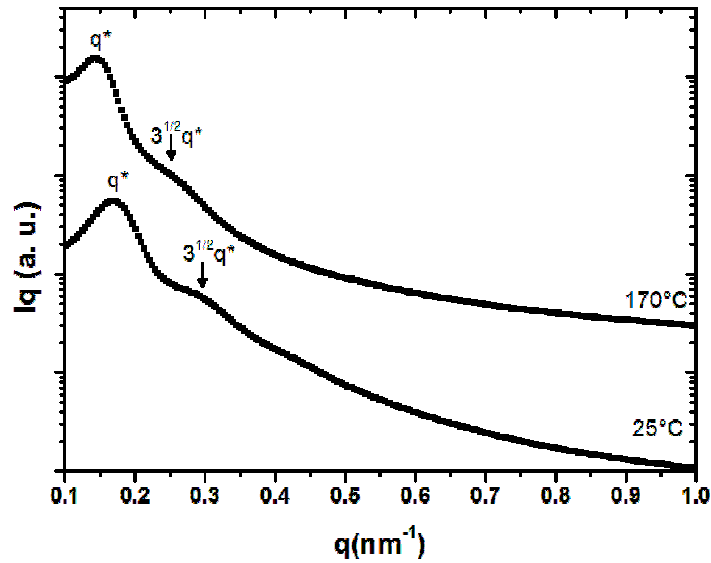


Figura 3.5. Padrão de SAXS dos filmes do copolímero PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀ preparados a partir de uma solução em metanol a 10%, a temperatura ambiente e após tratamento térmico 170 °C por 24 h, como indicado. Estes padrões de SAXS revelam claramente que em ambas as temperaturas os domínios são pobremente organizados.

De fato, a imagem retratada na Figura 3.6 revela uma pobre correlação entre o posicionamento dos nanodomínios, cujo tamanho médio está de acordo com as dimensões dos núcleos de PDPA de micelas possivelmente formadas na dissolução direta do copolímero PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀ em metanol antes da formação do filme.

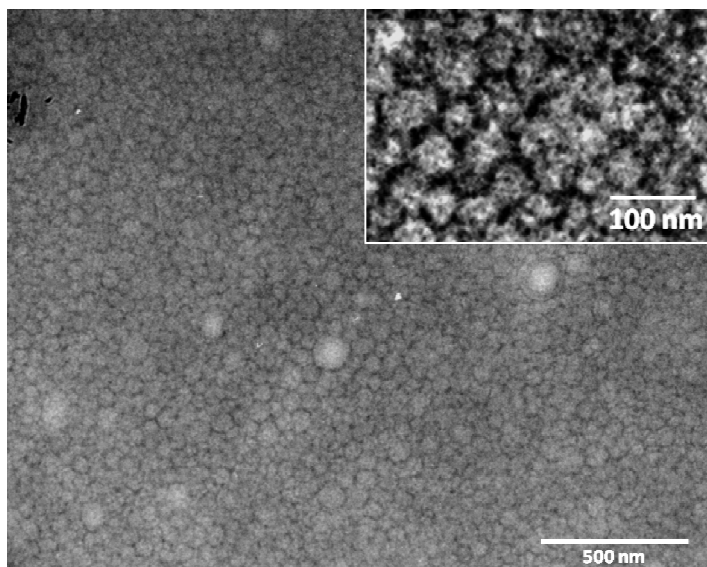


Figura 3.6. Imagem de TEM de uma seção fina do copolímero PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀ preparado em metanol e subsequentemente submetido à temperatura de 170°C durante 24h formando estruturas pobremente organizadas.

Baseado nestes resultados torna-se evidente que a morfologia do filme do copolímero depende fortemente da interação polímero-solvente. Assim, para continuar investigando a nanoestruturação dos filmes formados pelo copolímero dibloco PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀, os mesmos foram preparados a partir de uma solução aquosa ácida. As cadeias do copolímero PMPC-*b*-PDPA podem ser molecularmente dissolvidas em uma solução ácida diluída devido a protonação do bloco PDPA, que é sensível ao pH e que tem um pK_a de 5,7-6,6 dependendo das condições de solução (GIACOMELLI et al., 2006). Portanto, os filmes preparados a partir de uma solução aquosa levemente ácida (pH 4,0) a temperatura ambiente correspondem ao copolímero dibloco molecularmente dissolvido consistindo do bloco zwitteriônico (PMPC) e de um bloco catiônico (PDPA). Sob estas condições, as cadeias do copolímero se auto-organizam diretamente produzindo uma morfologia lamelar, sem a necessidade de

tratamento térmico. Como revelado pelos dados de SAXS na Figura 3.7, a fase lamelar antes do tratamento térmico é caracterizada por dois picos de ordem de reflexão a $q/q^* = 1 : 2$.

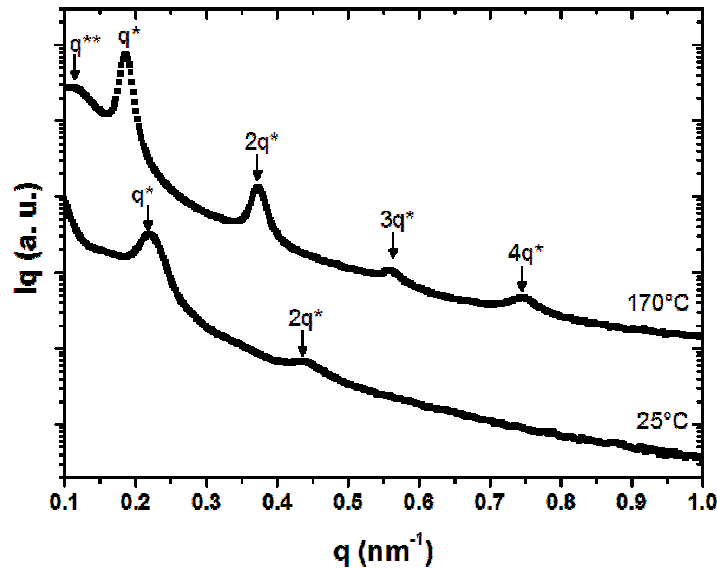


Figura 3.7. Padrão de SAXS dos filmes do copolímero PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀ preparados a partir de uma solução ácida diluída, a temperatura ambiente e após tratamento térmico 170 °C por 24 h, como indicado. O padrão de SAXS obtido a temperatura ambiente indica que os domínios são organizados em estruturas lamelares. Após tratamento térmico, a fase lamelar torna-se significativamente mais organizada.

Após tratamento térmico, a estrutura lamelar se torna significativamente mais organizada: quatro picos de espalhamento com relativas proporções dos vetores de onda $q/q^* = 1 : 2 : 3 : 4$ tornam-se evidentes, assim como um ombro denotado q^{**} , que foi atribuído à morfologia cilíndrica previamente observada por SAXS e TEM nos filmes do

copolímero dibloco preparado a partir de uma solução em etanol. Antes do tratamento térmico, o pico de intensidade máxima a $q^* = 0,22 \text{ nm}^{-1}$ corresponde a periodicidade de 28,5 nm relativo a estrutura lamelar. No entanto, o pico de primeira ordem deslocou-se para $q^* = 0,19 \text{ nm}^{-1}$ sob tratamento térmico à 170 °C correspondendo a espaçamentos entre domínios de 33,1 nm. Como previamente discutido, estes resultados estão de acordo com o comprimento estimado entre o completo estiramento das cadeias do copolímero PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀.

Comparado à filmes que tem a habilidade de formar estruturas com morfologias lamelares obtidos a partir de sistemas convencionais, a presença do bloco hidrofílico e zwitteriônico a base de fosforilcolina (PMPC) fornece uma nova opção para a fabricação de estruturas em que um domínio é biomimético e anti-incrustante. Em contraste a polímeros hidrofílicos biocompatíveis convencionais, como é o caso do poli(óxido de etileno), o segmento PMPC é insolúvel na maioria dos solventes orgânicos, conseqüentemente, filmes contendo PMPC podem ser manipulados sob condições que afetam seletivamente o outro bloco. Embora isto possa também ser alcançado com sistemas convencionais, o presente caso expande a gama de possibilidades no campo de engenharia macromolecular. Para aplicações bio-relacionadas em que a estabilidade estrutural das lamelas em meio aquoso é de interesse, convém salientar que filmes de PMPC-*b*-PDPA dissociam-se lentamente em água para formar estruturas micelares. Porém, estratégias de estabilização adicionais, tais como a reticulação química aplicada ao bloco PMPC podem ser desenvolvidas para facilitar a permanência destes filmes em meio aquoso por um período de tempo prolongado.

3.4. Conclusões

A nanoestruturação de filmes auto-organizáveis preparados a partir de um copolímero em bloco PMPC₃₀-*b*-PDPA₆₀ contendo um bloco zwitteriônico (PMPC) e um bloco pH sensível (PDPA) pode ser convenientemente ajustada em função de protocolos experimentais. Morfologias induzidas, seja pelo solvente ou pela temperatura, foram identificadas por análise de SAXS e TEM. Filmes preparados pelo método *casting* a partir de uma solução de etanol a temperatura ambiente exibiram uma morfologia cilíndrica termodinamicamente estável, que sofre uma transição do tipo ordem-ordem sob tratamento térmico à 170°C: a estrutura lamelar resultante coexiste com uma menor proporção de cilindros organizados em uma fase compacta hexagonal. Em contraste, filmes do copolímero em bloco preparados a partir de uma solução de metanol não sofrem a mesma transição morfológica, sendo obtidas estruturas esféricas ausentes de organização obtidas independentemente do tratamento térmico. Finalmente, filmes preparados a partir de uma solução aquosa a pH 4 apresentaram uma direta auto-associação para uma morfologia lamelar a temperatura ambiente, neste caso a temperatura apenas promoveu um maior ordenamento desta estrutura. Este sistema representa uma nova possibilidade no campo da engenharia macromolecular.

3.5. Referências

AHN, J. H.; ZIN, W. C. Mechanism of Morphological Transition from Lamellar/Perforated Layer to Gyroid Phases. **Macromolecular Research**, v. 11, p. 152-156, 2003.

GIACOMELLI, C.; LE MEN, L.; BORSALI, R.; LAI-KEE-HIM, J.; BRISSON, A.; ARMES, S. P.; LEWIS, A. L. 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.

HAMMERSLEY, A. P. FIT2D: An Introduction and Overview. ESRF Int. Rep., ESRF97HA02T, 1997.

HUA, F.; RUCKENSTEIN, E. **Water-Soluble Conducting Poly(ethylene oxide)-Grafted Polydiphenylamine Synthesis through a "Graft Onto" Process**. **Macromolecules**, v. 36, p. 9971-9978, 2003.

IWATA, R.; SUK-IN, P.; HOVEN, V. P.; TAKAHARA, A.; AKIYOSHI, K.; IWASAKI, Y. **Control of Nanobiointerfaces Generated from Well-Defined Biomimetic Polymer Brushes for Protein and Cell Manipulations**. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 2308-2314, 2004.

MA, Y. H.; TANG, Y. Q.; BILLINGHAM, N. C.; ARMES, S. P.; LEWIS, A. L.; LLOYD, A. W.; SALVAGE, J. P. **Well-Defined Biocompatible Block Copolymers via Atom Transfer Radical Polymerization of 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine in Protic Media**. **Macromolecules**, v. 36, p. 3475-3484, 2003.

NARAYANAN, T.; DIAT, O.; BOSECKE, P. SAXS and USAXS on the high brilliance beamline at the ESRF. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A**, v. 467, p. 1005-1009, 2001.

SEGALMAN, R. A. Patterning with block copolymer thin films. **Materials Science and Engineering R**, v. 48, p. 191-226, 2005.

SIMON, J. P.; ARNAUD, S.; BLEY, F.; BERAR, J. F.; CAILLOT, B.; COMPARAT, V.; GEISSLER, E.; DE GEYER, A.; JEANTEY, P.; LIVET, F.; OKUDA, H. A New Small-Angle X-ray Scattering Instrument on the French CRG Beamline at the ESRF Multiwavelength Anomalous Scattering/Diffraction Beamline (D2AM). **Journal of Applied Crystallography**, v. 30, p. 900-904, 1997.

SMART, T.; LOMAS, H.; MASSIGNANI, M.; FLORES-MERINO, M. V.; PEREZ, L. R.; BATTAGLIA, G. Block copolymer nanostructures. **Nano Today**, v. 3, p. 38-46, 2008.

VIVILLE, O.; LECLERE, P.; DEFFIEUX, A.; SCHAPPACHER, M.; BERNARD, J.; BORSALI, R.; BREDAS, J.-L.; LAZZARONI, R. Atomic force microscopy study of comb-like vs. arborescent graft copolymers in thin films. **Polymer**, v. 45, p. 1833-1843, 2004.

CAPÍTULO 4

DECORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS A BASE DE PS-*b*-PAA COM QUITOSANA

CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES

Este capítulo descreve o comportamento de nanopartículas na forma de vesículas poliméricas, preparadas a partir do copolímero anfifílico em bloco poliestireno-*b*-poli(ácido acrílico) (PS-*b*-PAA) com superfície carregada negativamente, na presença de quitosana, um polissacarídeo de carga oposta. O papel das interações eletrostáticas é de grande importância neste sistema e serão reportados aqui os resultados referentes às principais características das nanopartículas na presença e ausência do polissacarídeo.

A decoração das nanopartículas de PS-*b*-PAA com quitosana foi estudada principalmente pelas técnicas de espalhamento de luz dinâmico, potencial zeta e análise morfológica, que nos fornecem principalmente informações a respeito das dimensões, carga superficial e características morfológicas do sistema.

Publicação: *Chitosan adsorption at the surface of polystyrene-*b*-poly (acrylic acid) polymersomes.*

4.1. Materiais

Os copolímeros em bloco a base de poliestireno e poli(ácido acrílico) (PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ e PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃) onde os subscritos referem-se ao grau médio de polimerização de cada bloco, cujas massas molares numéricas (M_n) são 15700 e 46500 g/mol, PDI (grau de polidispersidade) = 1,07 e 1,18 e fração em volume calculada para o PAA = 0,10 e 0,13, respectivamente, foram comprados diretamente da Polymer Source Inc. (Canadá). As quitosanas com massa molar numérica média de aproximadamente 5000 g/mol⁻¹ e com massa molar viscosimétrica média (M_v) de 37000 g/mol⁻¹, determinada experimentalmente utilizando um viscosímetro Visco Schott, tubo Ubbelohde, a partir da equação de Mark-Kuhn-Howwink-Sakurada (valores de K e a de 0,072 mL mol g⁻² e 0,799, respectivamente) (BRUGNEROTTO et al, 2001), foram adquiridas da Sigma-Aldrich e utilizadas como obtidas.

4.2. Metodologia

4.2.1. Preparação das nanopartículas

As nanopartículas foram preparadas pela técnica de co-solvente seguida de diálise. A técnica consiste da dissolução do copolímero em um solvente termodinamicamente bom para os dois blocos, seguida de adição lenta e progressiva de um solvente seletivo para um dos blocos, onde o bloco solvofóbico se organiza minimizando o contato com o solvente, promovendo assim, dependendo das condições experimentais, a formação de nanoestruturas bem definidas em escala nanométrica. Brevemente, os copolímeros em bloco PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ e PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ foram dissolvidos em dioxano na concentração de 0,5 % e mantidos sob agitação constante a temperatura ambiente até completa solubilização. Em seguida procedeu-se à adição lenta e progressiva de água Milli-Q® (18.2 Ω.cm) na taxa de

250 $\mu\text{L/h}$ e agitação magnética constante de 1000 rpm, até o volume de 50 % de água. Após este período foi adicionado à suspensão coloidal um excesso de água ultrapura, o equivalente a um aumento de 10 vezes no volume, para inibir a cinética de agregação das nanopartículas. A suspensão foi dializada durante dois dias, utilizando uma membrana semipermeável de diálise de diálise (MWCO 3,5 kD), para a eliminação do solvente orgânico e posteriormente filtrada em filtros de acetato de celulose (1,2 μm). A taxa de adição de água e a velocidade de agitação foram cuidadosamente estabelecidas após diversos experimentos, a fim de promover a formação de estruturas bem definidas, homogêneas, na ausência de agregados, ou seja, com um baixo índice de polidispersidade.

A decoração das nanopartículas com as quitosanas de diferentes massas moleculares foi obtida pela mistura simples das duas soluções em quantidades e condições experimentais bem definidas e em função dos experimentos previamente programados. Para tal as soluções de quitosana foram preparadas com uma quantidade estequiométrica de HCl com base no conteúdo de grupos $-\text{NH}_2$ da quitosana, determinada a partir de titulação potenciométrica. As soluções do polissacarídeo foram agitadas à temperatura ambiente, até completa solubilização.

4.2.2. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O espalhamento de luz dinâmico (DLS) das amostras foi investigado em um Goniômetro ALV-CGS 8F S/N 069, equipado por quatro detectores, com um laser de 22 mV HeNe operando a um comprimento de onda de 632,8 nm. A dependência angular do espalhamento de luz dinâmico foi observada em ângulos que variaram entre 40° e 140°, em intervalos de 10°, durante 300s para cada ângulo. Para os experimentos, 1 mL de cada

suspensão (em diluições previamente estimadas) e com temperatura constante de $25,0 \pm 0,1$ °C foram analisadas em cubetas cilíndricas. O raio hidrodinâmico R_H das nanopartículas em suspensão foi obtido a partir da análise CONTIN, usando a equação de Stockes-Einstein $R_H = \kappa_B T / 6\pi\eta D$, com base na determinação do valor do coeficiente de difusão aparente D , onde κ_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura da amostra e η é a viscosidade do meio.

4.2.3. Potencial Zeta

O potencial zeta das nanopartículas suspensas em água milli-Q® foram verificados utilizando um Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, France). A carga superficial foi estimada 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. Todas as medidas de potencial zeta foram realizadas com suspensões diluídas das nanopartículas à 25°C utilizando uma média de 5 determinações.

4.2.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM) é uma das técnicas mais utilizadas para a caracterização de nanopartículas, fornecendo uma informação visual direta da morfologia, do tamanho e dispersão das mesmas. As imagens de TEM foram registradas sobre filmes fotográficos Kodak SO163 utilizando um microscópio Philips CM200 operando a uma voltagem de aceleração de 80 kV com uma fonte de hexaboreto de lantânio (LaB_6),

posteriormente reveladas e digitalizadas com o auxílio de uma câmera Kodak Megaplug e do software Analysis 3.2. A preparação da amostra consistiu da deposição de 4 μ L da suspensão aquosa, a uma diluição previamente estimada, sobre grades de cobre revestidas com uma fina camada de carbono, que tiveram as superfícies previamente tratadas com o objetivo de deixá-las hidrofílicas. As amostras foram secas a temperatura ambiente antes da observação.

4.2.5. Crio-Microscopia Eletrônica de Transmissão (cryo-MET)

Para a observação das amostras por cryo-TEM, gotas das dispersões aquosas diluídas foram depositadas sobre grades de cobre (lacey-gride) revestidas com uma camada de carbono e instantaneamente congeladas em etano líquido (-171°C). Cada amostra foi colocada em um crio-suporte Gatan 626 mantidas sob refrigeração com nitrogênio líquido e transferidas para o microscópio Philips CM200 operando a uma voltagem de aceleração de 80 kV. As amostras foram observadas à baixa temperatura (-180°C) e utilizando o modo “low-dose” para reduzir os danos causados pela radiação nas áreas de interesse da amostra. As imagens foram registradas em filmes Kodak SO163 reveladas e digitalizadas com o auxílio de uma câmera Kodak Megaplug e do software Analysis 3.2.

4.2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

Para uma melhor visualização da superfície das amostras utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo Zeiss ultra 55 FEG (CMTC-INPG, Grenoble) operando a uma voltagem de aceleração de 3 kV usando um detector in-leans. Uma pequena alíquota da suspensão aquosa das nanopartículas foi depositada sobre stubs e

deixada secar a temperatura ambiente. As amostras foram revestidas com uma fina camada de carbono com espessura de 2 nm e a imagem produzida por elétrons secundários.

4.3. Resultados e Discussão

O copolímero em bloco PS_n-*b*-PAA_m (PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ e PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃, denominados C3 e C7, respectivamente) utilizado para a preparação das nanopartículas está representado na Figura 4.1. As frações relativas em volume, *f*, calculadas para o bloco PAA foram de 0,10 e 0,13 para os copolímeros C3 e C7, respectivamente. Os cálculos foram feitos baseados nos valores de massa molar numérica média e densidade de cada bloco.

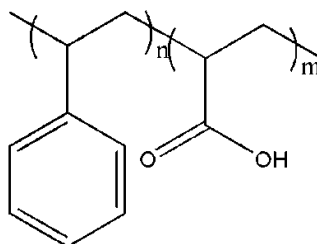


Figura 4.1. Representação esquemática do copolímero em bloco poliestireno-*b*-poli(ácido acrílico) (PS-*b*-PAA).

As nanopartículas foram preparadas pelo método de co-solvente seguido de diálise. Na medida em que água é adicionada às soluções copolímero/solvente, a polaridade do meio torna-se cada vez mais desfavorável à solubilização do segmento hidrofóbico PS, que a uma dada concentração de água, tende a se separar do meio. As condições experimentais, como a escolha do solvente orgânico empregado, taxa de gotejamento e volume de água (solvente

seletivo para o bloco PAA) adicionados, concentração inicial do copolímero e velocidade de agitação foram cuidadosamente estabelecidos a fim de se obter nanoestruturas com tamanhos inferiores à 200 nm e com baixo índice de polidispersão. Estas características foram principalmente acompanhadas por medidas de espalhamento de luz dinâmico e microscopia eletrônica de transmissão (TEM), que nos fornecem informações relevantes, como raio hidrodinâmico das partículas em suspensão, presença de agregados, polidispersão e características morfológicas.

Nosso objetivo era a obtenção de vesículas poliméricas em suspensão aquosa, uma vez que a fração em volume do bloco hidrofílico, PAA, favorece a formação destas estruturas em suspensão. Este tipo de nanoestrutura explora a combinação de uma fina parede hidrofóbica e uma cavidade interna solvofílica, que quando em suspensão aquosa permite tanto a encapsulação na camada hidrofóbica de agentes ativos pobremente solúveis, quanto a encapsulação simultânea de agentes hidrofílicos no seu interior (DISCHER et al., 1990 ; MENG et al., 2009).

Além da fração volumétrica de cada bloco, o solvente empregado na preparação das nanoestruturas também pode determinar o tipo de morfologia que será obtida. CHOUCAIR et al. (2004) investigaram, entre outros parâmetros, o efeito da mistura de dois solventes orgânicos, dioxano e tetraidrofurano (THF), sobre o tamanho e morfologia dos agregados de PS-*b*-PAA. Os resultados mostraram que quanto maior a proporção de dioxano na mistura, maior a probabilidade de se obter estruturas do tipo vesículas, do contrário, esferas compactas foram obtidas. De acordo com os autores, este resultado é explicado pela diferença no valor da constante dielétrica dos dois solventes; uma vez que a constante dielétrica para o THF é maior, isto reflete diretamente na densidade de carga do bloco

ionizável PAA, diminuindo o número de agregação e conseqüentemente o tamanho das nanopartículas.

A Figura 4.2 ilustra as diferenças morfológicas observadas para o copolímero C3 preparado em THF (A) e em dioxano (B). Os parâmetros considerados na preparação destas nanopartículas foram: taxa de adição de água de 1 mL/h e agitação magnética de 1000 rpm.

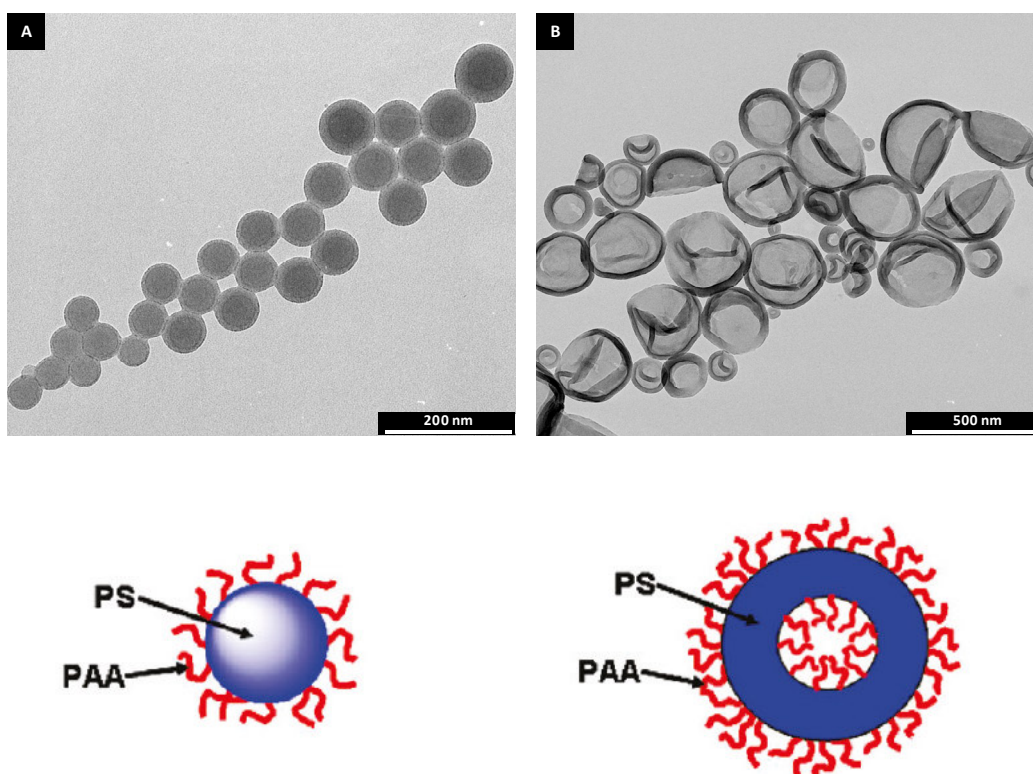


Figura 4.2. Micrografias de TEM das nanopartículas do copolímero $PS_{139}\text{-}b\text{-}PAA_{17}$ (C3) preparado a partir de THF (A) e de dioxano (B), acompanhada de uma representação esquemática.

A partir destes resultados o dioxano foi selecionado como solvente de partida para a preparação das nanopartículas na forma de vesículas poliméricas. Posteriormente, os parâmetros que foram considerados satisfatórios para a preparação das vesículas poliméricas com as características almejadas em suspensão aquosa foram: taxa de adição de água de 250 $\mu\text{L/h}$ e agitação magnética de 1000 rpm.

4.3.1. Caracterização das vesículas poliméricas de PS-*b*-PAA

Uma vez que as nanopartículas em suspensão estão em constante movimento, as flutuações da intensidade da luz espalhada estão diretamente relacionadas ao movimento browniano. Portanto a técnica de espalhamento de luz dinâmico foi utilizada para analisar este movimento e correlacioná-lo com as dimensões nas nanopartículas em suspensão aquosa, através de flutuações temporais na luz espalhada que geram informações a respeito da dinâmica das partículas em solução (SCHÄRTL et al., 2007).

A Figura 4.3 mostra a função de autocorrelação típica $C(q,t)$ medida a diferentes ângulos de espalhamento e 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), calculada usando a análise CONTIN (B), para as nanopartículas em suspensão aquosa preparadas a partir do copolímero PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇, aqui denominado C3, a uma concentração de aproximadamente 0,25 mg/mL e pH 5. Para todos os ângulos estudados observa-se somente uma distribuição de tempos de relaxação bastante estreita. O comportamento linear do gráfico de Γ versus q^2 é característico de espalhamento difusivo de partículas, cuja morfologia será discutida posteriormente. Portanto, o raio hidrodinâmico pode ser

corretamente calculado usando a relação de Stokes-Einstein. A distribuição de tempos de relaxação obtida para a amostra C3 a 0,50 mg/mL resultou em um R_H de 78 nm, que reflete o raio aparente das nanopartículas, considerando a sua camada de hidratação/solvatação. O índice de polidispersão, PDI, da amostra a 90° foi de 0,09, indicando uma estreita faixa de distribuição de tamanho.

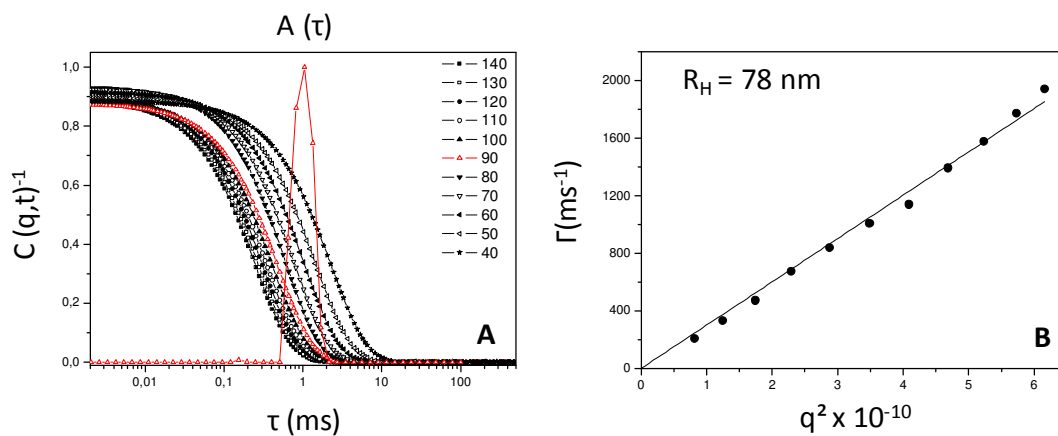


Figura 4.3. Função de correlação $C(q, t)$ em ângulos de espalhamento de 40° a 140° (A) e a respectiva dependência de q^2 em função da frequência de relaxação (Γ) (B) para uma suspensão aquosa de C3 a uma concentração de 0,50 mg/mL e pH 5.

Variações nos valores de R_H foram observadas em função da concentração. Uma vez que a concentração micelar crítica, que é a concentração a partir da qual agregados são formados em solução, depende do conteúdo de água na suspensão, a um conteúdo de água constante, o número de agregação tende a ser maior com o aumento da concentração do copolímero. Como as dimensões dos agregados são uma função do número de agregação, a medida que a concentração inicial aumenta, aumenta o estiramento do bloco hidrofóbico

nos agregados, conduzindo a um aumento nas dimensões, podendo inclusive favorecer à transições morfológicas (ZHANG & EISENBERG, 1998).

Para o sistema C3, as concentrações iniciais exploradas variaram entre 0,01 e 0,10 mg/mL, que resultaram em concentrações finais (após diálise) de 0,05 a 0,50 mg/mL, apresentaram valores de R_H que variaram entre 64 e 79 nm. Concentrações iniciais abaixo de 0,1 mg/mL revelaram a existência de um único tempo de relaxação, com uma estreita faixa de distribuição de tamanho (Índice de polidispersão, PDI, entre 0,08 e 0,12). Acima desta concentração uma forte presença de agregados foi observada.

Uma vez que as nanopartículas estão formadas em suspensão, uma diluição causa uma sutil diferença nos valores de R_H das nanopartículas, por exemplo, para C3 na uma diluição de 10 vezes feita a partir de uma suspensão de 0,25 mg/mL (concentração final) proporcionou uma variação de 2-3 nm no R_H , estando portanto, dentro das incertezas experimentais.

A mesma estreita faixa de distribuição de tamanho foi observada para o copolímero C7. A Figura 4.4 mostra a função de autocorrelação $C(q,t)$ medida a diferentes ângulos de espalhamento e 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), calculada usando a análise CONTIN (B), para as nanopartículas em suspensão aquosa preparadas a partir do copolímero PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ (C7) a uma concentração de aproximadamente 0,50 mg/mL. A distribuição de tempos de relaxação obtida para a amostra C7 resultou em um R_H de 74 nm, com PDI de 0,11 a 90° .

Para este copolímero as diferenças nas dimensões em função da concentração foram mais significativas em comparação às suspensões de nanopartículas do copolímero C3,

justificado pelo maior grau de polimerização. O R_H estimado para uma suspensões das nanopartículas de C7 a concentrações relativas entre 0,01 e 0,10 mg/mL, que resultaram em concentrações finais (após diálise) de 0,05 a 0,50 mg/mL, foram entre 74 e 89 nm, em pH 5.

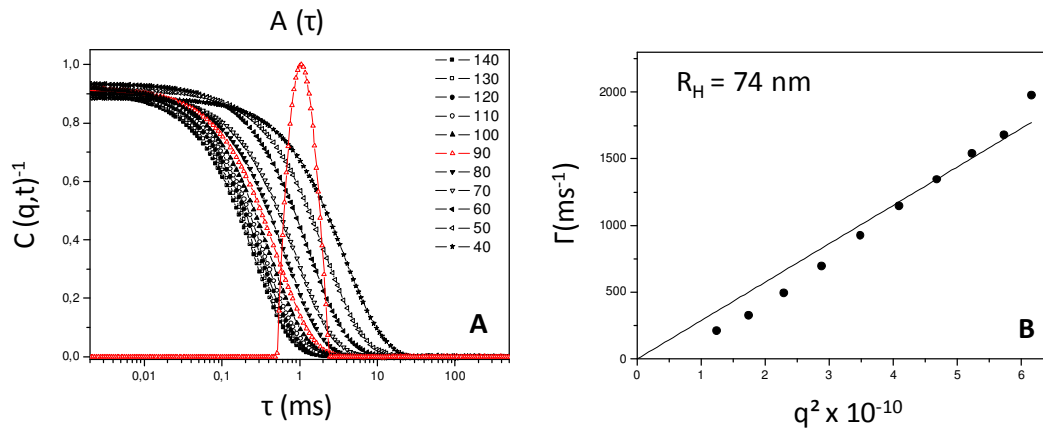


Figura 4.4. Função de correlação $C(q, t)$ em ângulos de espalhamento de 40° a 140° (A) e a respectiva dependência de q^2 em função da frequência de relaxação (Γ) (B) para uma suspensão aquosa de C7 a uma concentração de 0,50 mg/mL e pH 5.

Para esta amostra também foi verificada a dependência do R_H em função ao pH do meio. A Tabela 4.1 mostra os valores de R_H , no ângulo fixo de 90°, para o copolímero C7 na concentração de 0,01 mg/mL (preparada pela diluição de uma suspensão aquosa à 0,25 mg/mL) na faixa de pH entre 3 e 10. Observa-se que a valores de pH acima de 8 ocorre um aumento no valor do R_H provavelmente em função do aumento da camada de solvatação das nanopartículas, pela ionização dos grupos carboxílicos do PAA em meio alcalino, que ocorre em valores de pH acima de seu pKa (4,26) (DONG et al., 2009). Estas diferenças são mais significativas para o copolímero C7, uma vez que o grau de polimerização dos grupos

PAA (63) é maior do que para o copolímero C3 (17), acarretando em uma maior repulsão entre as cadeias do bloco hidrofílico.

Tabela 4.1. Variação do R_H calculado para o copolímero C7 em função do pH.

pH	3	4	5	6	7	8	9	10
R_H (nm)	83	84	84	85	85	89	95	101

A morfologia da nanopartícula em suspensão também pode ser estimada por medidas de espalhamento de luz, a partir de uma relação entre o R_H com o raio de giração (R_g) das nanopartículas espalhadas. Normalmente este parâmetro (ρ) é estimado pela combinação dos resultados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) com espalhamento de luz estático (SLS). Neste trabalho tanto o R_H quanto o R_g foram calculados por DLS, com base na lei de Guinier. Esta aproximação é bastante utilizada para a determinação e R_g de partículas, sendo válida apenas quando $qR_g < 1$ (SCHÄRTL, 2007). Na região de baixos valores de q , o valor de $I(q)$ é descrito pela equação 4.1:

$$\ln I = \ln I_0 - q^2 \left(\frac{R_g^2}{3} \right) \quad (4.1)$$

A Tabela 4.2 mostra os valores calculados para ρ (equação 4.2), o qual é sensível à conformação em solução, relacionado às morfologias mais freqüentemente encontradas.

$$\rho = \frac{R_g}{R_H} \quad (4.2)$$

Tabela 4.2. Valores de ρ para partículas com morfologias típicas (SCHÄRTL, 2007).

Morfologia	ρ
Esfera rígida homogênea	0,775
Esfera oca	1
Elipsóide	0,775-4
Novelo aleatório	1,5

Para os sistemas em investigação os valores de R_g foram determinados a partir de um gráfico de $\ln I$ versus q^2 , como ilustrado na Figura 4.5, que apresenta o valor de R_g para as nanopartículas do copolímero C3 e C7 na concentração de 0,50 mg/mL a pH 5, cujo valor foi calculado a partir do coeficiente angular da reta utilizando a equação 4.1.

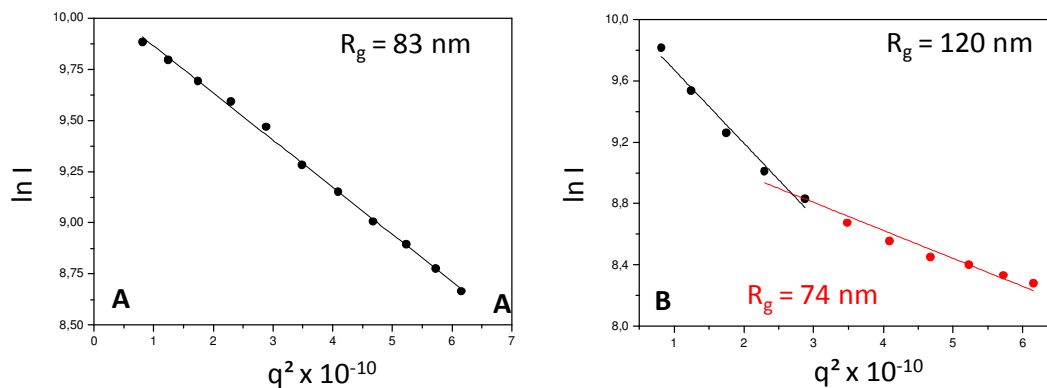


Figura 4.5. Plote de Guinier ($\ln I$ versus q^2) calculado a partir da intensidade de espalhamento de luz para nanopartículas do copolímero C3 (A) e C7 (B) em suspensão aquosa. A partir do coeficiente angular da reta é possível calcular o valor de R_g .

Os valores de R_H e de R_g determinados para as nanopartículas C3 à uma concentração de 0,50 mg/mL e pH 5 foram, respectivamente, 78 nm e 83 nm. Utilizando a equação 4.2, tem-se $\rho = 1,06$ para as nanopartículas C3 que correspondem a uma morfologia de vesículas poliméricas (esfera oca), corroborando com as morfologias observadas por microscopia eletrônica em transmissão, que serão apresentadas posteriormente. Já para as nanopartículas C7, nas mesmas condições experimentais, a partir do gráfico foram encontradas duas inclinações, correspondentes a diferentes valores de R_g (74 nm e 120 nm), para um valor de R_H de 74 nm, fornecendo valores de $\rho = 1,0$ e $1,6$, respectivamente, que estão relacionadas a morfologia vesicular e a morfologia de agregados maiores (a menores ângulos de espalhamento).

As suspensões preparadas a partir dos copolímeros em bloco PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ (C3) e PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ (C7) foram observadas por microscopia eletrônica em transmissão (TEM) e revelaram nanopartículas com dimensões inferiores a 200 nm. Ambos os sistemas investigados apresentam uma morfologia claramente vesicular.

A partir das micrografias obtidas para nanopartículas de (C3), Figura 4.6 (A e B), verificou-se nanopartículas com dimensões que corroboram com os resultados via DLS. As pequenas diferenças que podem ser encontradas entre as duas técnicas estão relacionadas ao processo de desidratação, uma vez que para as imagens, uma alíquota da suspensão é depositada sobre uma grade de cobre e seca, já o espalhamento de luz mede o tamanho aparente das nanopartículas, considerando a sua camada de hidratação/solvatação (SCHÄRTL, 2007).

Quando o feixe de elétrons atravessa a amostra, ocorre o espalhamento devido às diferentes densidades eletrônicas dentro da amostra, ou diferentes interações físicas entre

os elétrons e a mesma. Como o bloco PS possui uma maior densidade eletrônica do que o bloco PAA, o bloco hidrofóbico é observado na região mais escura das imagens, o bloco PAA frequentemente não é visível (MAI & EISENBERG, 2010).

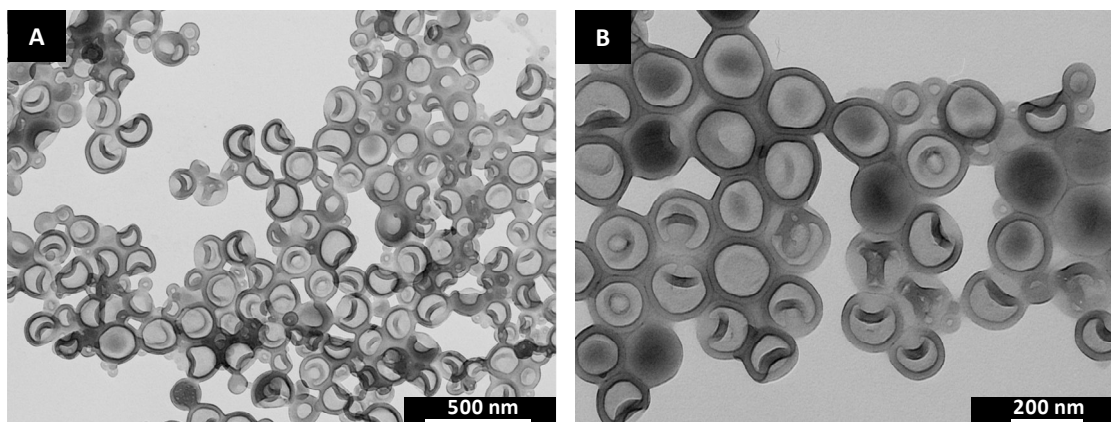


Figura 4.6. Micrografias para as nanopartículas do copolímero PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ (C3) (A e B) em maior e menor magnificação.

Além disso, a espessura da camada hidrofóbica foi medida a partir das imagens com o auxílio do software MeasureIT (Olympus Soft Imaging Solutions), utilizando-se para tal uma média aritmética de aproximadamente 100 determinações, inter- e intra-partículas, como exemplificado na Figura 4.7, para nanopartículas do copolímero C3. Apesar de o sistema apresentar uma estreita faixa de distribuição de tamanho observada por DLS, pequenas diferenças são evidenciadas por TEM, porém independentemente do tamanho da nanopartícula a parede hidrofóbica tende a manter a sua espessura relativamente constante, 20 ± 3 nm, sendo mais uma evidência de que o sistema apresenta um baixo índice de polidispersão, uma vez que para vesículas preparadas pelo copolímero PS-*b*-PAA, a

espessura da membrana hidrofóbica pode apresentar uma variação de tamanho em função de suas dimensões (MA & EISENBERG, 2009). A relação entre a espessura da membrana hidrofóbica e o tamanho é controlada pelo comprimento do bloco hidrofílico, que estabiliza a partícula, para copolímeros com menor grau de polimerização de PAA a tendência é obter vesículas maiores e neste caso a dependência entre tamanho e membrana hidrofóbica é menos significativa. Para maior grau de polimerização de PAA a espessura da parede hidrofóbica pode diminuir para permitir que o segmento hidrofílico estabilize a partícula.

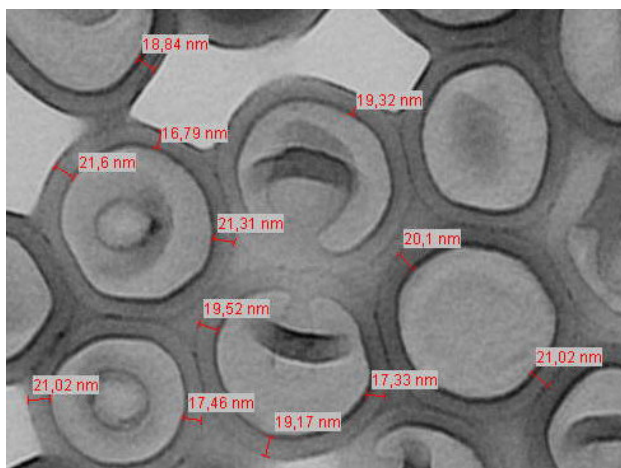


Figura 4.7. Micrografia exemplificando o cálculo estimativo para a espessura da camada hidrofóbica da vesícula polimérica do copolímero C3, através do software MeasureIT (Olympus Soft Imaging Solutions).

De maneira similar, a morfologia das nanopartículas obtidas a partir do copolímero C7 também foi averiguada por TEM (Figura 4.8). Como previamente sugerido por DLS, uma morfologia do tipo vesicular foi observada. A espessura da camada hidrofóbica (constituída

do bloco PS) também foi estimada a partir das imagens, sugerindo uma espessura de aproximadamente 35 ± 3 nm.

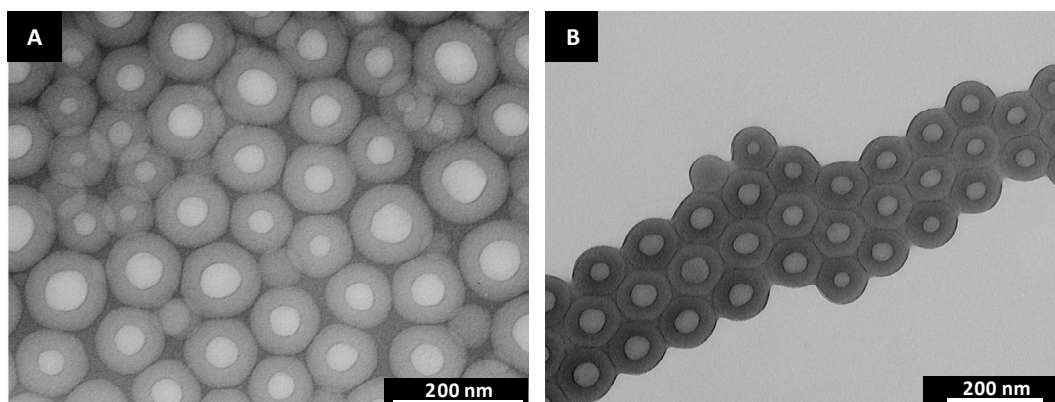


Figura 4.8. Micrografias para as nanopartículas do copolímero PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ (C7) em maior e menor magnificação (A e B).

4.3.2. Decoração das vesículas poliméricas com quitosana

Após definirmos as condições experimentais que nos permitiram a obtenção de nanopartículas com propriedades facilmente manipuláveis, nossos esforços foram concentrados na decoração deste sistema com um polieletrólito de origem natural. A decoração foi regida por interações eletrostáticas entre as nanopartículas com superfície carregada negativamente, obtida pela ionização dos grupos PAA, e um polissacarídeo de carga oposta.

A adsorção de polieletrólitos sobre a superfície carregada de nanopartículas desempenha um papel fundamental na ciência de materiais e em aplicações biomédicas,

portanto, a combinação de polissacarídeos com suas biofuncionalidades singulares, com nanopartículas de origem sintética, com suas propriedades facilmente controláveis, são uma estratégia original para o desenvolvimento de nanopartículas bem definidas e organizadas com propriedades de superfície biocompatíveis e biodegradáveis.

Os resultados que serão apresentados neste capítulo são para nanopartículas preparados a partir do copolímero PS-*b*-PAA com dois diferentes graus de polimerização PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ (C3) e PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ (C7), decorados com quitosanas de duas massas molares distintas, quitosana oligossacarídeo (CS-oligo) e quitosana de massa molar viscosimétrica média de 37000 g/mol (CS-37), cuja estrutura é representada na Figura 4.9. Reportaremos resultados baseados em medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS), medidas de potencial zeta, microscopia eletrônica de transmissão, crio-transmissão e de varredura, analisando-se comparativa as amostras antes e após o processo de decoração.

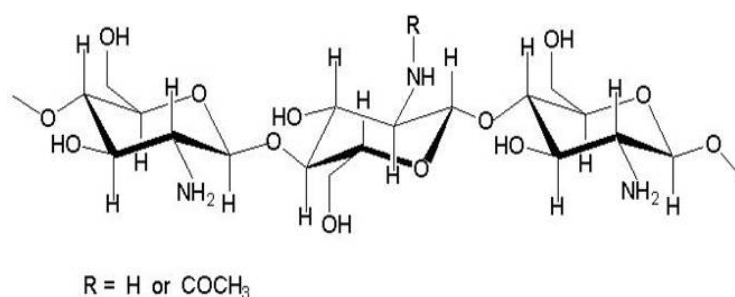


Figura 4.9. Representação esquemática da estrutura da quitosana (CS).

O processo de decoração das nanopartículas com a quitosana ocorreu pela mistura simples da suspensão das nanopartículas, com uma solução do polissacarídeo, em

determinadas concentrações, sendo investigado por medidas de espalhamento de luz dinâmico e de potencial zeta. Estas interações, que são basicamente de origem eletrostática entre as nanopartículas carregadas negativamente e o polissacarídeo de carga oposta, provocam uma alteração dinâmica do sistema perceptível via DLS, bem como por medidas de potencial zeta.

O potencial zeta é o potencial medido no plano de cisalhamento entre a partícula e a solução, quando os dois estão em movimento relativo na presença de um campo elétrico. Quando uma camada de macromoléculas é adsorvida na superfície da partícula, esta move o plano de cisalhamento para longe da superfície alterando o potencial zeta. Dessa forma, o potencial zeta é função da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que a circunda. Este potencial reflete a carga efetiva nas partículas, e se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas e também com a estabilidade da suspensão (DELGADO et al., 2007).

Sob a influência das forças de atração e repulsão eletrostática, as nanopartículas revestidas alcançam um tamanho de equilíbrio. Inicialmente, a uma baixa concentração de polieletrólito, o R_H das nanopartículas, medido por DLS, encontra-se dentro das incertezas experimentais, aproximadamente o mesmo tamanho das nanopartículas originais. Com o aumento da concentração do polieletrólito no meio, o tamanho dos agregados aumenta até um valor máximo, na ordem de micrometros, próximo ao ponto de neutralização. A partir deste ponto, o tamanho dos agregados diminui até um valor final, ligeiramente maior do que o medido para as nanopartículas originais, resultando em nanopartículas com uma camada de polieletrólito na superfície, como ilustrado na Figura 4.10.

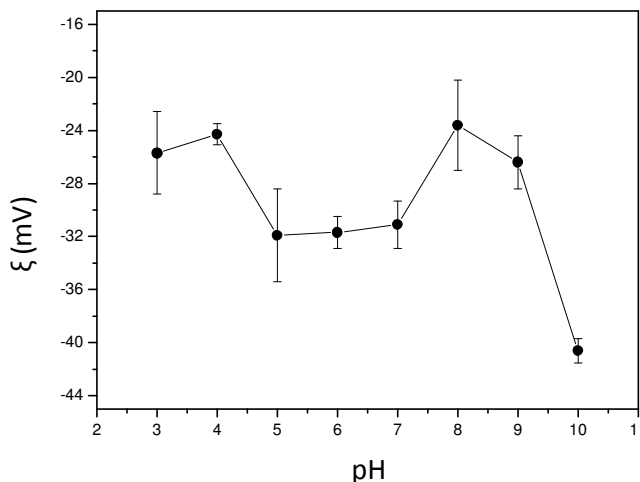


Figura 4.11. Variação do potencial zeta em função do pH para suspensões aquosas das nanopartículas do copolímero C7 a uma concentração de 0,01 mg/mL.

Posteriormente foram realizadas medidas de potencial zeta para adições progressivas de quitosana à suspensão das nanopartículas dos copolímeros C3 e C7, utilizando quitosanas de duas massas molares distintas, uma quitosana oligossacarídeo (CS-oligo) com massa molar numérica média de 5000 g/mol e uma quitosana com massa molar viscosimétrica média de 37000 g/mol (CS-37). Durante a adição da solução de quitosana à suspensão aquosa das nanopartículas o pH do meio variou entre 4 e 5, permitindo uma perfeita solubilidade da quitosana em todos os experimentos.

A Figura 4.12 mostra a variação do potencial zeta em função da razão da concentração de quitosana CS-37 adicionada pela concentração das nanopartículas do copolímero C3 (A) e C7 (B) na concentração de 0,05 mg/mL, sendo possível observar uma ampla variação do potencial zeta, na faixa de concentração investigada. Inicialmente o valor do potencial zeta é negativo devido à dissociação dos grupos carboxílicos e torna-se positivo a medida que a

quantidade de quitosana adicionada aumenta na mistura. Para maiores concentrações de quitosana foi observado um platô, sugerindo um limite de adsorção das cadeias do polieletrólito. Os valores de potencial zeta alcançados para os sistemas C3 e C7, utilizando a quitosana CS-37, foram respectivamente de +24 mV e +21 mV, nas condições experimentais empregadas: concentração final das nanopartículas foi de 0,048 mg/mL e a quantidade máxima de quitosana adicionada resultou em uma concentração de quitosana na mistura de 0,019 mg/mL.

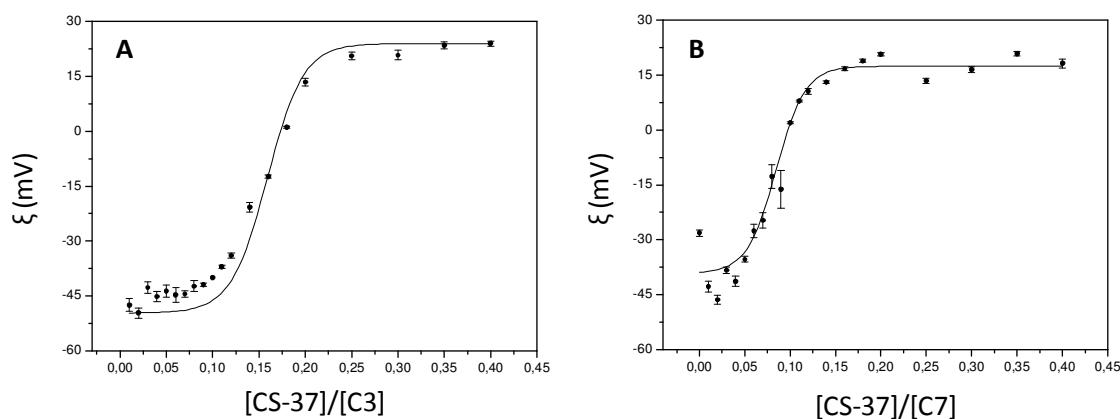


Figura 4.12. Variação do potencial zeta em função da fração da concentração de quitosana ($M_v = 37000$ g/mol) pela concentração das nanopartículas, para o sistema C3 (A) e para o sistema C7 (B).

Simultaneamente, investigou-se a variação do R_H das nanopartículas com a adição progressiva de quitosana CS-37 (Figura 4.13 A e B), mostrando um comportamento previsto. Próximo ao potencial zeta zero ocorre a agregação das nanopartículas/quitosana promovido pelo processo de neutralização, com a adição continuada do polissacarídeo, ocorre a

inversão do potencial zeta e diminuição do tamanho dos agregados até um valor constante (Figura 4.13 C).

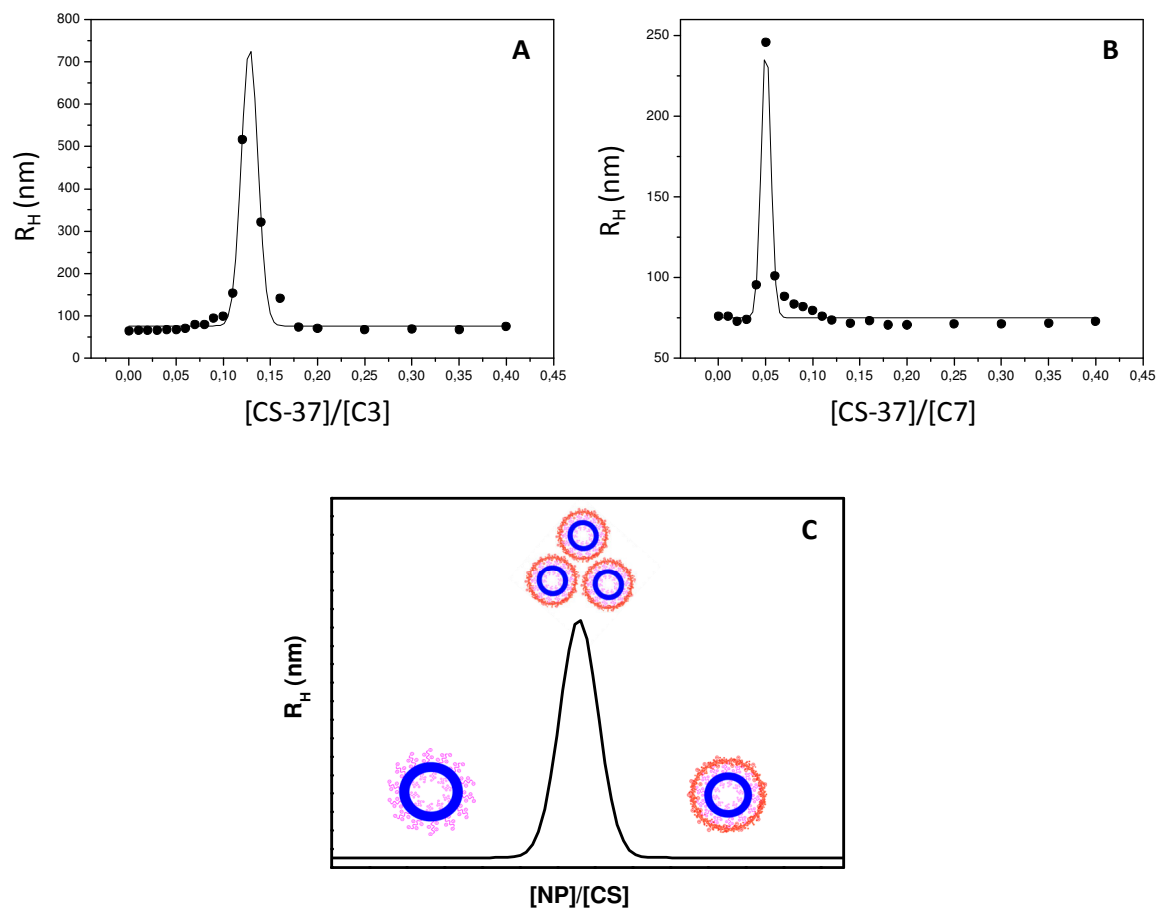


Figura 4.13. Variação do R_H em função da fração da concentração de quitosana ($M_v = 37000$ g/mol) pela concentração das nanopartículas, para o sistema C3 (A) e para o sistema C7 (B) e respectiva representação esquemática (C).

Tem sido demonstrado que polímeros de maior massa molar são preferencialmente adsorvidos se comparados a cadeias de baixa massa molar (O'SHEA et al., 2010). Nas

mesmas condições experimentais a adsorção da quitosana oligossacarídeo na superfície das nanopartículas C3 e C7 são mostradas na Figura 4.14, deixando evidente que a evolução do potencial zeta para este sistema segue uma cinética de absorção diferente.

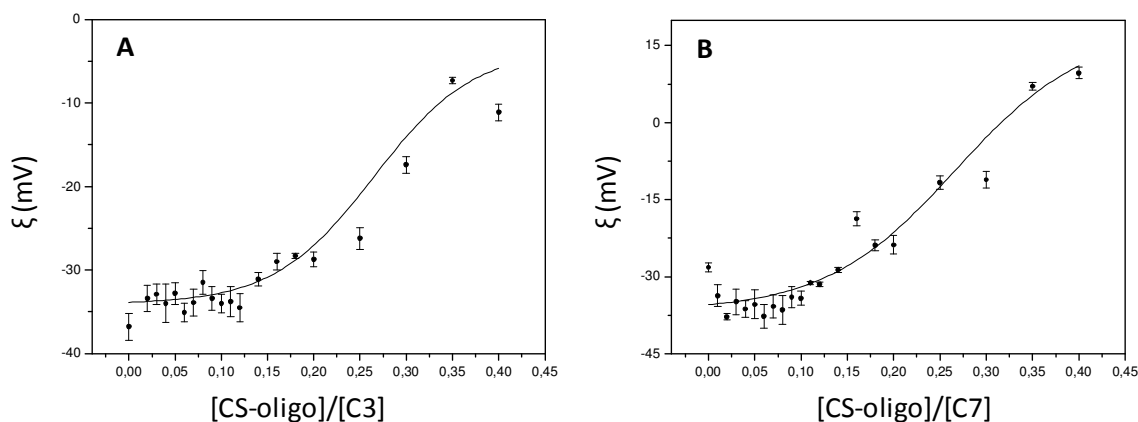


Figura 4.14. Variação do potencial zeta em função da fração da concentração de quitosana oligossacarídeo pela concentração das nanopartículas, para o sistema C3 (A) e para o sistema C7 (B).

A variação nas dimensões das nanopartículas durante a adsorção do polissacarídeo é evidenciada por medidas de espalhamento de luz dinâmico (Figura 4.15), denotando o mesmo comportamento apresentado para a quitosana de maior massa molar. Fazendo uma análise comparativa entre os valores de potencial zeta e os valores de R_H , observa-se claramente que mesmo que aparentemente as medidas de potencial zeta não tenham apresentado um platô, que sugeriria um limite de adsorção de quitosana, os valores de R_H mostram que as dimensões das nanopartículas alcançam o equilíbrio termodinâmico.

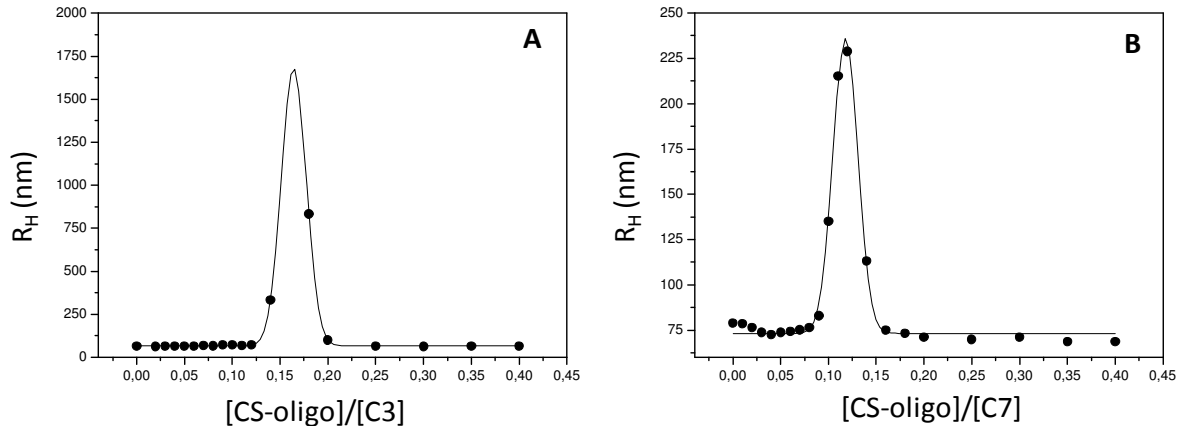


Figura 4.15. Variação do R_H em função da fração da concentração de quitosana ($M_v = 37000$ g/mol) pela concentração das nanopartículas, para o sistema C3 (A) e para o sistema C7 (B).

A Figura 4.16 mostra diferentes parâmetros físico químicos que foram determinados para o sistema C3, como função de correlação $C(q,t)$ e distribuição dos tempos de relaxação obtidos à 90° , valores de raio hidrodinâmico (R_H), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ζ), a uma dada razão entre a concentração de quitosana e a concentração da suspensão das nanopartículas, que foram previamente estabelecidas a fim de se estimar uma concentração de equilíbrio, ou seja, nesta proporção $[quitosana]/[nanopartícula]$, obtém-se nanopartículas homogêneas, com baixo índice de polidispersão, com valores de potencial ζ dentro da região considerada estável e que não sofre fortes perturbações após diluições. Após uma triagem com vários experimentos que correlacionava a quantidade de quitosana adicionada à suspensão e seus respectivos valores de potencial ζ e de raio hidrodinâmico, os parâmetros considerados inteiramente satisfatórios foram para uma razão $[quitosana]/[nanopartículas] = 2$.

Foram analisadas suspensões aquosas do copolímero PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ (C3), C3 decorado com quitosana oligossacarídeo (C3/CS-oligo) e C3 decorado com quitosana de $M_v = 37000$ g/mol (C3/CS-37). Em (1) as nanopartículas estão a uma concentração de aproximadamente 0,2 mg/mL e a quitosana a uma concentração de 0,4 mg/mL na mistura; em (2) foi efetuada uma diluição de 10 vezes. Durante os experimentos o pH das formulações variou entre 5 e 6.

Os resultados para este sistema mostram claramente que todas as amostras analisadas apresentaram um único tempo de relaxação, ausência de agregados e um baixo índice de polidispersão (entre 0,06 e 0,15). Para as nanopartículas não decoradas ocorreu uma diminuição no valor do potencial ζ após a diluição, uma vez que este parâmetro é dependente também da concentração. Durante os experimentos de potencial ζ , sob a ação de um campo elétrico, as nanopartículas migram em direção ao eletrodo de carga oposta com uma velocidade proporcional à magnitude do potencial ζ . Se a velocidade das nanopartículas em suspensão está relacionada com sua concentração, estima-se que em suspensões mais diluídas os valores de potencial ζ assumem magnitudes maiores.

A decoração das nanopartículas com quitosana oligossacarídeo não alterou o tamanho nem tampouco o PDI das nanopartículas, porém uma inversão de carga para valores de potencial ζ positivo evidenciam que o processo de decoração foi efetivo, e mais uma vez a magnitude de potencial ζ aumenta com a diluição. Para a quitosana de maior massa molar, observou-se uma variação no tamanho e polidispersão do sistema, comparada às nanopartículas C3, foi verificado um aumento de 8,5 nm no R_H acompanhado de valores positivos de potencial ζ , após a diluição as nanopartículas apresentaram uma ligeira diminuição no R_H e neste caso o potencial zeta ficou praticamente inalterado, com diferenças que se encontram dentro das incertezas experimentais.

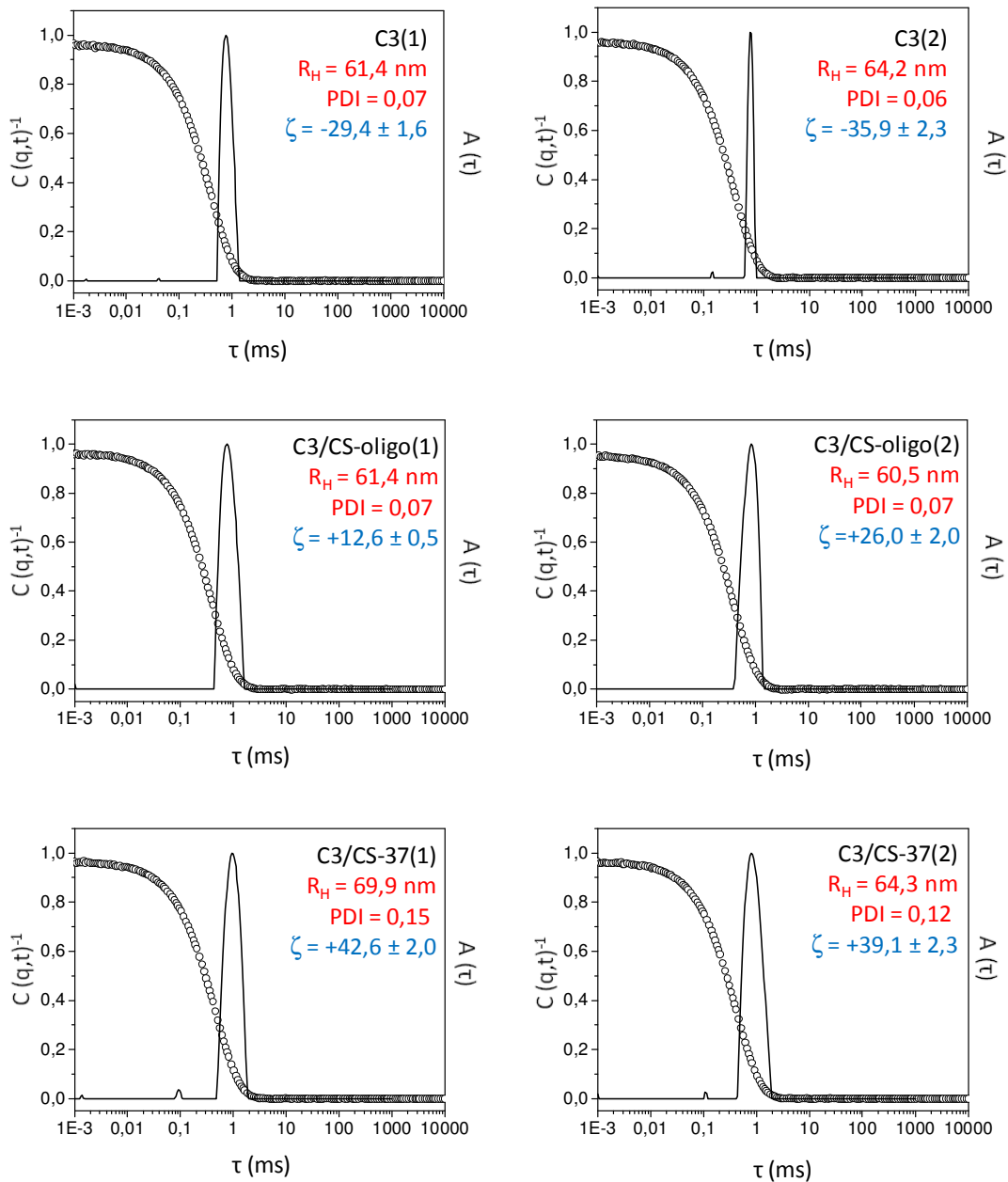


Figura 4.16. Função de correlação $C(q,t)$ e distribuição dos tempos de relaxação obtidos à 90° , respectivos valores de raio hidrodinâmico (R_H), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ζ) para suspensões aquosas do copolímero C3, C3 decorado com as quitosanas oligossacarídeo (C3/CS-oligo) e quitosana ($M_v = 37000$ g/mol) (C3/CS-37). Condições experimentais: (1) $[CH]/[C3] = 2$ e (2) após uma diluição de 10 vezes.

As suspensões aquosas do copolímero PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ (C7) também foram analisadas nas mesmas condições experimentais (Figura 4.17). Para este sistema observou-se um maior índice de polidispersão, que variaram entre 0,10 e 0,20, porém praticamente todas as amostras apresentaram um único tempo de relaxação, podendo se considerar que o sistema apresenta uma estreita faixa de distribuição de tamanho. A magnitude do potencial ζ para este sistema também é maior, provavelmente devido ao maior grau de polimerização das cadeias de PAA. Para as nanopartículas não decoradas a diluição causou um aumento no R_H acompanhado de um ligeiro aumento na magnitude do potencial ζ . Interessantemente o processo de decoração com a quitosana oligossacarídeo provocou uma diminuição do R_H médio, acompanhado do potencial ζ positivo (de maior magnitude comparada às nanopartículas C3 decoradas com CS-oligo, porém a diluição praticamente não altera as suas características. A decoração das nanopartículas com a quitosana de maior massa molar foi agora acompanhada de um aumento no R_H e potencial ζ , porém a diluição foi acompanhada de uma redução significativa no R_H , porém o potencial ζ se manteve positivo.

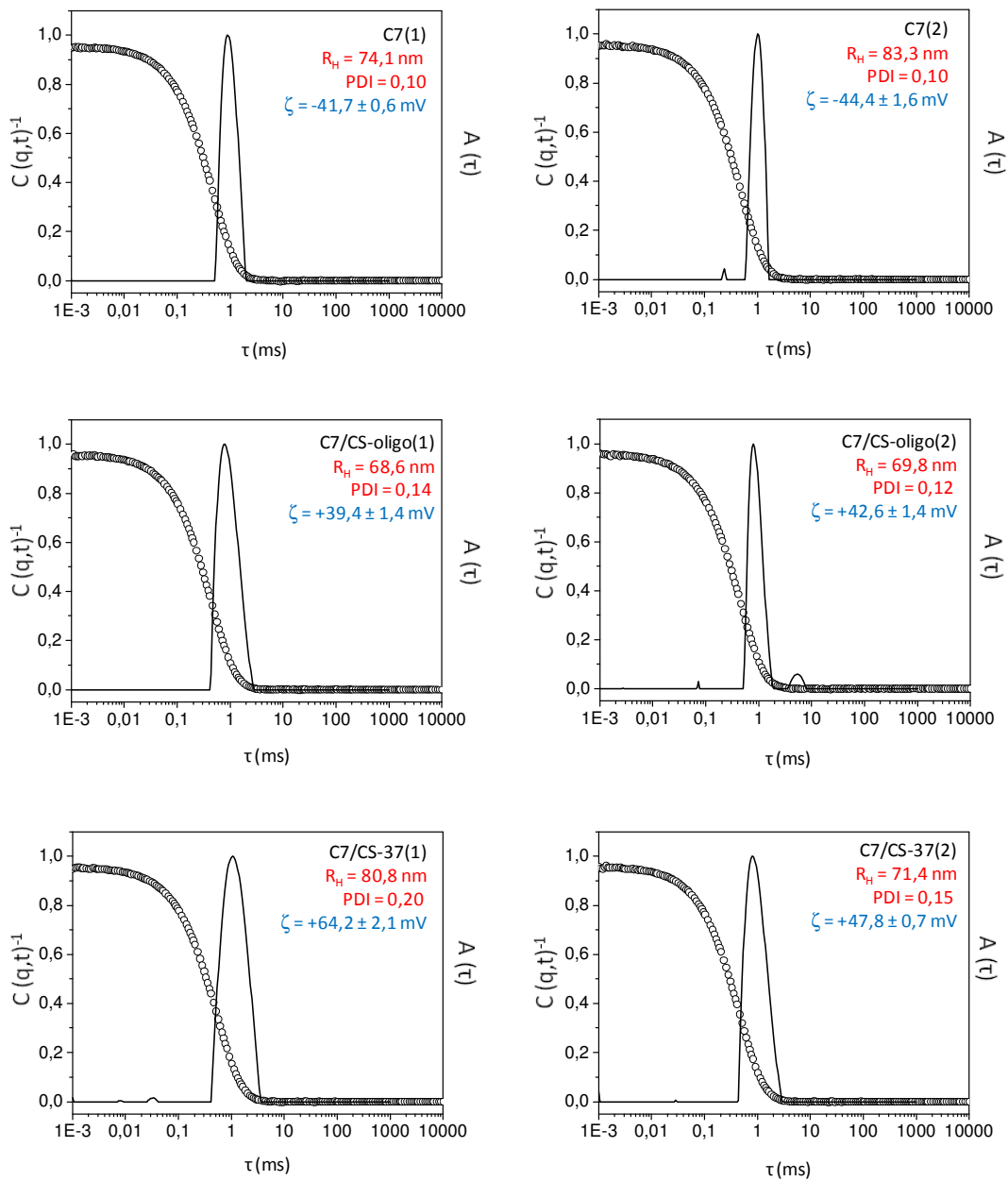


Figura 4.17. Função de correlação $C(q,t)$ e distribuição dos tempos de relaxação obtidos à 90° , respectivos valores de raio hidrodinâmico (R_H), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ζ) para suspensões aquosas do copolímero C7, C7 decorado com as quitosanas oligossacarídeo (C7/CS-oligo) e quitosana ($M_v = 37000$ g/mol) (C7/CS-37). Condições experimentais: (1) $[CH]/[C7] = 2$ e (2) após uma diluição de 10 vezes.

Para mais uma vez dar ênfase a decoração das nanopartículas com as quitosanas, a superfície das mesmas foi observada por técnicas de imagem como crio-microscopia eletrônica de transmissão (cryo-TEM), a microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (SEM-FEG).

Por cryo-TEM não foi possível verificar diferenças entre as nanopartículas após o processo de decoração. Sabe-se que o R_H pouco varia com a adsorção da quitosana na superfície das nanopartículas, principalmente para a quitosana oligossacarídeo e que independente da quantidade de quitosana que é adicionada a suspensão de nanopartículas existe um limite de adsorção que não supera um aumento de 15% no diâmetro das nanopartículas, além disso, a ausência de contraste a nível superficial e a sensibilidade da amostra, dificultaram a observação. A Figura 4.18 mostra as micrografias para as nanopartículas C7 (A) e C7 decorada com quitosana de maior massa molar em (B).

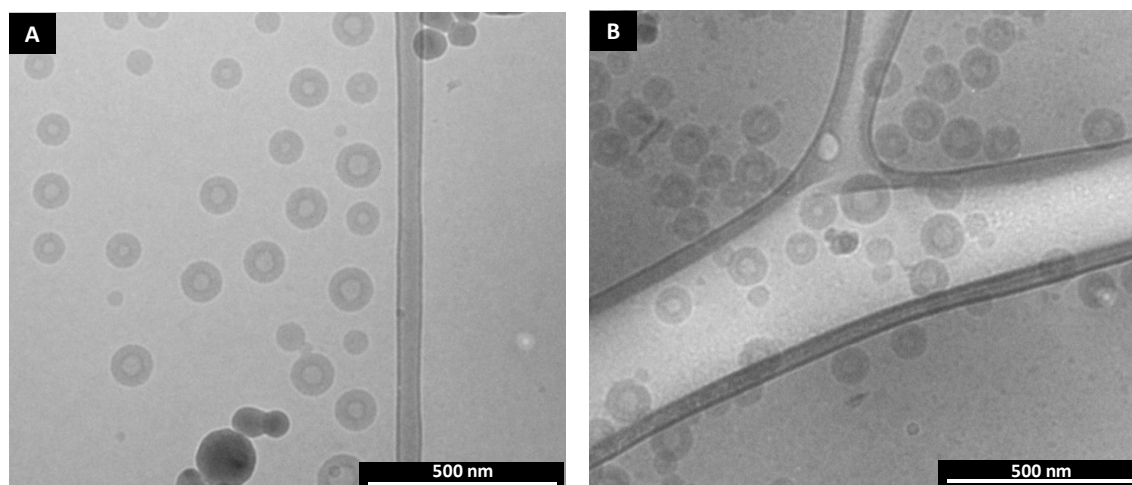


Figura 4.18. Micrografia de cryo-TEM em alta magnificação para as nanopartículas do copolímero C7 (A) e C7 decoradas com quitosana CS-37 (B).

As nanopartículas C3 e C7 na ausência e presença de quitosana adsorvida na superfície, também foram observadas por TEM em alta magnificação, cujas amostras foram observada a frio, para evitar problemas devido a sensibilidade ao feixe de elétrons (Figura 4.19).

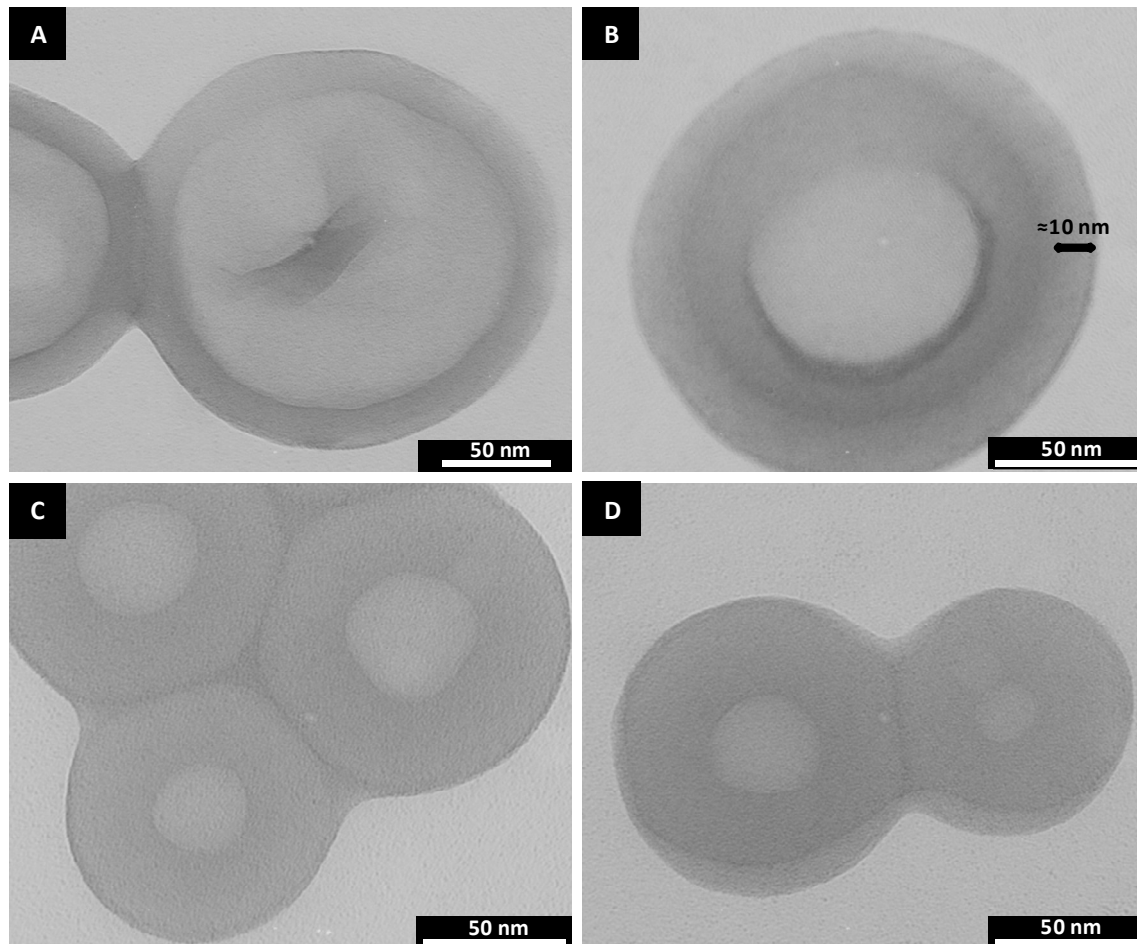


Figura 4.19. Micrografia de TEM em alta magnificação para as nanopartículas do copolímero C3 (A) e C3 decoradas com quitosana CS-37, evidenciando uma camada de absorção de aproximadamente 10 nm (B), C7 (C) e C7 decorada com CS-37 (D).

Foi possível observar a camada de quitosana adsorvida sobre a superfície das nanopartículas decoradas, e que a adsorção não ocorre de maneira uniforme. A espessura da camada de quitosana (CS-37) adsorvida na superfície da nanopartícula foi em média de 10 nm (Figura 4.19 B).

A adsorção do polieletrólito sobre a superfície das nanopartículas também foi comprovada por imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (Figura 4.20), evidenciando as diferenças a nível superficial observadas para as nanopartículas do copolímero C7 após a adição de quitosana. Pode-se observar que a adsorção de quitosana sobre as nanopartículas tornou a superfície mais rugosa quando comparada à superfície das nanopartículas não decoradas. De fato, a adsorção das cadeias do polieletrólito sobre as nanopartículas coloidais de carga oposta resulta em uma distribuição não uniforme sobre a superfície, como observado por imagens de TEM.

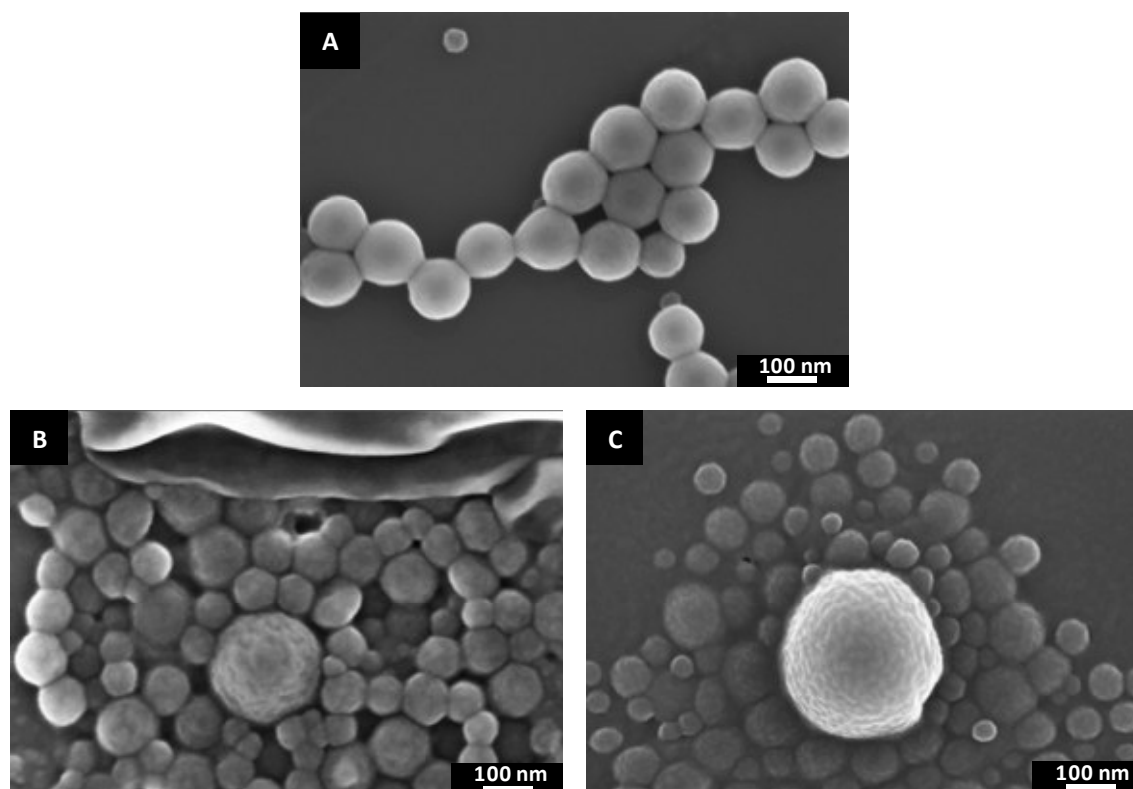


Figura 4.20. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo. As imagens em alta resolução evidenciam as diferenças a nível de superfície para as nanopartículas preparadas a partir do copolímero em bloco PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ (C7), antes (A) e após a decoração com CS-oligo (B) ou com CS-37 (C).

4.4. Conclusões

Através do método de co-solvente seguido de diálise foi possível obter nanopartículas na forma de vesículas poliméricas a partir do copolímero em bloco PS-*b*-PAA com diferentes graus de polimerização. Dimensões inferiores à 200 nm, com um baixo índice de polidispersão, foram observadas por medidas de espalhamento de luz dinâmico e por técnicas de imagem. Após definidas as condições experimentais necessárias para o controle

do tamanho e morfologia, o trabalho foi direcionado à adsorção de cadeias de quitosana sobre a superfície das nanopartículas em suspensão aquosa através de interações eletrostáticas. Após o processo de decoração foi possível verificar características dos sistemas PS-*b*-PAA/chitosana como, tamanho, carga e morfologia. Os resultados mostram claramente nanoestruturas do tipo vesiculares, com uma estreita faixa de distribuição de tamanho. Este sistema, portanto, permite a encapsulação de princípios ativos pouco solúveis, na camada hidrofóbica bem como, de princípios ativos hidrofílicos na cavidade interna. Além disso, as propriedades de superfície proporcionam ao sistema maior probabilidade de vetorização a alvos específicos.

4.5. Referências

BRUGNEROTTO J.; DESBRIERES J.; ROBERTS G.; RINAUDO M. Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. **Polymer**, v. 42, p. 9921-9927, 2001.

CHOUCAIR, A.; LAVIGUEUR, C.; EISENBERG, A. Polystyrene-*b*-poly(acrylic acid) Vesicle Size Control Using Solution Properties and Hydrophilic Block Length. **Langmuir**, v. 20, p. 3894-3900, 2004.

DISCHER, B. M.; WON, Y-Y.; EGE, D. S.; LEE, J. C-M.; BATES, F.S.; DISCHER, D. E.; HAMER, D. A. Polymersomes: Tough Vesicles Made from Diblock Copolymers. **Science**, v. 284, p.1143-1146, 1990.

DONG, R.; LINDAU, M.; OBER, C. K. Dissociation Behavior of Weak Polyelectrolyte Brushes on a Planar Surface. **Langmuir**, v. 25, p. 4774–4779, 2009.

DELGADO, A. V.; GONZALEZ-CABALLERO, F.; HUNTER, R. J.; KOOPAL, L. K.; LYKLEMA, J. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 309, p. 194–224, 2007.

MA, L.; EISENBERG, A. Relationship between Wall Thickness and Size in Block Copolymer Vesicles. **Langmuir**, v. 25, p. 13730–13736, 2009.

MAI, Y.; EISENBERG, A. Controlled Incorporation of Particles into the Central Portion of Vesicle Walls. **Journal of American Chemical Society**, v. 132, p. 10078–10084, 2010.

MENG, F.; ZHONG, Z.; FEIJEN, J. Stimuli-Responsive Polymersomes for Programmed Drug Delivery. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 197-209, 2009.

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.

SCHÄRTL, W. **Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions**. Germany: Springer Laboratory, 2007.

ZHANG, L.; EISENBERG, A. Formation of crew-cut aggregates of various morphologies from amphiphilic block copolymers in solution. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 9, p. 677-699, 1998.

CAPÍTULO 5

PERMEAÇÃO CUTÂNEA DA FINASTERIDA ENCAPSULADA NO SISTEMA NANOPARTÍCULA/QUITOSANA

CONSIDERAÇÕES PRELIMINARES

Os sistemas nanopartícula/quitosana também foram testados quanto à viabilidade para a encapsulação de um princípio ativo hidrofóbico, a finasterida, um medicamento inibidor da enzima 5- α -redutase, que vem sendo indicado para o tratamento de homens com padrão masculino de perda de cabelo (alopécia androgenética). Reportaremos estudos demonstrando a eficiência de encapsulação, as características físico-químicas das nanopartículas após a encapsulação do fármaco, bem como um estudo de permeação cutânea da finasterida, através de pele de orelha suína (modelo *in vitro*), com o intuito de se obter um novo sistema de liberação transdérmica para o fármaco utilizando as nanopartículas a base de poliestireno e poli(ácido acrílico) (PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ e PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃) decoradas com quitosana.

Publicação: *Skin permeation of finasteride loaded chitosan-decorated polystyrene-b-poly (acrylic acid) polymersomes.*

5.1. Materiais

Os copolímeros em bloco a base de poliestireno e poli(ácido acrílico) ($PS_{139}-b-PAA_{17}$ e $PS_{404}-b-PAA_{63}$), foram comprados diretamente da Polymer Source Inc. (Canadá) e as quitosanas foram adquiridas da Sigma-Aldrich. As características destes materiais foram previamente descritas no item 4.1. A finasterida, N-(2-metil-2-propil)-3-oxo-4-aza-5 α -androst-1-eno-17B carboxamida, padrão USP foi adquirida pela Manufacture U. S. Pharmacopeia (LOT F1E139 USP Reference Standard) e a finasterida matéria-prima foi fornecida pela DEG – Lote 090611. Para os testes de permeabilidade foram utilizadas pele de orelhas suínas que foram obtidas de um abatedouro local situado na cidade de Antônio Carlos, SC.

5.2. Metodologia

5.2.1. Preparação das nanopartículas encapsuladas com finasterida

Os correspondentes copolímeros ($PS_{139}-b-PAA_{17}$ e $PS_{404}-b-PAA_{63}$, aqui denominados C3 e C7, respectivamente) e a finasterida (FIN), foram separadamente dissolvidos em 1,4-dioxano, a uma concentração de 0,5 %, permanecendo sob agitação constante até completa solubilização. Para a preparação das soluções poliméricas contendo FIN a solução do fármaco foi pipetada e adicionada à solução de $PS_n-b-PAA_m$ a 0,5 % de modo que a concentração de FIN na mistura foi de 0,02%. A encapsulação da finasterida ocorreu durante a formação das vesículas poliméricas pela adição de água milli-Q® à solução contendo copolímero/fármaco em dioxano, sob condições controladas (taxa de 250 μ L/h e agitação magnética constante de 1000 rpm) até a proporção de 50/50 1,4-dioxano/água. Durante a

adição de água, as partes hidrofóbicas do copolímero se associam de maneira a minimizar o contato com água, e o fármaco é segregado no domínio polimérico mais favorável, o bloco hidrofóbico PS. Após a adição de água a suspensão permaneceu sob agitação e em seguida água em excesso (equivalente a dez vezes o volume da suspensão) foi adicionada. A suspensão foi em seguida filtrada com filtro de acetato de celulose de 1,2 μm e concentrada a $\frac{1}{4}$ do volume à evaporação sob pressão reduzida para a eliminação do solvente orgânico. Considerando que a proporção de solvente orgânico/água é de 1/20 e que a pressão de vapor do dioxano é aproximadamente o dobro da pressão de vapor da água pura, considera-se que a taxa de solvente orgânico remanescente foi inferior a 1%.

O procedimento para a decoração das nanopartículas foi o mesmo utilizado no item 4.2.1. O pH final das formulações foi em torno de 5.0 e a concentração final estimada de nanopartículas e de finasterida nas suspensões aquosas foi de 1 mg/mL e 0,04 mg/mL, respectivamente.

5.2.2. Determinação do teor e da eficiência de encapsulação da finasterida nas suspensões de nanopartículas

O doseamento da FIN nas amostras foi realizado em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC-10A incluindo uma bomba LC-10AD, equipado com um detector UV/VIS SPD-10AV, unidade controladora SCL-10Av, injetor de amostras Rheodyne 7125 e workstation Class VP. As análises foram realizadas em sistema de fase reversa e modo isocrático, nas seguintes condições: coluna Phenomenex Luna[®] C18 (150 mm x 4.6 mm I.D., com um tamanho de partícula de 5 μm e tamanho de poro de 100 Å), (Torrance, USA); a fase

móvel utilizada foi acetonitrila : água (60 : 40, v/v); fluxo de 1,0 mL/min; volume de injeção correspondente a 20 µL e detecção no ultravioleta em 210 nm.

5.2.2.1. Validação do método cromatográfico

Os parâmetros de desempenho analítico, para a validação da metodologia empregada para a quantificação do fármaco finasterida, avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram: especificidade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão, e robustez (ICH, 2005).

Especificidade: A especificidade do método foi avaliada através da análise das suspensões das nanopartículas na ausência do fármaco nas mesmas circunstâncias experimentais das amostras na presença do fármaco, a fim de se avaliar o grau de interferência dos copolímeros utilizados na preparação das nanopartículas (PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ e PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇) na quantificação da finasterida. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Linearidade, Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ): A linearidade corresponde à capacidade do método em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de um dado intervalo. A linearidade do método foi avaliada através da construção de uma curva de calibração a partir de cinco concentrações padrão de FIN (2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL) preparadas em fase móvel. As soluções foram injetadas no cromatógrafo líquido em triplicata, e as médias das áreas referentes a cada concentração foram plotadas em gráfico de concentração *versus* área. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

O limite de detecção (LD) corresponde à menor concentração presente na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração que pode ser determinada quantitativamente com aceitável precisão e exatidão. Estes valores foram calculados a partir da curva de calibração utilizando as equações (5.1) e (5.2), onde δ é o desvio padrão do intercepto das três curvas lineares e S inclinação da curva média de calibração, conforme preconizado pela ICH (2005). Os LD e de LQ foram confirmados em uma análise experimental.

$$LD = (3,3\delta/S) \quad (5.1)$$

$$LQ = (10\delta/S) \quad (5.2)$$

Precisão: A precisão do método, que expressa a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas da mesma amostra, foi avaliada por meio da repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia), expressos em coeficiente de variação percentual, obtidos durante análises quantitativas das amostras. A repetibilidade foi avaliada analisando 6 amostras de nanopartículas contendo 6 $\mu\text{g/mL}$ de FIN no mesmo dia, nas mesmas condições experimentais. Na precisão intermediária as análises foram realizadas em três dias diferentes. De maneira geral, para análises de formas farmacêuticas, desvio padrão relativo entre 1,0 e 2,0 % normalmente é considerado satisfatório (SHABIR, 2003).

Exatidão: Expressa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados pelo método e um valor verdadeiro ou aceito como referência (ICH, 2005). A recuperação foi determinada como sendo a diferença percentual entre a concentração experimental média e a concentração teórica em três concentrações diferentes de nanopartículas contendo FIN (4, 6 e 8 $\mu\text{g/mL}$). Cada concentração foi analisada em triplicata.

Robustez: A robustez foi avaliada pela determinação do teor de FIN sob pequenas variações nas condições cromatográficas, incluindo variação na proporção dos solventes da fase móvel, temperatura e fluxo.

5.2.2.2. Doseamento da Finasterida nas suspensões aquosas de nanopartículas

A eficiência de encapsulação (%) e o teor do fármaco foram estimados após a determinação da concentração de FIN nas suspensões de nanopartículas por CLAE. A eficiência de encapsulação foi estimada por ser a diferença entre a concentração total de FIN encontrada na suspensão de nanopartículas após a sua completa dissolução em fase móvel e a concentração do fármaco no sobrenadante obtido pelo procedimento de ultrafiltração/centrifugação das nanopartículas utilizando uma membrana de filtração Amicon-Ultra-0,5 (Celulose regenerada, corte (NMWL) de 100 KDA, Millipore Corp., USA), a 4500 rpm durante 30 minutos. O teor do fármaco nas suspensões foi expresso em concentração percentual.

5.2.3. Determinação de tamanho da partícula e potencial zeta

O diâmetro médio das nanopartículas em suspensão foi determinado através de medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) utilizando um equipamento ALV-CGS 8F S/N 069, em diferentes ângulos (de 40° a 140°) em intervalos de 10° durante 300 s.

O potencial zeta foi medido através da mobilidade eletroforética, utilizando-se equipamento Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, France).

5.2.4. Avaliação morfológica

A morfologia das amostras foi analisada em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-1011 (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC) operando a uma voltagem de aceleração de 80 kV. A preparação da amostra consistiu da deposição direta de 4µL da suspensão aquosa, a uma diluição previamente estimada **em água Milli-Q®**, sobre grades de cobre revestidas com uma fina camada de carbono. As amostras foram secas em ar à temperatura ambiente.

5.2.5. Estudos de permeação cutânea da Finasterida

A permeabilidade da finasterida foi avaliada através do modelo *in vitro* da câmara de difusão de Franz (Figura 5.1). Para tal, utilizou-se a pele de porco como modelo de membrana, devido à similaridade com a pele humana, tanto em relação a composição lipídica quanto as propriedades biofísicas do estrato córneo (DICK & SCOTT, 1992; GUANG-JIAN & YAO, 2009). Após definir a região do tecido de interesse (CAON et al., 2010), o mesmo foi disposto na interface dos compartimentos doador e receptor. O primeiro foi preenchido com 2 mL da solução hidroalcoólica do fármaco 50% ou uma suspensão de nanopartículas onde o fármaco foi incorporado. O compartimento receptor foi preenchido com 10 mL de uma solução 30/70 de etanol/tampão fosfato, proporção esta definida de modo a obter uma condição *sink*. O tecido foi disposto com a epiderme voltada para o compartimento doador e a derme para o compartimento receptor. A solução no compartimento receptor foi mantida à temperatura de 37°C com o auxílio de um banho termostático e sob agitação magnética constante (cerca de 900 rpm) com o objetivo de manter a concentração do fármaco uniforme. Em intervalos pré-determinados, coletaram-se

alíquotas de 400 μL do compartimento receptor, com reposição. As alíquotas retiradas foram imediatamente analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e, na seqüência, efetuou-se o cálculo de parâmetros de permeabilidade, tais como o coeficiente de permeabilidade, fluxo e tempo de latência. Estes cálculos foram feitos fundamentando-se nas Leis de Fick e os resultados foram representados graficamente pela relação da quantidade permeada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo. O tempo de duração do experimento foi definido como 24h. Todos os experimentos foram realizados, no mínimo em triplicata.

Ao final do experimento, efetuou-se um balanço de massa final, em que foram confrontadas a quantidade de fármaco permeada, retida e remanescente no compartimento doador. Para a análise da quantidade retida, separou-se derme de epiderme e, em seguida procedeu-se com a adição de 3 mL de solvente extrator (metanol). Após um dia do contato do líquido extrator com o tecido, as amostras foram agitadas mecanicamente em “vortex” (5 min) e centrifugadas (remoção de interferentes da pele).

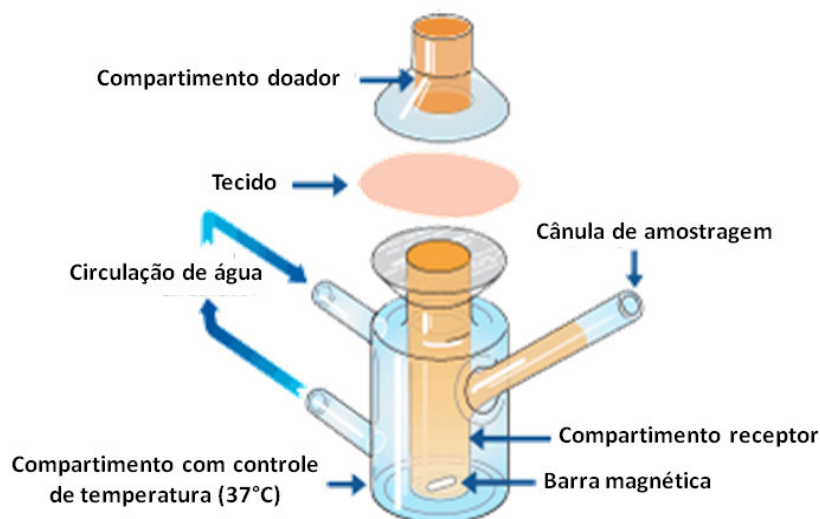


Figura 5.1. Esquema representativo da câmara de difusão de Franz (PERMEGEAR, INC. disponível em <http://www.permegear.com/franz.htm>).

O coeficiente de permeabilidade foi calculado a partir da relação: $P = \frac{dQ/dt}{A \times C_d}$, onde A corresponde a superfície da área de difusão, dQ/dt corresponde a quantidade de fármaco que permeou por unidade de tempo e C_d corresponde a concentração do fármaco no compartimento superior.

O estado de fluxo constante foi obtido através do produto entre o coeficiente de permeabilidade e a concentração inicial do fármaco no compartimento doador, ou ainda, pelo coeficiente angular da reta que relaciona a quantidade permeada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) em função do tempo (h).

O tempo de latência definido como o tempo necessário para que a passagem de um composto através de uma membrana atinja o equilíbrio, foi calculado a partir da extrapolação da linha do estado estacionário.

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Validação da metodologia empregada para a quantificação da finasterida

Com o intuito de garantir a confiabilidade dos resultados analíticos foram determinados os principais parâmetros de validação da metodologia analítica (especificidade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão, e robustez) empregando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificar a FIN nas nanopartículas preparadas a partir dos copolímeros $\text{PS}_{139}\text{-}b\text{-PAA}_{17}$ e $\text{PS}_{404}\text{-}b\text{-PAA}_{63}$.

Nas condições experimentais otimizadas o cromatograma da FIN apresenta um único e

definido pico do fármaco com tempo de retenção em aproximadamente 3 minutos. A especificidade do método analisada a partir das nanopartículas na ausência do fármaco mostrou que o método foi específico e nenhuma interferência foi detectada em 210 nm, nas condições cromatográficas empregadas.

A curva de calibração da FIN apresentou-se linear na faixa de concentração de 2,0 a 10,0 µg/mL com coeficiente de correlação (r) de 0,9992. A equação da reta ($n = 3$) determinada através da regressão linear é $y = 45.370x - 5.288,5$ e os desvios padrão da inclinação e do intercepto foram $\pm 526,2$ e $\pm 4398,0$, respectivamente. Os limites de confiança do intercepto calculados ficaram entre $- 20.918,00$ a $10.341,06$. Como estes limites incluem o valor zero, é possível concluir a ausência de erro sistemático constante, onde o fator de variação é independente da concentração dos componentes analisados (FUNCK *et al.*, 1992). A validade do ensaio foi verificada pela análise de variância (ANOVA) e evidenciou a linearidade do método, na faixa de concentração testada ($F_{\text{calculado}} = 3.755,13 > F_{\text{crítico}} = 9,57; P < 0,05$).

A análise dos resíduos, definida como a diferença entre os valores das áreas dos picos calculados e os encontrados experimentalmente, também fornecem informações relevantes. Um gráfico de concentração versus resíduo deve apresentar pontos que variam em torno do eixo das abscissas para descartar a presença de tendência dos resultados. A análise dos resíduos, realizada com os dados da curva de calibração da FIN, demonstrou pontos distribuídos em torno do eixo das abscissas (Figura 5.2) provando que a metodologia de CLAE utilizada mostrou-se satisfatória na faixa de concentração analisada.

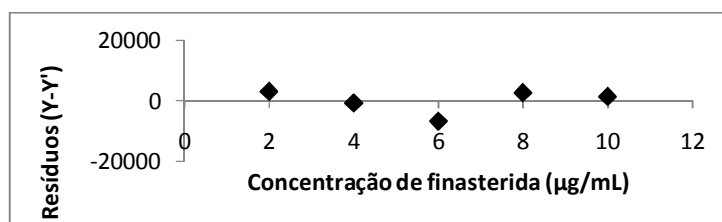


Figura 5.2. Análise dos resíduos da curva de calibração da finasterida obtida por CLAE.

Os valores de limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram respectivamente, 0,16 e 0,5 µg/mL, indicando que o método apresenta-se suficientemente sensível para quantificação da finasterida.

Para o método desenvolvido a precisão das amostras foi analisada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. Estes parâmetros foram avaliados através do valor de coeficiente de variação percentual obtido durante análises quantitativas das amostras, mostrando-se satisfatórios para ambos os níveis, pois estes se apresentaram inferiores a 5,0 %. As quantidades de finasterida analisadas nos três dias consecutivos foram equivalentes para as formulações desenvolvidas ($P < 0,05$).

A exatidão do método foi avaliada utilizando as suspensões das nanopartículas dos copolímeros C3 e C7 na presença das quitosanas, encapsuladas com FIN. A recuperação foi determinada como a diferença percentual da concentração experimental média e a concentração teórica em três concentrações diferentes 4, 6 e 8 µg/mL e os resultados evidenciam uma recuperação adequada para o método estudado entre 95% e 103,2%.

Por último, a robustez do método foi investigada a partir ligeiras variações nas condições de análise (composição da fase móvel, temperatura). Estes parâmetros não

afetaram significativamente os ensaios analíticos, nem o desempenho cromatográfico. Portanto, a robustez evidenciada pelo método possibilita a sua transposição para outros laboratórios.

O método desenvolvido e validado provou ser específico, linear, exato, preciso e robusto. A confiabilidade do método de cromatografia líquida de fase reversa foi satisfatória para quantificação de finasterida nas nanopartículas.

5.3.2. Eficiência de encapsulação e teor de finasterida nas suspensões

Os resultados da validação do método analítico provaram que a metodologia escolhida foi capaz de quantificar o fármaco finasterida com confiabilidade a partir das suspensões de nanopartículas dos copolímeros PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ e PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃, C3 e C7, respectivamente.

A concentração de FIN nas nanopartículas foi primeiramente otimizada após testes variando-se a quantidade inicial do fármaco adicionado às formulações. A Tabela 5.1 resume os resultados obtidos para as nanopartículas C3 com diferentes concentrações de FIN, cujos valores investigados foram entre 0,01 e 1%. Resultados similares foram obtidos para as nanopartículas C7 e não serão, portanto, reportados. Quando 0,02% do fármaco foram utilizados nas formulações obteve-se a melhor EE (89,3%) e uma taxa de recuperação de 85%, que foi estimada confrontando-se a quantidade de FIN determinada experimentalmente com a quantidade inicialmente adicionada à formulação. Sabe-se que a incorporação da FIN nas nanopartículas ocorreu durante a adição de água à solução combinada de copolímero/fármaco, onde a FIN é segregada para o bloco hidrofóbico PS. Neste caso, quando a concentração da FIN foi superior a 0,05% observou-se a precipitação

do fármaco, juntamente com a formação de agregados, sugerindo um excesso de finasterida na formulação, que resultou em uma diminuição da EE. Portanto, a concentração de FIN selecionada para as formulações foi a de 0,02%, cujos resultados foram considerados satisfatórios. É importante salientar que esta concentração corresponde à concentração inicial da FIN na mistura copolímero/fármaco. Após o processo de formação das nanopartículas que ocorre pela adição de água ao sistema seguido da evaporação do solvente orgânico, esta concentração sofre alterações.

Tabela 5.1. Efeito da quantidade inicial de finasterida sobre os parâmetros físico-químicos das nanopartículas formadas pelo copolímero C3.

Concentração de FIN (%)	Teor ($\mu\text{g/mL}$)	EE (%)
0,01	20,2	64,2
0,02	34,0	89,3
0,05	87,0	57,8
0,08	121,8	34,5
1,00	104,8	36,4

Serão reportados apenas os resultados de EE (%) e do teor do fármaco determinados apenas para as suspensões das nanopartículas C3 e C7, uma vez que para a decoração das nanopartículas com a quitosana oligossacarídeo (CS-oligo) ou a com quitosana de massa molar viscosimétrica 37000 g/mol (CS-37) foram empregadas nanopartículas previamente quantificadas, facilitando assim uma futura análise comparativa. A eficiência de

encapsulação e o teor máximo e mínimo encontrados para o sistema C3 e C7 estão resumidos na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Efeito da composição da formulação sobre o teor e a eficiência de encapsulação (EE) da finasterida.

	Teor ($\mu\text{g/mL}$)	EE (%)
C3	35,3 – 46,0	78 - 95.
C7	29,6 – 37,2	62 - 94.

5.3.3. Características físico-químicas das nanopartículas encapsuladas

O processo de encapsulação das nanopartículas com a finasterida não promoveu nenhuma alteração morfológica, quando comparada às nanopartículas na ausência do fármaco. A morfologia das nanopartículas foi avaliada por microscopia eletrônica em transmissão (TEM), evidenciando a formação de vesículas poliméricas bem definidas.

O processo de decoração das nanopartículas com as quitosanas CS-oligo e CS-37 foi realizado como previamente detalhado no Capítulo 4. A concentração de quitosana adicionada às suspensões das nanopartículas foi cerca do dobro da concentração das nanopartículas, que foi estimada como sendo suficiente para garantir que as nanopartículas permaneçam recobertas com o polissacarídeo, mesmo após diluições, fato evidenciado pela conversão do potencial zeta para positivo.

A Figura 5.3 mostra as micrografias de TEM para uma nanopartícula constituída por C7 encapsulada com FIN (A), C7 decorada com CS-oligo em (B) e C7 decorada com CS-37 em (C). Em (A) é possível observar, com nitidez, um número significativo de pequenos pontos pretos no interior da nanopartícula, distribuídos na camada hidrofóbica (PS), bem como na interface PS/PAA, que foram associados ao fármaco FIN. As imagens também claramente evidenciam uma diferença de contraste eletrônico na superfície das nanopartículas na presença do polissacarídeo (B e C). É preciso enfatizar que esta camada não pode ser considerada como sendo do bloco hidrofílico PAA, pois parte-se do princípio que o contraste eletrônico do PS é muito maior do que o do PAA, que freqüentemente não é visível nas imagens de TEM, como demonstrado em (A), (MAI & EISENBERG, 2010).

Embora as nanopartículas aqui tomadas como exemplo não representem o tamanho médio determinado por DLS, é possível, porém, observar um ligeiro aumento no diâmetro das nanopartículas após a decoração com a quitosana. Além disso, a diferença na massa molar de quitosana não promoveu uma diferença estatisticamente relevante na espessura da camada de revestimento na superfície das nanopartículas.

A partir das micrografias, pôde-se estimar grosseiramente a espessura da camada de quitosana adsorvida na superfície das nanopartículas; para tal utilizou-se uma média de 100 determinações, intra e inter partícula. A distribuição das cadeias do polieletrólito sobre a superfície das nanopartículas não é uniforme, apresentando uma pequena variação na espessura em torno da nanopartícula. A camada de quitosana seja a CS-oligo ou a CS-37 adsorvida sobre as nanopartículas preparadas a partir do C7 foi de aproximadamente 7 ± 2 nm, correspondendo a um aumento no diâmetro da partícula máximo de 15%.

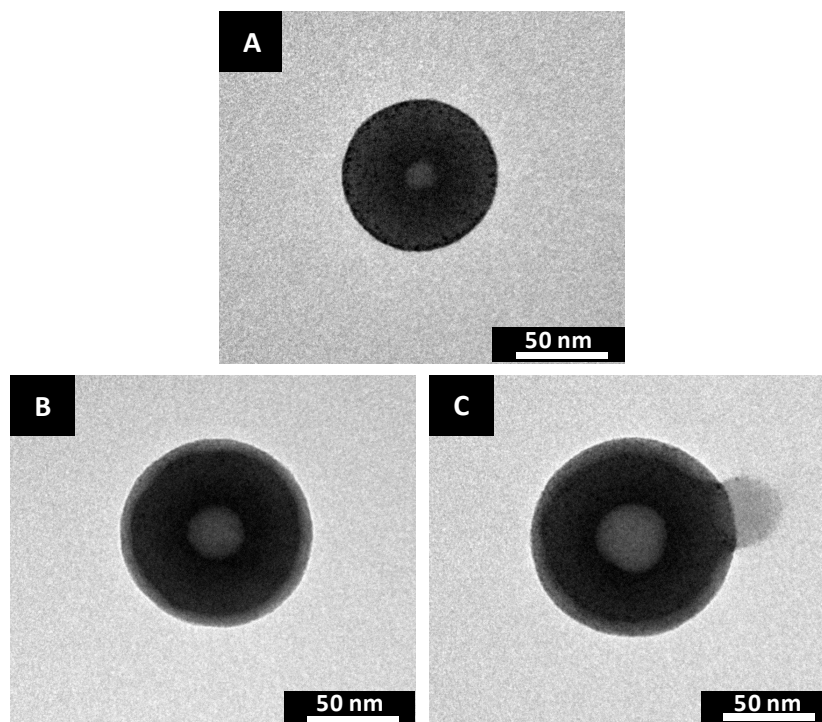


Figura 5.3. Imagens de TEM para as nanopartículas de PS_{404} -b- PAA_{63} (C7) (A), C7 decorada com quitosana oligossacarídeo (C7/CS-oligo) (B) e C7 decorada com quitosana $M_v = 37000$ g/mol (C7/CS-37) (C), ambas encapsuladas com finasterida.

De maneira similar, as nanopartículas formadas pelo copolímero C3 na presença de FIN também foram analisadas por TEM. Nenhuma alteração morfológica foi observada, porém o diâmetro médio observado por TEM foi consideravelmente maior do que aquele previamente observado antes do processo de encapsulação. A Figura 5.4 ilustra uma nanopartícula preparada por C3 com FIN na presença de quitosana. Observa-se claramente a decoração da nanopartícula pelo polieletrólito, porém de modo geral, para este sistema a camada de quitosana adsorvida na superfície foi menos evidente por TEM comparado ao sistema C7. Considerando que o processo de decoração ocorre devido às interações eletrostáticas entre o bloco hidrofílico PAA e o polissacarídeo, este comportamento pode ser

justificado pelas diferenças entre o grau de polimerização do PAA nos dois sistemas: 17 para o sistema C3 e 63 para o sistema C7.

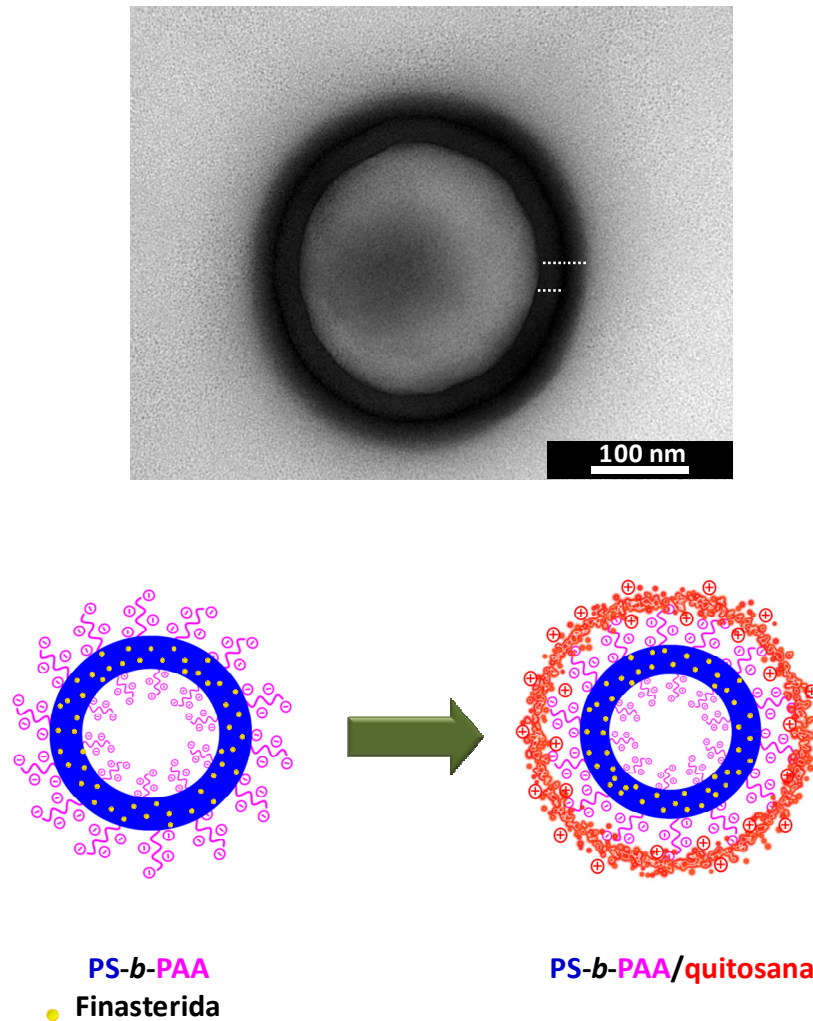


Figura 5.4. Imagens de TEM para uma nanopartícula de PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ (C3) encapsulada com finasterida e decorada com quitosana oligossacarídeo (CS-oligo) acompanhada da respectiva representação esquemática.

Para uma avaliação mais precisa tanto em relação às dimensões e polidispersão do sistema após o processo de encapsulação, bem como uma análise da estrutura interna das nanopartículas, medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) também foram efetuados.

Os dados de análise CONTIN do espalhamento de luz mostram picos de agregados após o processo de encapsulação para todos os sistemas, este comportamento pode ser devido a uma desestabilização do sistema causado pela presença do fármaco hidrofóbico. As nanopartículas preparadas pelo copolímero C3 apresentam tamanhos significativamente maiores após o processo de encapsulação com R_H de 101 nm, como corroborado pelas imagens de TEM. Já o sistema C7 após o processo de encapsulação apresenta um valor de R_H de 68 nm, ou seja, não apresentou diferenças estatisticamente relevantes nas dimensões das nanopartículas após a encapsulação. Não foi possível relacionar o aumento no tamanho das nanopartículas com a camada de quitosana adsorvida na superfície devido a presença de agregados maiores.

O SAXS nos forneceu informações a respeito das dimensões e de detalhes da estrutura interna. Os resultados obtidos por SAXS indicam que a estrutura da nanopartícula é do tipo vesícula bi-camada, como ilustrado na Figura 5.5, onde R_c corresponde ao raio do núcleo que consiste do solvente, t_h corresponde a espessura da parte interna da bicamada e t_t a espessura da bicamada (em contato com o solvente).

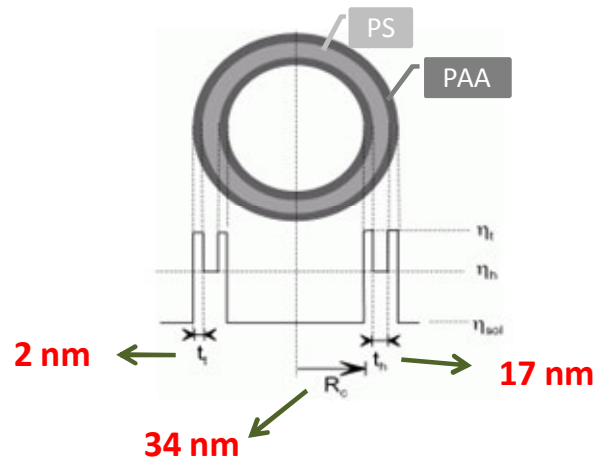


Figura 5.5. Representação esquemática para uma esfera do tipo vesícula bi-camada, cujos valores de raio do núcleo aquoso, da camada hidrofóbica e da camada hidrofílica (em contato com o solvente) foram determinados para as nanopartículas do tipo C3.

Nosso principal objetivo com os estudos de SAXS era o de poder observar diferenças principalmente relacionadas à espessura da camada hidrofóbica do polímero na presença da FIN como agente encapsulante. A Figura 5.6 mostra o perfil de intensidade experimental e calculado para a suspensão aquosa das nanopartículas do tipo C3 (A) e o mesmo sistema encapsulado com FIN 0,02% (B).

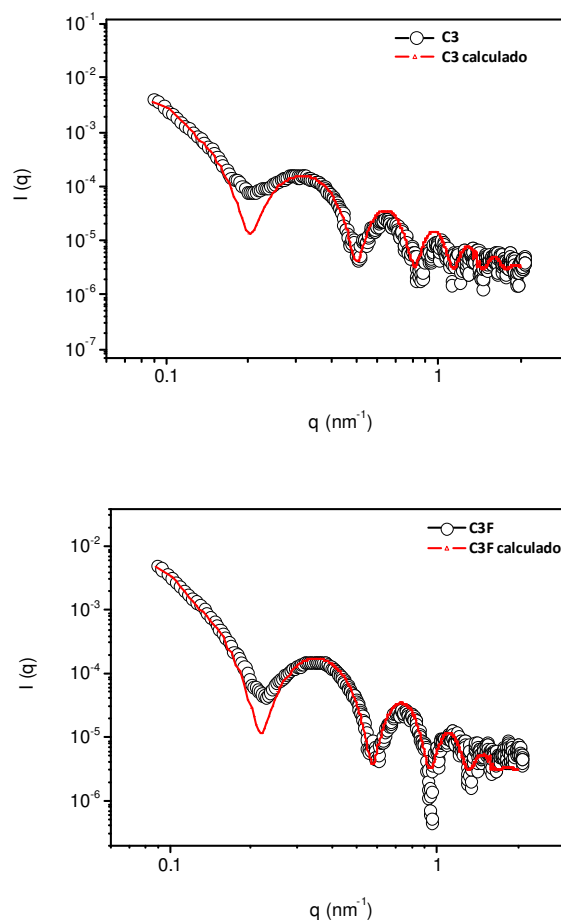


Figura 5.6. Perfil da intensidade de espalhamento de raios-X para as nanopartículas de $\text{PS}_{139}\text{-}b\text{-PAA}_{17}$ (C3) (A) e para C3 encapsulada com finasterida (B). Os círculos pretos correspondem aos dados experimentais e a linha vermelha corresponde ao perfil de espalhamento calculado para partículas do tipo vesículas bi-camada.

Os resultados para C3 revelaram como parâmetros analíticos de fator de forma R_c , t_t e t_h de 34 nm, 2 nm e 17nm respectivamente. Após a encapsulação estes valores foram para 34 nm, 2 nm e 14 nm, ou seja, não houve alteração significativa na estrutura interna das nanopartículas após o processo de encapsulação. Resultados similares foram obtidos para o sistema constituído por nanopartículas do tipo C7. O potencial zeta das nanopartículas

também não sofreu alterações com o processo de encapsulação. Nanopartículas preparadas por C3 e C7 encapsuladas com FIN apresentaram valores de potencial zeta entre -28,3 mV e -40,6, já as nanopartículas decoradas com quitosana apresentaram valores de potencial zeta que variaram de +22,8 mV e +33,7 mV.

5.3.4. Avaliação da permeação cutânea da Finasterida

As nanopartículas, na forma de vesículas poliméricas, preparadas a partir dos copolímeros em bloco a base de PS e PAA com diferentes graus de polimerização (PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ e PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃, C3 e C7, respectivamente), decoradas ou não com quitosanas de massas molares distintas (quitosana oligossacarídeo e quitosana de massa molar viscosimétrica 37000 g/mol, CS-oligo e CS-37, respectivamente), foram avaliadas quanto à capacidade de permear transdermicamente o fármaco finasterida (FIN), encapsulado nas nanopartículas. Foram determinados a partir de estudos de permeação cutânea, através da pele de orelha suína, os seguintes parâmetros: fluxo, tempo de latência e coeficiente de permeabilidade.

Uma vez que outros trabalhos da literatura (RAO et al., 2008; BIRUSS & VALENTA, 2006) têm mostrado uma baixa permeação da finasterida na pele, definiu-se como tempo experimental um período de 24 h. Com isto, diferenças entre preparações seriam observadas com maior confiabilidade. Além disto, em experimentos anteriores conduzidos por 7 h, observou-se uma quantidade permeada inferior ao limite de quantificação do método analítico (0,5 µg/mL). Assim sendo, as coletas para a análise da quantidade permeada foram realizadas a partir de 10 h (em intervalos regulares de 2 h) do início do experimento de permeação. Ao final do experimento (24 h), a quantidade de finasteride

retida na derme e epiderme também foi analisada, bem como aquela remanescente no compartimento doador.

A permeabilidade da finasterida nas formulações foi comparada a permeabilidade de uma solução hidroalcoólica de finasterida (etanol/água 30/70). A concentração de FIN no compartimento doador foi quantificada por CLAE, obtendo-se um gráfico que correlaciona a quantidade permeada em função do tempo. Na análise dos perfis de permeação das diferentes formulações testadas (Figura 5.7) tem-se que o fármaco apresentou maiores valores de permeação quando incorporado em sistemas nanoestruturados comparativamente à solução hidroetanólica. Nos dois sistemas investigados, as nanopartículas revestidas com quitosana oligossacarídeo (CS-oligo) apresentaram maior perfil de permeação em relação às revestidas com quitosana de maior massa molar (CS-37).

De acordo com ZHOU et al. (2009), a interação entre a quitosana oligossacarídeo e a queratina do estrato córneo poderia variar a conformação da queratina de α -hélice para β -pregueada ou para uma conformação aleatória, resultando em um decréscimo das propriedades de barreira da pele e conseqüentemente em um aumento na permeação cutânea. Outro estudo demonstrou que formulações a base de quitosana fornecem uma maior permeação cutânea do fármaco comparada à correspondente formulação comercial, sugerindo também que estes resultados estejam associados a uma interação entre o polissacarídeo e o extrato córneo aumentando a solubilidade do fármaco na pele; além disso, estas interações também estão associadas às diferenças entre a quitosana e seus derivados utilizados nas formulações (CERCHIARA et al, 2002). HE et al. (2009) estudaram os mecanismos da quitosana e seus derivados utilizados como promotores de permeação transdérmica por diversas técnicas e concluíram que a quitosana e seus derivados podem

alterar de forma significativa a estrutura secundária da queratina, aumentando o conteúdo de água no estrato córneo, aumentando a fluidez celular em vários graus.

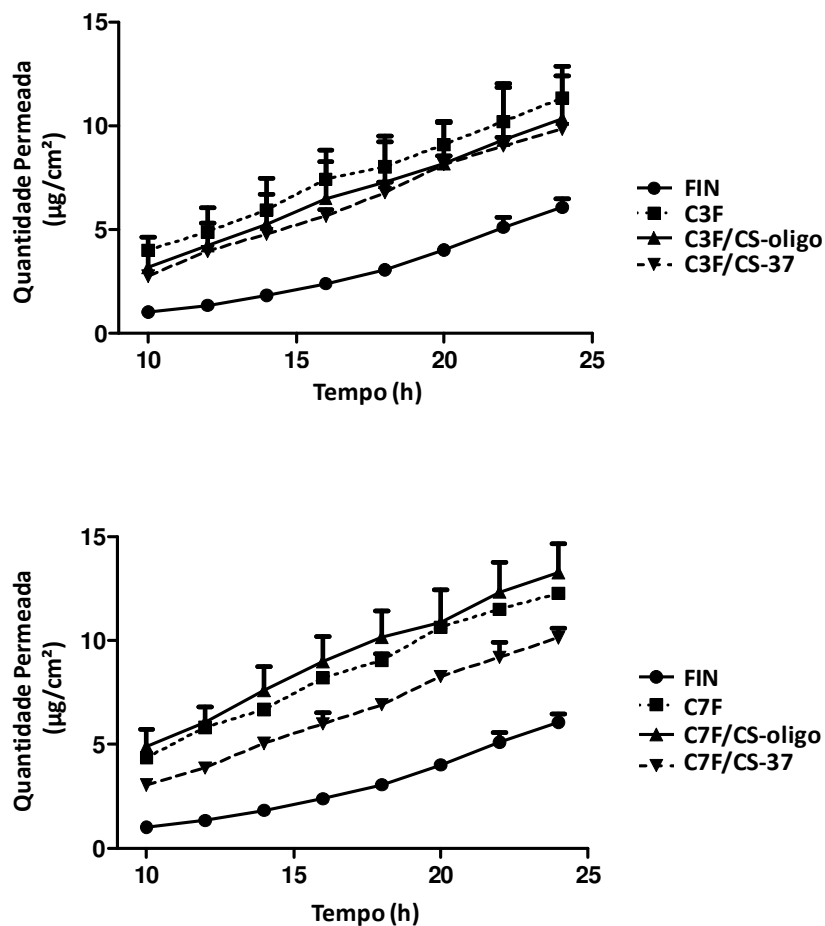


Figura 5.7. Perfis de permeação da finasterida através da pele de orelha suína a partir de diferentes formulações. (média \pm SD, n = 3).

Com o intuito de fazer uma análise comparativa entre os perfis de permeação dos dois sistemas, uma normalização dos dados foi efetuada, considerando uma concentração fixa (40 µg/mL) de fármaco no compartimento doador (Figura 5.8). Os resultados sugerem que as

nanopartículas com C7F na sua composição apresentaram maior permeação que aquelas constituídas por C3F.

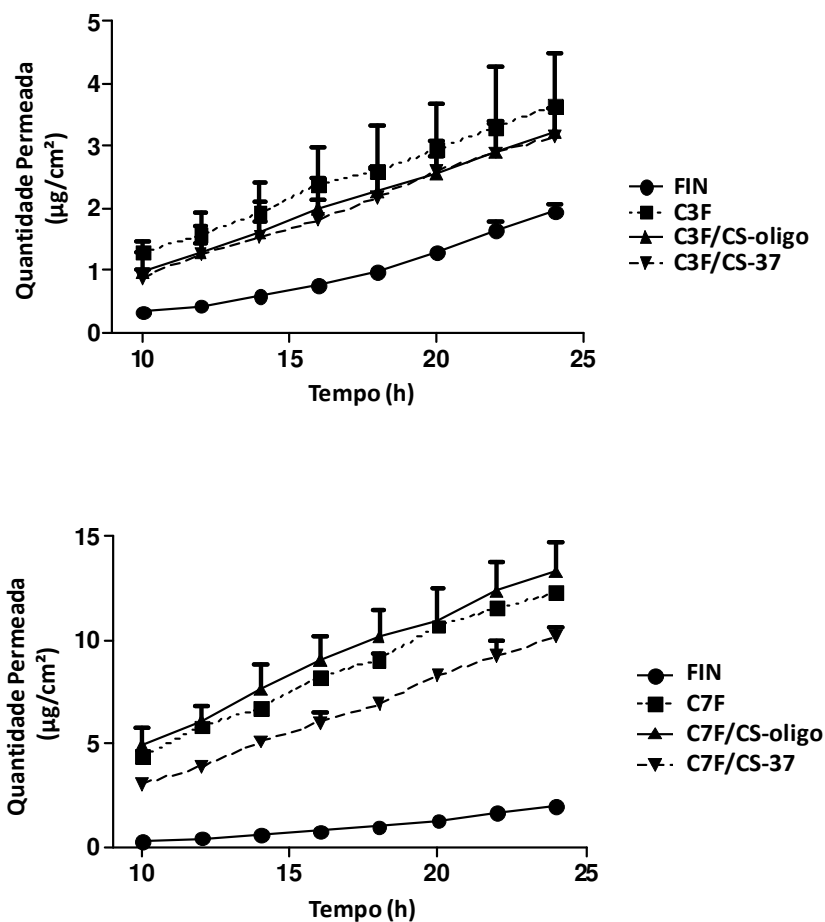


Figura 5.8. Perfis de permeação da finasterida através da pele de orelha suína a partir de diferentes formulações. (média \pm SD, $n = 3$). Valores calculados considerando uma concentração fixa de FIN de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no compartimento doador.

Baseado nas diferenças físico-químicas, previamente discutidas, entre os dois sistemas, observou-se que o sistema constituído por nanopartículas preparadas a partir de C7F possuem tamanho inferiores ao sistema C3F, portanto, este fato pode ter contribuído para

as diferenças encontradas no perfil de permeação do fármaco, uma vez que quanto menor o tamanho da partícula, maior a sua difusão através das camadas da pele.

A Tabela 5.3 resume os resultados obtidos para o fluxo, tempo de latência e coeficiente de permeabilidade para os diferentes sistemas investigados. Quando os fluxos de permeação das diferentes formulações de finasterida foram comparados entre si, tem-se que as suspensões de nanopartículas apresentaram valores superiores a solução hidroetanólica (ANOVA/SNK, $p < 0.05$).

Tabela 5.3. Parâmetros de permeação das diferentes preparações de finasterida (n = 3).

Resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão.

Formulação	Fluxo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2.\text{h}$)	Tempo de latência (h)	Coefficiente de Permeabilidade (cm/h)
FIN	0.3809 \pm 0.0125	8.9917 \pm 0.3778	0.0048 \pm 0.0001
C3F	0.5340 \pm 0.0711	2.8044 \pm 0.4404	0.0067 \pm 0.0018
C3F/CS-oligo	0.5068 \pm 0.0672	3.8363 \pm 2.5141	0.0062 \pm 0.0001
C3F/CS-37	0.5131 \pm 0.0237	4.5951 \pm 0.1149	0.0064 \pm 0.0012
C7F	0.5740 \pm 0.0043	2.0803 \pm 0.1852	0.0086 \pm 0.0011
C7F/CS-oligo	0.5994 \pm 0.0541	1.5662 \pm 0.6118	0.0091 \pm 0.0019
C7F/CS-37	0.5167 \pm 0.0294	4.3024 \pm 0.1430	0.0078 \pm 0.0013

Os sistemas C3F e C7F apresentaram um comportamento similar. Por outro lado, comparando-se os coeficientes de permeação, tem-se que C7F e suas variações apresentaram maiores valores que C3F e suas variações, porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa (ANOVA/SNK, $p > 0.05$). Uma vez que a quantidade inicialmente

adicionada no compartimento superior foi menor para as formulações C7F e os valores de fluxo similares para as partículas C3F e C7F, isto justificaria maiores valores de coeficiente de permeação para C7F.

Tanto as variações entre os sistemas preparados por C3F quanto os preparados por C7F apresentaram menor tempo de latência em relação à solução hidroetanólica de finasterida (ANOVA/SNK, $p < 0.05$), ou seja, atingem a solução receptora mais rapidamente. Quando variações de C3F foram comparadas entre si, tem-se que as nanopartículas C3F decoradas com CS-37 apresentaram um maior tempo de latência, porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Quando as variações de C7F são comparadas entre si, as nanopartículas decoradas com CS-37 também apresentaram maior tempo de latência (ANOVA/SNK, $p < 0.05$). Para este sistema, sabe-se que a espessura da camada hidrofóbica é maior, sugerindo um maior tempo de retenção do fármaco a partir deste sistema, ocasionando um maior tempo de liberação da FIN a partir delas e conseqüentemente, atingem a solução receptora mais lentamente.

A porcentagem de FIN retida na derme e na epiderme também foi avaliada para todos os sistemas (Figura 5.9). De forma geral, tem-se que a finasterida apresentou maior retenção na epiderme do que na derme, o que poderia ser explicado em função da sua hidrofobicidade que aumenta a interação com lipídeos da membrana. Este mesmo tipo de comportamento foi observado no estudo de RAO et al. (2008), que avaliou a retenção do fármaco na derme e epiderme considerando diferentes preparações (lipossomas, etossomas, solução aquosa e hidroetanólica). Ainda que a quantidade de fármaco retida na epiderme tenha sido estatisticamente similar entre as preparações do grupo C3F e a solução hidroetanólica de finasterida (ANOVA/SNK, $p > 0.05$), uma maior retenção foi observada para

as nanopartículas decoradas com quitosana. Preparações do grupo C7F também proporcionaram maior retenção da finasterida na derme, particularmente aquela revestida com quitosana de maior massa molar (CS-37), que apresentou um percentual maior que a solução hidroetanólica (ANOVA/SNK, $p < 0.05$).

Um maior percentual de recuperação, monitorado pelo balanço de massa, foi encontrado para as nanopartículas decoradas com quitosana (CS-oligo ou CS-37). Para as preparações a partir de C7F foi possível recuperar toda a quantidade de fármaco inicialmente adicionada. Menor percentual de recuperação foi encontrado para o grupo de nanopartículas C3F em relação ao grupo de nanopartículas C7F.

É bem documentado que os sistemas de encapsulação promovem uma melhora na estabilidade química ou enzimática de moléculas fisicamente incorporadas. Neste estudo, as nanopartículas a base de PS-b-PAA, inicialmente carregadas negativamente foram decoradas com quitosana, um polissacarídeo de carga oposta, este processo de decoração, acompanhado de uma mudança na carga superficial da nanopartícula, promove um ligeiro aumento no seu diâmetro médio. Esta camada de polissacarídeo aderida à superfície da nanopartícula pode servir também como uma barreira de proteção para o fármaco, aumentando também a distância percorrida por ele do interior para o exterior da partícula e conseqüente diminuindo as perdas por degradação. Como as nanopartículas do sistema C7F possuem uma camada hidrofóbica consideravelmente mais espessa do que para o sistema C3F, isto poderia justificar a maior taxa de recuperação para este sistema. BIRUSS & VALENTA, (2007) estudaram o efeito do revestimento de lipossomas com diferentes polímeros sobre as propriedades de permeação e estabilidade química e enzimática de hormônios encapsulados. Os resultados mostram uma significativa melhora na estabilidade

química e microbial destes hormônios na presença dos polímeros nas formulações em comparação aos lipossomas puros.

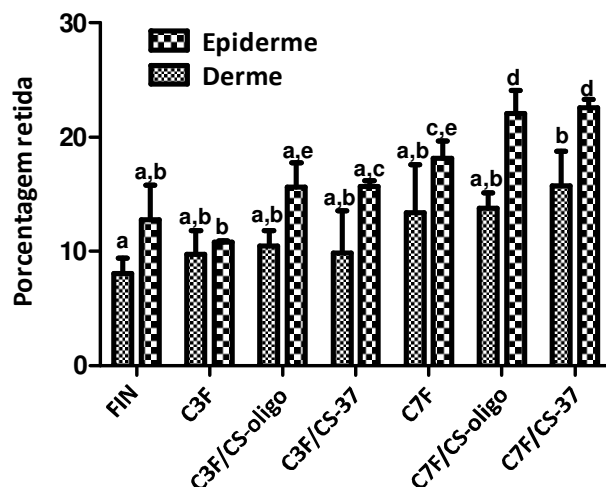


Figura 5.9. Porcentagem de finasterida retida na derme e na epiderme após 24 horas. Média \pm SDM ($n = 3$). Utilizou-se os testes ANOVA/SNK ($p < 0.05$). As diferentes letras indicam as diferenças estatísticas significantes entre os tratamentos.

Os sistemas nanoestruturados propostos, que consideram parâmetros como tamanho, carga superficial, bem como diferentes graus de polimerização dos copolímeros em bloco (material precursor para a preparação das nanopartículas) e variações no massa molar da quitosana utilizada na decoração das nanopartículas, permitem inferir que o sistema em si tem maior efeito sobre a permeação da finasterida do que variações destes parâmetros, uma vez que os valores de fluxo, tempo de latência e coeficiente de permeabilidade foram maiores neste sistema de vetorização em relação à solução

hidroetanólica do fármaco. A hidrofobicidade conferida pelo sistema, bem como a carga positiva da quitosana, poderia explicar este comportamento. De todas as amostras testadas, C7 com quitosana (tanto a oligo quanto a de maior massa molar) deveria ser selecionada tendo em vista a sua menor taxa de transferência sistêmica (menor permeação) e maior retenção nas camadas da pele. Com isto, espera-se maior inibição da 5- α -redutase para esta preparação em função da maior quantidade acumulada na derme e epiderme.

5.4. Conclusões

A eficiência da permeação cutânea da finasterida encapsulada em nanopartículas a base de PS-*b*-PAA revestidas com quitosana foi mais eficiente, quando comparada a sistemas não revestidos ou com uma solução hidroalcoólica do fármaco (preparado em farmácias de manipulação). Este resultado sugere que as nanopartículas decoradas interagem mais fortemente com a superfície da pele devido a carga positiva da quitosana, que pode estar relacionada a uma alteração na estrutura secundária da queratina.

Dentre todos os sistemas aqui investigados as nanopartículas preparadas pelo copolímero PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ (C7) decorado com quitosana, de menor ou maior massa molar, parece ser o sistema mais apropriado, proporcionando uma nova alternativa para um sistema de liberação transdérmica eficiente para a finasterida. Este sistema apresenta uma maior retenção do fármaco na pele e baixos valores de fluxo de permeação, com menor taxa de transferência sistêmica. Com isto, espera-se maior inibição da enzima 5- α -redutase para esta preparação em função da maior quantidade acumulada na derme e epiderme. Porém, estudos mais aprofundados devem ser realizados.

5.5. Referências

BIRUSS, B.; VALENTA, C. Skin permeation of different steroid hormones from polymeric coated liposomal formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 62, p. 210–219, 2006.

CAON, T.; COSTA, A. C. O.; OLIVEIRA, M. A. L. de; MICKE, G. A.; SIMÕES, C. M. O. Evaluation of the transdermal permeation of different paraben combinations through a pig ear skin model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 391, p. 1-6, 2010.

CERCHIARA T, LUPPI B, BIGUCCI F, ORIENTI I, ZECCHI V. Physically cross-linked chitosan hydrogels as topical vehicles for hydrophilic drugs. **Journal of Pharmacy Pharmacology**, v. 54, p. 1453-1459, 2002.

DICK I. P. ; SCOTT R. C. Pig ear skin as an in-vitro model for human skin permeability. **Journal of Pharmacy Pharmacology**, v. 44, p. 640-645, 1992.

FUNCK, W.; DAMMANN, V.; DONNEVERT, G. **Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie**. Weinheim: VHC, 1992.

GUANG-JIAN, Z. ; YAO, Z. Biocompatibility of skin biological dressings. **Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research**, v. 12, p. 2701-2704, 2008.

HE, W.; GUO, X.; XIAO, L.; FENG, M. Study on the mechanisms of chitosan and its derivatives used as transdermal penetration enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 382, p. 234–243, 2009.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH Harmonised Tripartite Guideline, **Validation of analytical procedures: Text and Methodology**, ICH-Q2(R1), Geneva, November 2005.

MAI, Y.; EISENBERG, A. Controlled Incorporation of Particles into the Central Portion of Vesicle Walls. **Journal of American Chemical Society**, v. 132, p. 10078–10084, 2010.

PERMEGEAR, INC. Disponível em: <www.permegear.com/franz.htm>. Acesso em 01 de março de 2011.

RAO, Y.; ZHENG, F.; ZHANG, X.; GAO, J.; LIANG, W. In Vitro Percutaneous Permeation and Skin Accumulation of Finasteride Using Vesicular Ethosomal Carriers. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, p. 860-865, 2008.

SHABIR, G. A. Validation of HPLC methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US FDA, the US Pharmacopoeia and the ICH. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SINTOV, A.; SERAFIMOVICH, S.; GILHAR, A. New topical antiandrogenic formulations can stimulate hair growth in human bald scalp grafted onto mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 194, p. 125-134, 2000.

ZHOU, X.; YOU, G.; LIU, D.; YAU, K. *In vitro* investigation on the interactions of oligo-chitosan with keratin. **Acta Polymerica Sinica**, v. 8, p. 781-785, 2009.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Primeiramente, filmes auto-organizáveis preparados a partir de um copolímero em bloco contendo um bloco zwitteriônico, altamente biocompatível (PMPC) e um bloco pH sensível (PDPA) foram analisados morfológicamente por SAXS e TEM, onde morfologias induzidas, seja pelo solvente ou pela temperatura, foram identificadas. Foram estudados três solventes para a preparação dos filmes pela metodologia *casting*: etanol, metanol e solução aquosa a pH 4. No primeiro caso foram identificadas morfologias cilíndricas, que sofrem uma transição conduzindo à morfologia lamelar após tratamento térmico. Filmes preparados em metanol não apresentaram estruturas organizadas, e nenhuma transição morfológica foi observada. Por outro lado, filmes preparados pela dissolução direta em solução aquosa levemente ácida, proporcionaram estruturas do tipo lamelas.

Em um segundo momento, outro copolímero em bloco, a base de poliestireno (PS) e poli(ácido acrílico) (PAA) foi investigado. Parâmetros experimentais como escolha do solvente orgânico, concentração, velocidade de agitação, taxa de adição de água, possibilitaram a obtenção de nanopartículas com dimensões inferiores a 200 nm e com estreita faixa de distribuição de tamanho. O processo de decoração das nanopartículas com quitosana, através de interações eletrostáticas, proporcionou a obtenção de nanoestruturas com dimensões e morfologias controladas, e com propriedades de superfície que conferem ao sistema maior probabilidade de vetorização a alvos específicos.

Portanto, o sistema nanopartícula/quitosana também foi investigado quanto à capacidade de encapsular e liberar transdermicamente a finasterida, um fármaco pouco solúvel em água. Os resultados mostraram uma boa eficiência de encapsulação, com parâmetros de permeabilidade mais eficientes, especialmente a partir das nanopartículas decoradas, quando comparados a uma solução hidroalcoólica do fármaco. Dentre todos os

sistemas aqui investigados as nanopartículas preparadas pelo copolímero PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ decorado com quitosana, apresentou maior retenção do fármaco na pele e baixos valores de fluxo de permeação, com menor taxa de transferência sistêmica, proporcionando uma nova alternativa para um sistema de liberação transdérmica eficiente para a finasterida.

As perspectivas do trabalho são, portanto, numerosas. No que diz respeito aos filmes nanoestruturados, as características do copolímero estudado são bastante interessantes e poucos estudos tem sido reportados na forma de filmes finos, uma investigação mais detalhada, incluindo um processo de reticulação a fim de diminuir as características de solubilidade e aumentar a gama de aplicações na área nanotecnológica.

Seria igualmente interessante, aprimorar os estudos de caracterização das nanopartículas decoradas com quitosana, incluindo um processo de reticulação, uma vez que este sistema se mostrou bastante efetivo como um veículo de encapsulação e liberação de princípios ativos.

RÉSUMÉ EM FRANÇAIS

Etude de films minces et de nanoparticules obtenus par auto-assemblage de copolymères à blocs et leurs interactions avec un oligo / polysaccharide

Introduction et contexte

Étant donné l'importance des matériaux polymériques dans le domaine de la nanotechnologie, les copolymères à blocs constituent un domaine de recherche très dynamique, tant sur un plan théorique que sur un plan expérimental, à la fois en caractérisation physico-chimique à l'état solide ou en solution. Les nanomatériaux, de part leurs nombreuses applications, ont conduit à la réalisation d'un nombre d'études considérables portant sur le contrôle de leur taille et de leur morphologie.

Profitant des caractéristiques de l'auto-assemblage de copolymères à blocs, cette thèse a pour visé de trouver une méthode simple de préparation et caractérisation physico-chimie des films minces et de nanoparticules (décorées avec un polymère d'origine naturelle). Les propriétés d'auto-assemblage des copolymères à blocs sont intrinsèquement liées à leur architecture et à leur composition; dont la taille et la morphologie peuvent être contrôlées.

Des Films minces, avec des nanostructures bien définis, préparés à partir du copolymère à bloc poly[2-(methacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine]-*b*-poly[2-(diisopropylamino) ethyl methacrylate] (PMPC-*b*-PDPA) ont été préparés et caractérisés. La morphologie d'un copolymère dibloc comprenant un bloc hautement biocompatible PMPC, et un bloc sensible au pH, PDPA, a été étudiée par des mesures de diffusion des rayons X aux

petits angles (SAXS) et par des techniques d'imagerie montrant des transitions morphologiques en fonction des traitements par solvant et de la température employée.

Pour les nanoparticules, le système d'investigation a été des copolymères diblocs poly(styrène)-*bloc*-poly(acide acrylique), PS-*b*-PAA, où le PAA est minoritaire, décorées avec du chitosane, dont la combinaison polymère synthétique / polysaccharide propose une stratégie assez intéressante pour le développement de structures bien définies, avec des propriétés de surface compatible et biodégradable. Dans ce cas particulier, la décoration est principalement assurée par des interactions électrostatiques entre les groupes chargés positivement du polysaccharide (groupes NH_3^+) et la surface chargée négativement de nanoparticules (groupes COO^-).

Les nanoparticules sont généralement utilisées dans l'encapsulation, le transport et la libération vectorisée des principes actifs. Ainsi le développement de systèmes colloïdaux approprié pour atteindre ces objectifs est d'une grande importance dans le domaine des produits pharmaceutiques, cosmétiques, ainsi que d'un grand intérêt académique. Dans ce contexte, des nanoparticules de PS-*b*-PAA décorées avec du chitosane ont été testés pour leur capacité d'encapsuler, de transporter et de libérer la finastéride, un médicament utilisé pour traiter l'alopecie androgénétique (calvitie).

Objectif Général

Ce travail a eu comme objectif de préparer et de caractériser des films préparés par auto-assemblage du copolymère à bloc PMPC-*b*-PDPA et des nanoparticules à base de PS-*b*-PAA, ainsi que d'étudier les changements physico-chimiques qui se produisent dans des

nanoparticules en présence du chitosane à la surface, en vérifiant d'une part la capacité de ces systèmes à encapsuler un principe actif et, d'autre part, à libérer sous forme transdermique.

Objectifs Spécifiques

- ✓ Préparation de films minces du copolymère à bloc poly[2-(methacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine]-*b*-poly[2-(diisopropylamino) ethyl methacrylate] (PMPC-*b*-PDPA);
- ✓ Caractérisation de nanostructures obtenues par les films de PMPC-*b*-PDPA par des techniques la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) et par des techniques d'imagerie telles que la microscopie électronique en transmission (TEM).
- ✓ Trouver une méthode simple de préparation de nanoparticules à partir du copolymère PS-*b*-PAA et les caractériser par rapport à sa taille, polydispersité, la structure, la morphologie et la charge de surface;
- ✓ Déterminer l'effet de la décoration de nanoparticules avec du chitosan et analyser leurs paramètres physico-chimiques (morphologie, taille, polydispersité, charge de surface et de la stabilité), en utilisant des chitosanes de poids moléculaire différents;
- ✓ Étudier le système PS-*b*-PAA/chitosane en tant que transporteur du médicament finastéride, afin d'évaluer l'efficacité d'encapsulation du médicament, après des tests pour valider la méthodologie de quantification du médicament (spécificité, la linéarité, de précision, l'exactitude et la limite de détection) par la technique de chromatographie liquide haute performance (CLHP);

- ✓ Évaluer la perméation cutanée (modèle in vitro) du médicament encapsulé dans les différents systèmes PS-*b*-PAA en présence et en absence de chitosane, par des calculs du coefficient de perméabilité, flux et temps de latence;

Préparation et caractérisation des films minces nano-structurés du copolymère à bloc PMPC-*b*-PDPA

L'utilisation des copolymères à blocs sous la forme de film mince est une alternative prometteuse pour la création des nanomatériaux pouvant être utilisés pour leurs propriétés spécifiques (électroniques, optiques...) ou comme masques de dépôt ou gravure. Les différents micro-domaines des copolymères à bloc s'organisent de façon régulière pour former des structures périodiques, dont la morphologie peut être contrôlée en modifiant les conditions expérimentales.

Dans ce contexte, la première partie de ce manuscrit est consacrée à la préparation et à l'étude -caractérisation structurale et morphologique- des films minces obtenues par l'auto-assemblage du copolymère à bloc poly[2-(methacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine]-*b*-poly[2-(diisopropylamino) ethyl methacrylate] (PMPC-*b*-PDPA). Des nanostructures avec un haut degré d'organisation ont été obtenues pour la première fois pour ce système. Les films ont été caractérisés par des techniques de diffusion des rayons X aux petits angles, microscopie électronique en transmission (TEM) et microscopie électronique à balayage en transmission (STEM). Les points importants sont les morphologies différentes qui peuvent être obtenus par des paramètres variables tels que les solvants utilisés pour préparer les films, et en faisant varier la température lors du traitement thermique utilisé.

Article publié: *Nanostructured films made from zwitterionic phosphorylcholine diblock copolymer systems. Macromolecules, 2011.*

Préparation et caractérisation des nanoparticules obtenues par des copolymères à bloc PS-*b*-PAA décorées avec du chitosane

Cette étude est axée, dans un premier temps, sur la formation des nanoparticules (vésicules polymériques) par auto-assemblage de copolymères à blocs amphiphiles en solution aqueuse. Puis, dans un second temps, sur la décoration de ces systèmes avec un polyélectrolyte naturelle (oligo / polysaccharide).

L'intérêt pour les objets nano-organisés comme vecteurs potentiels d'agents bioactifs a considérablement augmenté. Dans ce contexte, les nanoparticules à base de vésicules polymériques qui exploitent la combinaison d'une paroi hydrophobe, dont il est possible d'encapsuler des agents actifs peu soluble, et une cavité hydrophile dont il est possible d'encapsuler des agents actifs hydrosolubles, ont été étudiées^{1,2}. L'adsorption de polyélectrolytes sur des surfaces chargées joue également un rôle important dans la science des matériaux et dans les applications biomédicales, donc la combinaison de polysaccharides, avec leurs biofonctionnalités singulières, et des copolymères à bloc synthétiques, avec leurs propriétés contrôlable, est une stratégie originale de développement des nanoparticules organisés à propriétés de surface biocompatibles et biodégradables^{3,4}.

Cette partie du travail met en évidence le comportement des nanoparticules préparées à partir des copolymères à bloc de poly(styrène)-*bloc*-poly(acide acrylique) PS-*b*-PAA qui présente une surface chargée négativement et en présence du chitosane, un polyélectrolyte de charge contraire. Le rôle de l'interaction électrostatique a été étudiée par diffusion

dynamique de la lumière, le potentiel zeta (ζ) et par l'analyse morphologique des nanoparticules PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ et PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ décorées par du chitosane oligosaccharide ($M_n = 5000$ g/mol) et par du chitosane $M_v = 37000$ g/mol.

Article en préparation : *Chitosan adsorption at the surface of polystyrene-*b*-poly (acrylic acid) polymersomes.*

Résumé des résultats en anglais

Experimental

Materials

The asymmetric PS_m-*b*-PAA_n diblock copolymer with PAA volume fraction = 0.1 were purchased from Polymer Source Inc. Chitosan (a linear random copolymer of D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine) with a weight-average molecular weight equal to 3.7×10^3 and a degree of deacetylation of about 85% and the chitosan oligosaccharide lactate (M_w 5000 g.mol⁻¹ and degree of deacetylation > 90%) were purchased from Sigma-Aldrich.

Preparation of nanoparticles: Self-assemblies

The PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ and PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ block copolymers were dissolved in dioxane, a good solvent for both blocks of the copolymer, at a concentration of 0.5 wt % and then stirred overnight at room temperature. To induce self assembly, highly purified water (18.2

Ω .cm) was added dropwise to the block copolymer solution at a rate of 0.25 mL per hour at 1000 rpm, to a final water content of 50 wt %. The colloidal suspension was then quenched with a 10-fold excess of highly purified water (18.2 Ω .cm) and dialyzed for a few days against water to remove the dioxane. The chitosan solutions were prepared with a stoichiometric amount of HCl on the basis of $-\text{NH}_2$ content in the chitosan. The solutions of polyelectrolyte were stirred for one night at room temperature, until complete solubilization.

Dynamic Light Scattering (DLS) measurements

DLS measurements were performed using an ALV laser goniometer, which consists of a 22 mW HeNe linear polarized laser operating at a wavelength of 632.8 nm, an ALV-5004 multiple τ digital correlator with 125 ns initial sampling time, and a temperature controller. For the measurements, 1.0 mL of each solution (typically 0.25 mg/mL) was filled in glass cuvettes and the data were recorded over 300 s for each angle. The samples were kept at a constant temperature of 25.0°C during all the experiments, and at different angles (ranging from 40° to 140°). The hydrodynamic particle size distribution was obtained from CONTIN analysis, using the Stokes-Einstein relationship $R_H = K_B T / (6\pi\eta D)$ where R_H is the hydrodynamic radius, K_B is Boltzmann constant, T is the temperature of the sample, and η is the viscosity of the medium.

ζ-Potential measurements

The measurements were performed at 20°C with a commercial zetasizer (Zetasizer NanoZS, Malvern, France). The ζ-potential values are determined using the Smoluchowski relation which links the ionic mobilities to the surface charge.

Transmission and Scanning Electron Microscopy (TEM and SEM)

Transmission electron microscopy (TEM) images were recorded on a Kodak SO163 film using a CM200 Philips microscope operating at 80 kV with a LaB6 source. Drops of aqueous suspensions (4 μL) were deposited on carbon-coated copper grids, which were rendered hydrophilic by glow discharge treatment, and then dried in the air. For high resolution scanning electron microscopy (SEM), drops of nanoparticles suspension were deposited onto copper stubs and allowed to air dry. The specimens were coated by 2 nm of electron beam evaporation carbon and observed in secondary imaging mode with a Zeiss ultra 55 FEG-SEM (CMTC-INPG, Grenoble) at an accelerating voltage of 3 kV, using an in-lens detector.

Results and Discussion

Scattering measurements of PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ and PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ nanoparticles were carried out before and after the adsorption of chitosan at the nanoparticles surface. A relatively narrow size distribution was obtained for both systems, with a single dominant

mode corresponding to the diffusive motion of the nanoparticles, whose characteristic hydrodynamic radii (R_H) varied from 60-80 nm depending on the copolymer composition.

When a chitosan polyelectrolyte solution and a suspension of oppositely charged colloidal nanoparticles are mixed together, the adsorption of the polyelectrolyte on the nanoparticle surface (Figure 1) induces a little increase in the average diameter of the nanoparticles decorated by chitosan $37000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, but not significant changes when the chitosan oligosaccharide lactate is added (see Figure 1).

The increase of 14 nm to $\text{PS}_{139}\text{-}b\text{-PAA}_{17}$ /chitosan $37000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ system is corroborated by TEM images (see the discussion below).

We performed the ζ -measurements for progressive additions of chitosan with two different molar masses, namely $37000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ and an oligosaccharide ($M_w 5000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). During the experiment, the pH of the observed solution was found to vary between 4 and 5, thus allowing a perfect solubility of chitosan in all experiments. We observe a large variation of the ζ -potential with increasing the amount of added chitosan: from ≈ -45 to $\approx +25$ mV for all systems studied (the results is illustrated in Figure 2).

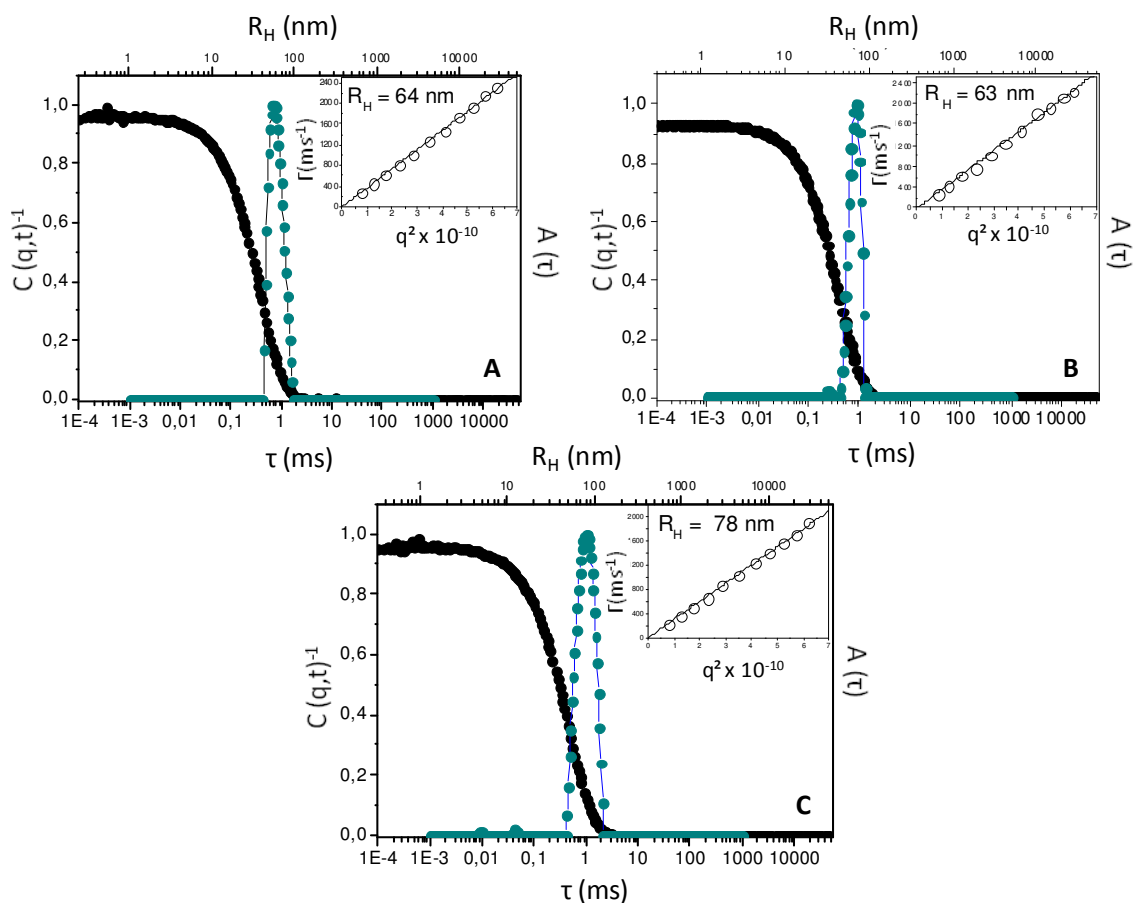


Figure 1 – Autocorrelation function $C(q,t)$ and distribution of the relaxation times measured at scattering angle of 90° for 0.25 mg/mL PS_{139} - b - PAA_{17} (A) PS_{139} - b - PAA_{17} decorated with chitosan oligosaccharide lactate (B) and PS_{139} - b - PAA_{17} decorated with chitosan $37000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (C). The relaxation frequency is q^2 -dependent as shown in the inset.

The electrostatic interactions studied by observing the variation of ζ -potential are responsible for the chitosan adsorption on the external surface of the nanoparticles. These results reveal the existence of a strong interaction between chitosan and PS - b - PAA nanoparticles.

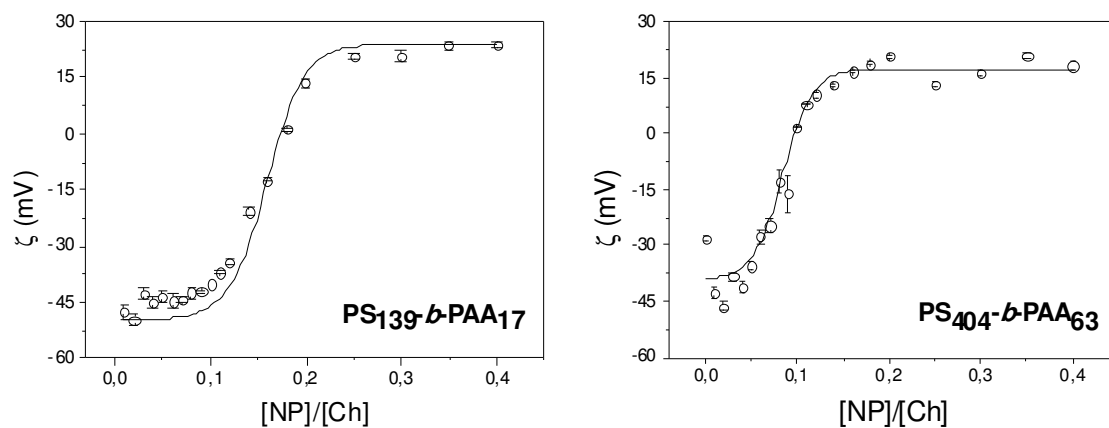


Figure 2 – The charge inversion of PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ and PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ nanoparticles documented by the change of the ζ -potentials from negative to positive values as a function of chitosan 37000 g.mol⁻¹ concentration.

Vesicles (< 200 nm) obtained from the self-assembled PS-*b*-PAA block copolymer were observed by transmission electron microscopy (TEM). In the TEM images, Figure 3 (A and B), a clear vesicular morphology was observed for PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ and PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ whose hydrophobic wall thickness $d \approx 35$ and $d \approx 20$ nm, respectively. In Figure 3C the adsorption of the polyelectrolyte (chitosan 37000 g.mol⁻¹) on the PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ nanoparticles surface showed a coating thickness of about 18 nm.

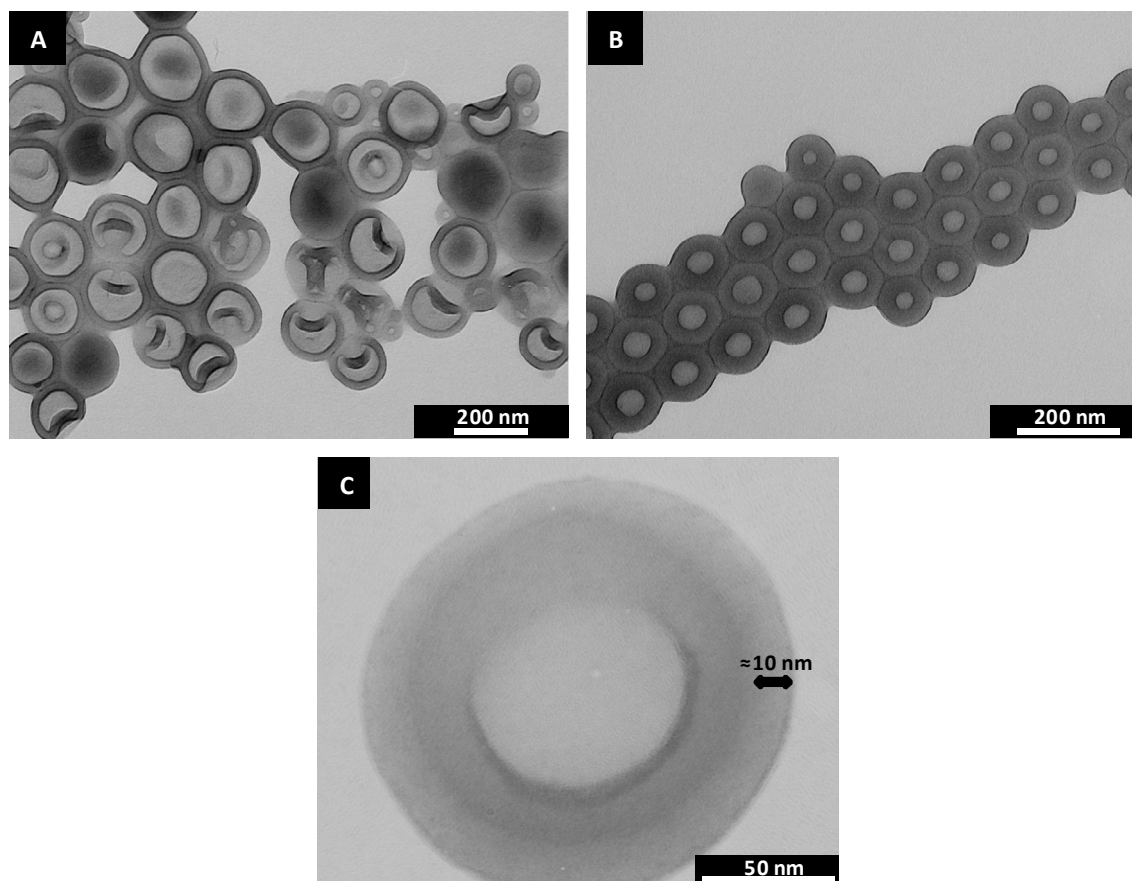


Figure 3 – Transmission electron microscopy from $PS_{404}\text{-}b\text{-}PAA_{63}$ (A), $PS_{139}\text{-}b\text{-}PAA_{17}$ (B), and $PS_{139}\text{-}b\text{-}PAA_{17}$ covered with chitosan $37000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (C).

To highlight the decoration of the nanoparticles by the chitosan, we have observed the surface by a high resolution scanning electron microscopy. As can be seen in Figure 4, the surface of nanoparticles after the polysaccharide adsorption becomes rougher (B and C) than the initial nanoparticles (A). In fact, the correlated adsorption of the polyelectrolyte chains on the oppositely charged colloid nanoparticles results in a non-uniform distribution at the surface.

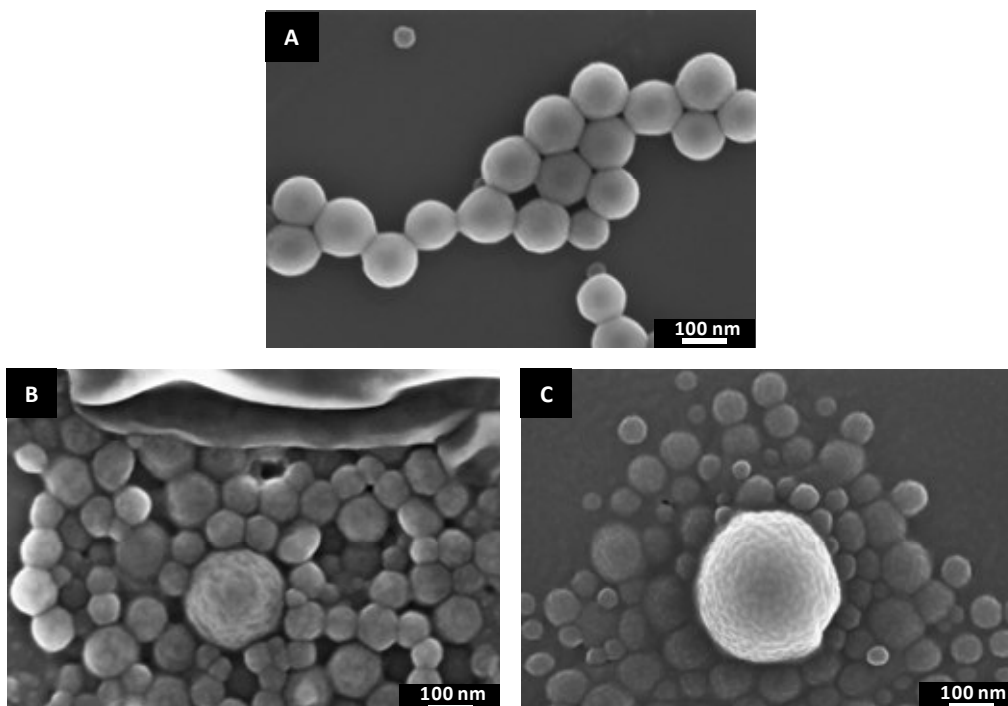


Figure 4 – Scanning electron microscopy images showing the surface of $PS_{404}\text{-}b\text{-}PAA_{63}$ nanoparticles, (A) before, (B) after deposition of chitosan oligosaccharide lactate and (C) after deposition of chitosan 37000 g.mol^{-1} .

Finally, we have confirmed that chitosan is adsorbed on $PS\text{-}b\text{-}PAA$ nanoparticles, which is easily interpreted in terms of electrostatic interaction, and the interaction is independent of the molecular weight of chitosan.

Conclusions

The protonated amino groups NH_3^+ of chitosan play a crucial role in the mechanism of adsorption of this positively charged polyelectrolyte on the negatively charged $PS\text{-}b\text{-}PAA$ nanoparticles. We observe that chitosan has a stronger affinity for this system and that the

adsorption is independent of the chitosan molar mass. In terms of possible applications, this system could be used, for example, as a system for skin drug delivery due to the bioadhesive characteristic of chitosan.

References

- (1) B. M. Discher; Y-Y. Won; D. S. Ege; J. C-M. Lee; F.S. Bates; D. E. Discher; D. A. Hamer
Science 1990, *284*, 1143.
- (2) F. Meng; Z. Zhong; J. Feijen *Biomacromolecules* 2009, *10*, 197.
- (3) C. Cametti *Chemistry and Physics of Lipids* 2008, *155*, 63.
- (4) C. Giacomelli; V. Schmidt; K. Aissou; R. Borsali *Langmuir* 2010, *26*, 15734-15744.

Perméation cutanée du médicament finasteride encapsulée dans les nanoparticules du copolymère à bloc PS-*b*-PAA décorées par du chitosane

La dernière partie porte sur le développement d'un nouveau système pour l'administration transdermique de médicament qui facilite la pénétration cutanée de finastéride, une molécule anti-androgène, inhibiteur de l'enzyme 5-alpha-réductase, et qui est prescrit pour le traitement de l'alopecie androgénétique¹. Ce médicament a été encapsulé dans des nanoparticules à base des copolymères à blocs PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ (C3) et PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ (C7), décorée par du chitosane avec deux poids moléculaires différents, chitosane oligosaccharides (CS-oligo) et du chitosane 37000 g/mol (CS-37).

Nous rapportons des études démontrant l'efficacité d'encapsulation, les propriétés physico-chimiques des nanoparticules avec le médicament encapsulé à l'intérieur, ainsi qu'une étude de perméation cutanée de finastéride à partir des systèmes nanostructurés. Le modèle utilisé in vitro correspond aux cellules de diffusion ou cellules de Franz, par des calculs du coefficient de perméabilité, flux et temps de latence.

Publication en préparation : *Skin permeation of finasteride loaded chitosan-decorated polystyrene-*b*-poly (acrylic acid) polymersomes.*

Résumé des résultats en anglais

Experimental

Materials

The block copolymers poly(styrene-*block*-acrylic acid) PS_m-*b*-PAA_n (the subscripts *m* and *n* refer to the mean degrees of polymerization of each block) were obtained from Polymer Source Inc. ($M_n = 15700 \text{ g.mol}^{-1}$ and 46500 g.mol^{-1} ; PDI (polydispersity index) = 1.07 and 1.18; with the PAA volume fraction of 0.10 and 0.13, respectively). Chitosan (a linear random copolymer of D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine) with a viscosity weight-average molecular weight equal to 37000 g.mol^{-1} and a degree of deacetylation of about 85% (determined by RMN) and the chitosan oligosaccharide lactate ($M_w 5000 \text{ g.mol}^{-1}$ and degree of deacetylation > 90%) were purchased from Sigma-Aldrich. The finasteride (N-(2-methyl-2-propyl)-oxo-4aza-5 α -androst-1-ene17B carboxamide) was obtained from Manufacture U. S. Pharmacopeia (LOT F1E139 USP Reference Standard) and DEG – Lot 090611. Full-thickness porcine ear skin was obtained from a local slaughterhouse (Antônio Carlos-SC).

*Preparation of drug loaded chitosan-decorated PS-*b*-PAA nanoparticles*

The incorporation of finasteride into the hydrophobic bilayer of PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ and PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ vesicles was carried out applying the co-solvent self-assembly method as follows: The corresponding block copolymer and the finasteride were dissolved in dioxane and stirred overnight at ambient temperature. The initial concentration of corresponding block copolymer were 0.5 wt %, other concentrations were not explored. In the combined

solutions, the initial concentration of finasteride, were 0.01, 0.02 and 0.05 wt %. Subsequently, the ultrapure Milli-Q® water was added dropwise into the combined solution at a rate of 250 µL per hour under a controlled magnetic stirring (speed of 1000 rpm) until a water content of 50 wt % was reached. The colloidal suspension was then quenched with a 10-fold excess of highly purified water. The organic solvent was then eliminated by evaporation under reduced pressure, and the final volume of the colloidal suspension was adjusted to 5.0 mL and filtered in a nitrate membrane filter (Sartorius AG) with a pore size of 1.2 µm. On the other hand, the chitosan solutions were prepared with a stoichiometric amount of HCl on the basis of $-NH_2$ content in the chitosan. The solutions of polyelectrolyte were stirred for one night at room temperature, until complete solubilization. When a chitosan polyelectrolyte solution and a suspension of oppositely charged colloidal nanoparticles are mixed together, the adsorption of the polyelectrolyte on the nanoparticle surface occurred. The pH of the final formulation is of about 5.0 and the final concentration of the nanoparticles and the finasteride is 0.1 % and 0.04 % respectively.

Dynamic light scattering (DLS).

DLS measurements were performed using an ALV laser goniometer, which consists of a 22 mW HeNe linear polarized laser operating at a wavelength of 632.8 nm, an ALV-5004 multiple τ digital correlator with 125 ns initial sampling time, and a temperature controller. For the measurements, 1.0 mL of each solution (typically 0.25 mg/mL) was filled in glass cuvettes and the data were recorded over 300 s for each angle. The samples were kept at a constant temperature of 25.0°C during all the experiments, and at different angles (ranging from 40° to 140°). For a dilute solution of spherical particles, the Stokes-Einstein equation

adequately describes the relationship between the hydrodynamic particle size and the diffusion coefficient D and is written as $R_H = K_B T / (6\pi\eta D)$ where R_H is the hydrodynamic radius, K_B is Boltzmann constant, T is the temperature of the sample, and η is the viscosity of the medium.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

The morphology and the size of the polymersomes were determined from TEM images. All samples were observed using a JEOL JEM-1011 microscope operating at an acceleration voltage of 80 kV. The aqueous suspensions (4 μ L) were dropped on to the copper grids. Water was allowed to evaporate from the grids at atmospheric pressure and room temperature.

Determination of the drug content and the encapsulation efficiency

The amount of finasteride loaded in different nanoparticles was determined by measuring the difference between the total amount of finasteride added into nanoparticle suspensions and the amount of nonloaded finasteride remaining in the clear supernatant after the loading process. For this purpose, the encapsulation efficiency was measured using a Shimadzu LC-10A HPLC with a C18 reverse phase column Supercosil LC-18, 4.6x150mm, 5 micron (Supelco, EUA). A mobile phase of water and acetonitrile (60:40, v/v) on a flow rate of 1 mL/min was employed with a detection wavelength of 210 nm. The finasteride peak appeared at 3 minutes. The HPLC method was validated using of the following parameters:

specificity, linearity, accuracy, precision, and determination of the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ).

Skin permeation studies.

The permeation of finasteride-loaded nanoparticles was measured through the pig ear skin. Permeation experiments were carried out for 24 h at Franz-type diffusion cells. The nanoparticles compositions analysed were: PS₁₃₉-*b*-PAA₁₇ nanoparticles with finasteride encapsulated (C3F), C3F decorated with chitosan oligosaccharide (C3F/CS-oligo), C3F decorated with chitosan 37000 g/mol (C3F/CS-37) and PS₄₀₄-*b*-PAA₆₃ nanoparticles with finasteride encapsulated (C7F), C7F decorated with chitosan oligosaccharide (C7F/CS-oligo), C7F decorated with chitosan 37000 g/mol (C7F/CS-37) and finasteride 30% ethanol solution for control (FIN). At fixed time intervals (2 h), samples (400 µL) were withdrawn from the receiver chambers, replaced with the same volume of fresh medium and analyzed by HPLC. After experimentation, the drug accumulated in the skin was also extracted with a methanol for HPLC analysis. Regarding the permeation parameters, the steady-state permeation flux was determined from the linear slope of the cumulative amount of finasteride permeated vs. time curve. The lag time represented the time required to achieve the steady-state flux, and the permeability coefficient was the relation between the flux and the initial concentration of each finasteride formulation added to the donor compartment.

Results and Discussion

The encapsulation of nanoparticles with finasteride did not provide any morphological changes compared to the nanoparticles in the absence of drug. The morphology of nanoparticles was assessed by electron microscopy in transmission (TEM), showing the formation of well defined polymer vesicles. Polymersomes with a relatively narrow size distribution were obtained for both systems. The addition of chitosan provided a slight increase (< 15%) in the mean nanoparticles diameter. Unlike the non-coated C3 and C7, chitosan coated polymersomes showed a strongly positive zeta potential. Evidences of the polyelectrolyte chains adsorbed on the surface of the polymersomes were highlighted by the transmission electron microscopy (Figure 1). The drug was encapsulated in the hydrophobic bilayer of polymersomes (PS block).

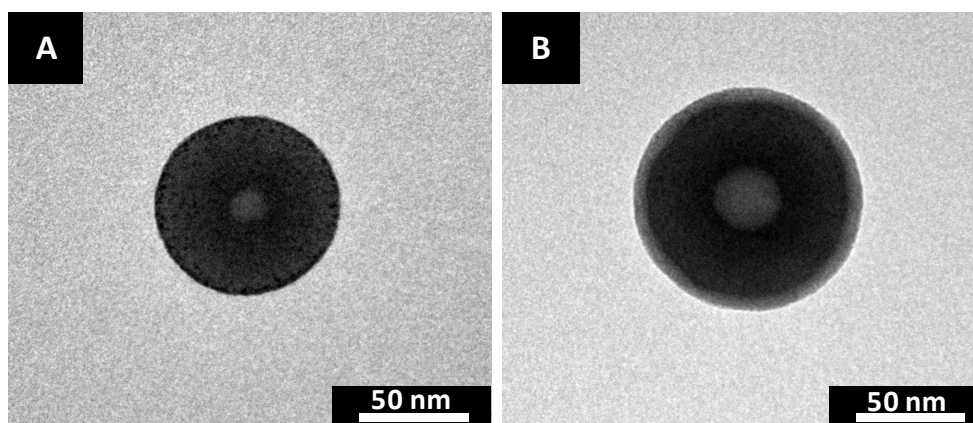


Figure 1. TEM images from $PS_{404}\text{-}b\text{-}PAA_{63}$ (C7) (A) and C7 covered with chitosan oligosaccharide (C7/CS-oligo) (B), encapsulated with finasteride.

A validation of the HPLC method was performed to guarantee that the analytical method generates reliable and interpretable information regarding the samples. In these chromatographic conditions, the finasteride retention time was around 3 min. Under these conditions, no interference by formulation excipients was verified, indicating that the method was specific in determining finasteride. The calibration graph was linear over the range of 2 to 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ with a correlation coefficient of 0,9992. The regression equation of the media calibration graph ($n = 3$) was $y = 45370.15x - 5288.5$. The variance analysis (ANOVA) confirmed the linearity of the method ($F_{\text{calc}} > F_{\text{critical}}$; $P < 0.05$). The LOD and LOQ calculated for HPLC were 0.16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectively, indicating that the method was sufficiently sensitive to determine the finasteride content in the nanoparticles suspensions.

The analysis of the entrapment efficacy is used to evaluate the amount of drug that is associated with the nanoparticles. Therefore, the ability of the different nanoparticles suspensions to carry finasteride was evaluated using drug content and recovery results (see Table 1).

Table 1. Effect of the formulation composition on the finasteride-loading capacity of nanoparticles suspensions.

	Finasteride content ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Drug recovery (%)
C3	35,3 – 46,0	78 - 95.
C7	29,6 – 37,2	62 - 94.

The effect of the nanoparticular formulations on skin permeation of finasteride using the Franz cell diffusion experiment was evaluated. The permeation profiles of finasteride (see Figure 2) were calculated considering the fixed concentration of the drug at 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ from donor compartment.

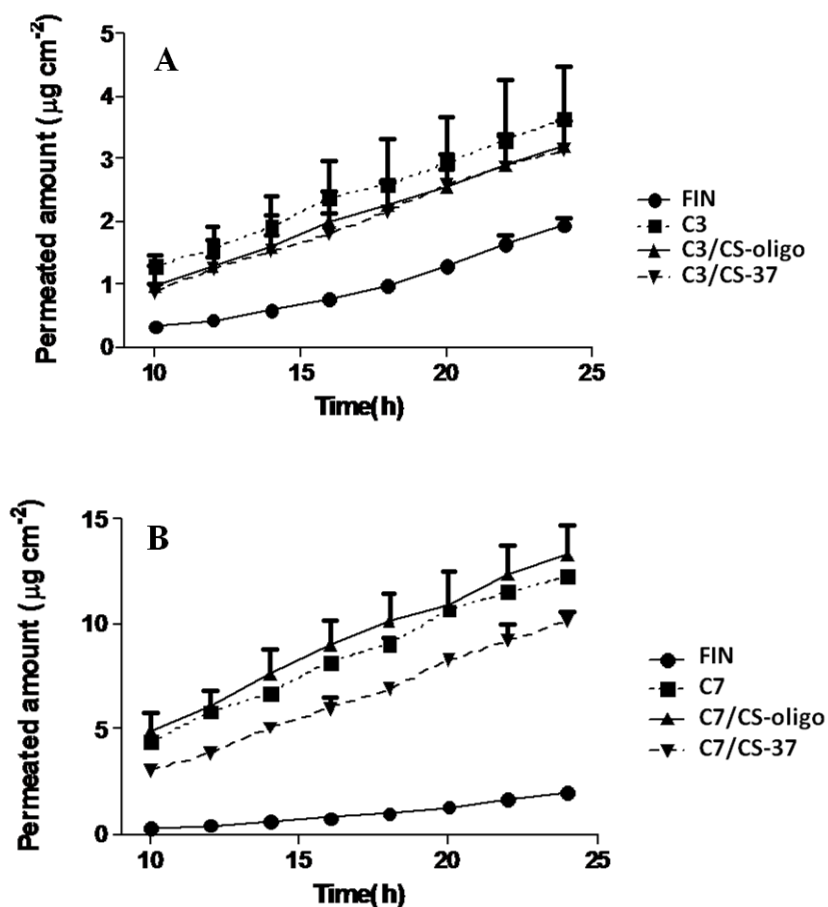


Figure 2. Permeation profiles of finasteride permeating through pig ear skin from different preparations (mean \pm SD, n=3).

Polymersomes systems were compared to the hydroalcoholic solution of finasteride (FIN). The permeated amount of drug for polymersomes preparations was higher than for FIN. C7 systems showed higher permeation than C3 systems, and the particles decorated

with CS-oligo showed lower permeation profiles than those decorated with CS-37. The positive charge of chitosan in decorated polymersomes could explain the higher permeation of these systems. Moreover, Zhou et al.² found that CS-oligo systems could improve the drug percutaneous permeation due to the specific interactions between the CS-oligo and the keratin.

The percentages of finasteride retained in dermis and epidermis were also analyzed (see Figure 3). In general, finasteride had a higher retention in the epidermis than in the dermis. This could be explained by their hydrophobicity. Similar results were observed by Rao et al.³ Decorated nanoparticles had a higher retention in skin layers and the C7 polymersomes were highlighted by the greater retention in these layers.

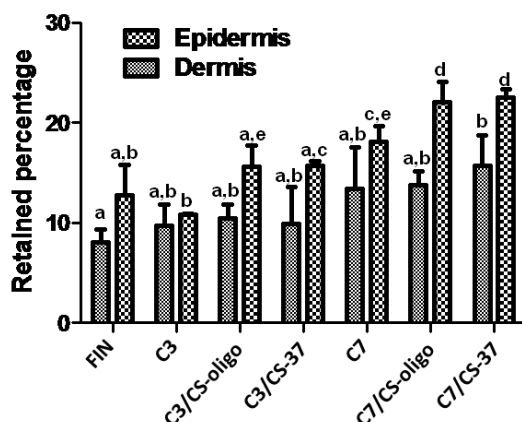


Figure 3. Percentages of finasteride retained in dermis and epidermis after 24 h. Mean ± SDM (n=3). ANOVA/SNK tests ($p < 0.05$) were carried out as appropriate. Different letters indicate significant statistical differences among treatments.

Conclusions

The PS-*b*-PAA/chitosan system for improved the skin permeation of finasteride was presented in this study. The finasteride-loaded PS-*b*-PAA/chitosan system were elaborated by co-solvent self-assembly approach. The nanoparticles (polymer vesicles, frequently referred to a polymersomes) had a spherical morphology and a diameter of approximately 200 nm. The present results suggest that the PS-*b*-PAA/chitosan system provides an alternative for transdermal drug delivery systems. Thus, the C7 polymersomes decorated with chitosan seems to be the most appropriate system since it provided higher drug retention in skin and low permeation flux values.

References

1. A. Sintov; S. Serafimovich; A. Gilhar *Int. J. Pharm.* **2000**, *194*, 125-134.
2. X. Zhou; G. You; D. Liu; K. Yau *Acta Polym. Sin.* **2009**, *8*, 781-785.
3. Y. Rao; F. Zheng; X. Zhang; J. Gao; W. Liang *AAPS PharmSciTech.* **2008**, *9*, 860-865.