

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO
COM MANANA ATRAVÉS DE INTERAÇÕES ELETROSTÁTICAS

Onésimo Damiano Giacomolli Júnior

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre – RS, novembro de 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ONÉSIMO DAMIANO GIACOMOLLI JÚNIOR

FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO
COM MANANA ATRAVÉS DE INTERAÇÕES ELETROSTÁTICAS

**Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química**

Prof.^a Dr.^a Adriana Raffin Pohlmann
Orientadora

Porto Alegre, novembro de 2015.

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre (agosto de 2013) e (agosto de 2015), no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Adriana Raffin Pohlmann. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof.^a Dr.^a Adriana Raffin Pohlmann

Onésimo Damiano Giacomolli Júnior

*Este trabalho é dedicado à minha família.
Em especial aos meus pais e ao meu amor Vanessa,
que tornaram tudo possível.*

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora, Prof.^a Adriana R. Pohlmann, pela recepção em seu laboratório. Em especial, pela paciência e disponibilidade para reuniões que contribuíram muito para meu amadurecimento científico e pessoal.

Aos professores Silvia Guterres e Ruy Beck da Faculdade de Farmácia da UFRGS, por terem disponibilizado seu laboratório para realização de experimentos e análises.

Aos amigos do laboratório K204 pela ajuda na interpretação de artigos e realização de experimentos, em especial para a Ana Carolina que foi tão paciente comigo no final desta jornada e a Camila que me ajudou bastante logo que entrei no laboratório. Agradeço também a companhia em todas as horas do café e das conversas divertidas que tivemos.

Agradeço ao meu irmão Anderson o companheirismo e a ajuda que me deu logo que vim morar em Porto Alegre, me mostrando a cidade e também me ensinando a respeitos dos procedimentos da universidade.

Aos meus amigos e familiares que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A Vanessa, pois mesmo morando em cidades diferentes ter continuado demonstrando todo amor e carinho que somente ela me proporciona, me apoiando e sendo companheira em todas as situações. Te amo.

Aos meus pais que sempre apoiaram minhas escolhas e me incentivaram a fazer o que eu realmente gosto.

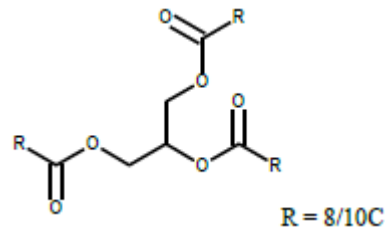
A Capes pela bolsa e CNPq e FAPERGS pelo financiamento de projetos.

Sumário

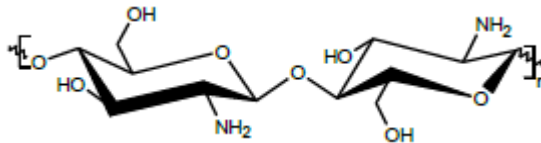
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 NANOTECNOLOGIA	16
2.2 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	16
2.3 NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO - LNCS.....	18
2.4 MANANA (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	21
2.5 REVESTIMENTOS COM MANANA	21
3. METODOLOGIA.....	27
3.1 MATERIAIS UTILIZADOS	27
3.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	27
3.3 SOLVENTES UTILIZADOS.....	27
3.4 MÉTODOS.....	28
3.4.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico	28
3.4.2 Revestimento das nanocápsulas de núcleo lipídico utilizando quitosana.....	28
3.4.3 Revestimentos das LNC`Quit ⁺ com manana.....	29
3.4.3.1 Metodologia 1: revestimento da LNC`Quit ⁺ por gotejamento sobre a solução de manana.....	29
3.4.3.2 Metodologia 2: revestimento da LNC`Quit ⁺ por injeção da solução de manana	30
3.4.4 Distribuição de tamanho, polidispersão e diâmetro médio das LNCs por difração de laser (Master Sizer)	31
3.4.5 Distribuição de tamanho, polidispersão e diâmetro médio das LNCs por espalhamento de luz dinâmico (zeta sizer)	31
3.4.6 Determinação do potencial zeta das LNCs	32
3.4.7 Determinação do pH das formulações.....	32
3.4.8 Análise de diâmetro em função da concentração de manana (zeta sizer) ...	32
3.4.9 Determinação do potencial zeta em função da concentração de manana ...	33
3.4.10 Determinação da viscosidade em função da concentração de manana.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO	35
4.2. REVESTIMENTOS DAS LNC`QUIT ⁺ COM MANANA POR INTERAÇÕES ELETROSTÁTICAS (METODOLOGIA 1)	39
4.3. REVESTIMENTOS DAS LNC`QUIT ⁺ COM MANANA POR INTERAÇÕES ELETROSTÁTICAS (METODOLOGIA 2)	45

4.4. REVESTIMENTOS DAS LNC ⁻ QUIT ⁺ COM MANANA POR INTERAÇÕES ELETROSTÁTICAS ABRANGENDO AS DUAS FAIXAS DE CONCENTRAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANTERIORES (METODOLOGIA 2B).....	56
5. CONCLUSÃO	62
6. ANEXOS.....	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

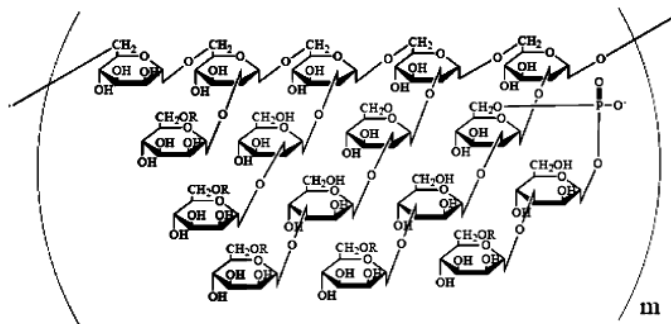
Triglicerídeo de cadeia média – TCC



Quitosana



Manana



ANOVA - Análise de variância

Quit+ - Quitosana

LNC - Nanocápsula de núcleo lipídico

LNC⁻ - Nanocápsula de núcleo lipídico contendo lecitina de soja

LNC⁻Quit⁺ - Nanocápsulas de núcleo lipídico contendo lecitina de soja revestida com quitosana

PCL – Poli-(ϵ -caprolactona)

PEG - Polietilenoglicol

PLGA – poli(ácido lático-co-ácido glicólico)

Span® 60 - Monoestearato de sorbitano

TCC - Triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico

Tween® 80 - Polissorabato 80 (P80)

RESUMO

No presente trabalho, foram desenvolvidas nanocápsulas de núcleo lipídico (LNCs) para posterior revestimento com manana através da utilização de duas metodologias diferentes, sendo ambas por interações eletrostáticas. Na primeira metodologia, soluções de manana em diferentes concentrações foram gotejadas sobre a formulação LNC-Quit⁺ e na segunda metodologia a LNC-Quit⁺ foi injetada nas soluções de manana. Através de análises de diâmetro, mobilidade eletroforética, potencial zeta e viscosidade, foi possível notar que a primeira metodologia não apresenta reprodutibilidade, demonstrando valores aleatórios, ao passo que, na segunda metodologia os valores são reprodutíveis para a concentração de 0,5 µg/mL final de manana. Também foi possível observar que as nanopartículas revestidas com manana não apresentam estabilidade após 24 horas, sugerindo-se que a manana se desprende da superfície da partícula. Nas duas metodologias foram utilizadas concentrações diferentes de material de partida, e com isso, foi criada a metodologia 2B para que as anteriores pudessem ser comparadas. Com estes resultados tem-se um caminho promissor para estudos futuros e o aprimoramento deste tipo de revestimento.

Palavras-chave: Nanocápsulas de núcleo lipídico; Interações eletrostáticas; Quitosana; Manana.

ABSTRACT

In the present work, lipid core nanocapsules (LNCs) was developed for subsequent coating with mannan by using two different methodologies and both by electrostatic interactions. In the first methodology, mannan solutions at different concentrations were drop wise on LNC⁻Quit⁺ formulation and the second methodology, LNC⁻Quit⁺ was injected in mannan solutions. Through analysis of diameter, electrophoretic mobility, zeta potential and viscosity, it was possible to notice that the first methodology was not reproducible, showing random values, whereas, in the secont methodology the values was reproducible for the 0,5 µg/mL concentration. It was also possible to observe that the particle coated with mannan has no stability after 24 hours, suggesting that mannan detaches from the particle surface. In this methodologies, two different concentrations of raw materials are used, and with that, it was created the methodology 2B so that the results could be compared. With these results, it was a promising path way for future studies and enhancement of this type of coating.

Keywords: Lipid core nanocapsules; electrostatic interactions; Chitosan; Mannan.

1. INTRODUÇÃO

A nanociência é uma área que vem crescendo e ganhando seu espaço com o passar do tempo. O estudo da matéria na escala nanométrica abre portas para diversas áreas de interesse, tais como biologia, química, física e engenharia (FERRARI, 2005). Esses estudos em escala tão reduzida foram incentivados em 1959 por um físico chamado Richard Feynman, considerado o pai da nanotecnologia. Feynman sugeriu que estudos baseados na possibilidade da organização dos átomos de maneira desejada poderiam abrir nova fronteira do conhecimento. A aplicação da nanociência para solucionar problemas específicos e embasar o desenvolvimento tecnológico abre uma fronteira, a nanotecnologia.

Nanopartículas são definidas como partículas sólidas coloidais que incluem tanto nanoesferas quanto nanocápsulas. Elas podem ser preparadas através de métodos de polimerização e síntese de polímero pré-formado. Uma de suas características fundamentais é seu tamanho, que geralmente é em torno de 5-10 nm com um limite de 1000 nm, embora a faixa de tamanho seja geralmente em torno de 100-500 nm. Como afirmado por diferentes autores, os sistemas nanoparticulados mostraram-se promissores para a vetorização ativa devido a sua capacidade de liberação de fármaco, sendo que seu tamanho subcelular permite uma maior captação intracelular comparado a outros sistemas particulados. É possível uma melhora na estabilidade das substâncias ativas e uma biocompatibilidade com tecidos e células quando estes sistemas são sintetizados utilizando-se a partir de materiais tanto biocompatíveis quanto biodegradáveis. Outras vantagens dos sistemas carreadores nanoencapsulados incluem: a eficiência de encapsulação, devido à solubilidade do fármaco no núcleo; baixa quantia polimérica se comparado com outros sistemas nanoparticulados tais como as nanoesferas; barreira polimérica protetora contra degradação e fatores tais como pH e luz; redução da irritação dos tecidos devido à parede polimérica (MORA-HUERTAS, C. E., 2010).

BULCÃO, R. P. (2013) cita que as nanocápsulas de núcleo lipídico são um novo tipo de partícula que recentemente foi desenvolvido, sendo que elas são estruturadas através de uma dispersão de um lipídio sólido (monoestearato

de sorbitano) e um lipídio líquido (triglicerídeo cáprico/caprílico [TCC]) no núcleo da partícula envolvido por uma parede polimérica (JÄGER, et al., 2007; VENTURINI et al., 2011).

Vários estudos reportaram a utilização de LNC preparada com poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e polissorbatato 80 (P80), apresentando resultados promissores no campo de drug delivery, incluindo o anti-inflamatório indometacina (BERNARDI et al., 2008, 2009), o antimalarial quinina (HAAS et al., 2009) e o antioxidante transresveratrol (FROZZA et al., 2010). Existem também algumas moléculas que foram incorporadas com sucesso em partículas contendo PCL a fim de aumentar sua eficiência terapêutica, incluindo tamoxifen (SHENOY E AMIJI, 2005), saquinavir (SHAH E AMIJI, 2006) e insulina (DAMGÉ et al., 2007). PCL é um polímero adequado para o controle da entrega de fármacos devido a sua boa permeabilidade para vários fármacos, excelente biocompatibilidade e sua habilidade de ser totalmente excretado do organismo uma vez que absorvido. Mesmo assim, a biodegradabilidade da PCL é lenta, comparada com outros polímeros (WOODRUFF E HUTMACHER, 2010). Além disso, nanocápsulas contendo P80 conseguem atrasar a opsonização, conseqüentemente as nanocápsulas permanecem no sangue por um período prolongado antes de serem capturadas pelas células do sistema mononuclear fagocítico. (BENDER et al., 2012; SOPPIMATH et al., 2001).

Com base na estrutura química da manana comercial, podemos notar a presença de grupos fosfato, que apresenta caracteristicamente carga negativa. Uma hipótese para a funcionalização de superfície seria a interação eletrostática da manana às nanocápsulas previamente revestidas com quitosana (um polissacarídeo catiônico). Desta forma, ocorreria a adsorção da manana sob a superfície quitosilada e positiva da nanocápsulas.

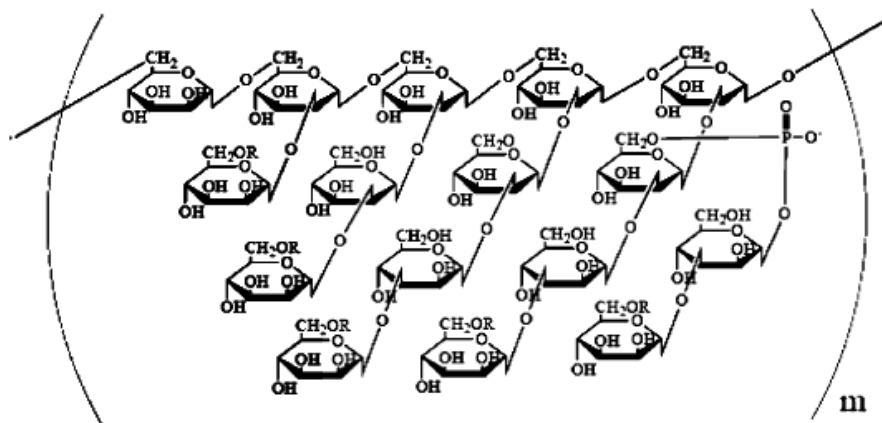


Figura 1. Estrutura química da manana comercial, obtida de *Saccharomyces cerevisiae* (AKIYAMA et al., 2007).

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consiste na obtenção e caracterização de nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com manana através de interações eletrostáticas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia teve seu surgimento na década de 50 através do físico Richard Feynman que sugeriu que os átomos poderiam ser organizados da maneira desejada. Este campo é uma área multidisciplinar que abrange estudos em engenharias, biologia, física e química e tem como objetivo manipular a matéria em níveis nanométrico (FERRARI, 2005).

A cada dia, o interesse pela nanotecnologia cresce, sendo que neste desenvolvimento tecnológico, destacam-se as áreas da nanoeletrônica, nanomateriais e nanobiologia. As aplicações que justificam este crescente interesse pelo estudo da escala nano são o desenvolvimento de biosensores, o emprego dos sistemas de entrega de fármacos, desenvolvimento de nanotubos de carbono, dispositivos com elevada capacidade de armazenamento de dados, etc (TEDESCO, 2007; CAVALCANTI, 2009; LOI, 2010; MORA-HUERTAS, 2010; BULCÃO, 2012).

Para superar as dificuldades encontradas nas formas convencionais de administração de fármacos, a nanotecnologia tem o papel de aumentar a eficácia terapêutica dos mesmos, reduzindo sua toxicidade e distribuição sistêmica pelo organismo, fazendo com que ocorra uma biodisponibilidade do agente terapêutico no sítio de ação desejado através do controle da liberação e direcionamento destes fármacos (SCHAFFAZICK, 2002). O interesse nesta área se intensifica mais ainda quando o uso destes sistemas demonstra a possibilidade de serem utilizados como diagnóstico ou estudo de captação celular e biodistribuição.

2.2 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Sistemas carreadores de natureza lipídica, tais como lipossomas, e carreadores de natureza polimérica, tais como nanoesferas e nanocápsulas têm sido intensamente investigados nos últimos anos (BULCÃO, 2012). Sistemas deste tipo são diferenciados pela sua estrutura supramolecular que

forneem partículas com diferentes características físico-químicas, como diâmetro de partículas, características da superfície na interface partícula/meio dispersante, capacidade de carreamento de compostos hidrofóbicos ou hidrofílicos, entre outras (MORA-HUERTAS, 2010).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1 μm . O termo nanopartícula inclui as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural. As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK, 2003).

Vários são os métodos utilizados para a preparação das nanopartículas poliméricas, sendo que os mesmos estão divididos em duas categorias, a polimerização *in situ* e a precipitação de polímero pré-formado (QUINTANAR-GUERRERO, 1998; GUTERRES, 1995). Um método promissor que apresenta simplicidade e reprodutibilidade das formulações obtidas é a deposição interfacial de polímero pré-formado (MORA-HUERTAS, 2010; BULCÃO, 2012).

Para a utilização deste método é preparada uma fase orgânica contendo a matriz polimérica dissolvida em um solvente orgânico miscível em água, juntamente com o componente oleoso (para a obtenção de nanocápsulas) e a substância que se deseja encapsular. Ao passo que a fase orgânica é preparada, também é feita uma solução aquosa que contém um tensoativo hidrofílico que irá recobrir a partícula e contribuir para estabilização do sistema. Após a completa dissolução dos materiais a fase orgânica é injetada na fase aquosa e o processo de formação das nanopartículas ocorre de forma instantânea, com rápida difusão do solvente orgânico na fase aquosa, formando as nanopartículas (insolúveis em água). O solvente orgânico e o excesso de água são removidos em evaporador rotatório (FESSI, 1998; COUVREUR, 2002; VENTURINI, 2011).

A utilização de vários polímeros para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas visando à biodegradabilidade dos componentes da formulação em meios biológicos e a biocompatibilidade tem sido foco de estudos. Os

exemplos de polímeros que se destacam são os poliésteres alifáticos sintéticos, poli-(ácido láctico) – PLA, poli-(ácido glicólico) – PGA, poli-(ϵ -caprolactona) – PCL e copolímeros dos ácidos láctico e glicólico – PLGA, além da utilização de polímeros naturais, como a quitosana e celulose (QUINTANAR-GUERREIRO, 1998; AGNIHOTRI, 2004; VILANOVA, 2010; WANG, 2011).

Estas nanoestruturas são capazes de liberar drogas em sítios específicos com uma baixa toxicidade, bem como proteger o fármaco encapsulado (VENTURINI et al., 2011). De acordo com a estrutura química do fármaco a ser encapsulado, bem como com as propriedades esperadas da nanocápsula para um determinado tratamento de saúde, há inúmeros óleos diferentes que podem ser empregados na fabricação da nanocápsula, a fim de que esta apresente as propriedades desejadas. No entanto, é preciso que o óleo interaja com o polímero e com o meio, de modo a formar de fato uma nanocápsula.

2.3 NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO - LNCS

Inicialmente as nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) começaram a ser desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa (MÜLLER, 2000) e sua denominação começou a ser utilizada somente após extensa caracterização físico-química (CRUZ, 2006; JÄGER, 2007; JÄGER, 2009) que comprovou que se distinguem das nanocápsulas poliméricas desenvolvidas por FESSI (1998).

VENTURINI e colaboradores (2011) desenvolveram suspensões aquosas contendo nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) muco adesivas para administração via oral. Neste trabalho foi utilizado éster etílico de indometacina como fármaco modelo devido sua lipofilicidade e eficiência de encapsulação. As nanopartículas foram preparadas pelo método de deposição interfacial utilizando o polímero pré-formado PCL. Para que as quantidades dos materiais fossem otimizadas, foram preparadas diferentes formulações utilizando diferentes proporções de SM, TCC e polímero. Neste trabalho foi visto que as proporções ideais para a formação somente de nanocápsulas em suspensão foram de 1:4.1:2.6 w/w/w (para MS, TCC e polímero respectivamente). Também foi visto que a viscosidade da fase orgânica é um importante

parâmetro para a qualidade da formulação. Este novo tipo de nanopartículas demonstrou ter a capacidade de dispersar fármacos em seu núcleo com maior capacidade de carregamento se comparadas às nanocápsulas contendo apenas óleo em seu núcleo.

JORNADA e colaboradores (2012) desenvolveram nanocápsulas de núcleo lipídico com o intuito de investigar a influência da concentração crítica de agregação dos materiais na fase orgânica para o controle do diâmetro e polidispersão das LNC obtidas através de deposição interfacial de polímero pré-formado (PCL). Foi visto que era possível que as medidas da tensão superficial e da viscosidade da fase orgânica e da fase aquosa estivessem relacionadas com o diâmetro da partícula e a concentração dos materiais utilizados. Neste trabalho foi demonstrado que as nanocápsulas de núcleo lipídico são formadas na escala nanoscópica com distribuições de tamanho unimodal, se o estado de agregação dos materiais da fase orgânica tender à diluição infinita. Os resultados demonstraram que não existe correlação entre o diâmetro final das nanocápsulas e da tensão superficial da fase orgânica ou aquosa quando o coloide é preparado pelo método de deposição interfacial. O que foi visto é que existe uma relação entre a concentração dos materiais na fase orgânica e na fase aquosa com o diâmetro final da partícula. Neste trabalho foi concluído que o diâmetro final da partícula é dependente da faixa de concentração dos materiais da fase orgânica e que quando os materiais dissolvidos na fase orgânica entram em contato com o não-solvente, ocorre a auto associação dos materiais em estruturas supramoleculares que diminuem em diâmetro após a evaporação do solvente. JORNADA (2012) descreveu o mecanismo de auto associação da LNC bem como a forma com que vários fármacos estão distribuídos na nanoestrutura correlacionado com o parâmetro teórico, o coeficiente de difusão e o LogD (OLIVEIRA, 2013).

Em outros estudos, estes dispositivos demonstraram um aumento na concentração de um anti-inflamatório empregado como antitumoral (indometacina) no tecido cerebral para o tratamento de glioblastoma multiforme, quando comparado com a administração da solução do fármaco (BERNARDI, 2009). Através deste estudo foi possível observar a diminuição do volume médio dos tumores no grupo tratado com as LNC contendo indometacina.

Recentemente estudos demonstraram por meio de estudos *in vivo*, que as LNCs de poli-(ϵ -caprolactona) não apresentam toxicidade sistêmica significativa (BULCÃO, 2012).

SIQUEIRA e colaboradores (2011) avaliaram o efeito do recobrimento catiônico de nanocápsulas poliméricas em formulações para síntese de protetor solar, através de experimentos *in vitro* para penetração de 3-benzofenona em pele de suínos. Essas nanocápsulas contendo 3-benzofenona foram preparadas por deposição interfacial de poli-(ϵ -caprolactona) e revestidas utilizando-se uma solução de 2% de quitosana em 1% de ácido acético, sendo que as nanopartículas foram incorporadas e caracterizadas em hidrogel. Os estudos de penetração foram feitos em célula de Franz utilizando-se pele de suínos como membrana. As nanopartículas apresentaram diâmetro médio de 202 ± 7 nm e potencial zeta positivo de $+21 \pm 1$ mV, enquanto que os valores para a partícula sem revestimento de quitosana foram de 175 ± 1 nm e -8 ± 1 mV. Os perfis de penetração demonstraram que uma grande quantidade de 3-benzofenona permaneceu na superfície da pele e uma baixa quantidade foi encontrada no compartimento receptor, após aplicação da formulação contendo quitosana, em comparação com a formulação em sua forma livre. Foi visto que as nanopartículas possuíam um pH compatível para aplicação tópica e os estudos de penetração/permeação demonstraram que o revestimento catiônico das nanopartículas poliméricas com quitosana foi eficiente em manter o protetor solar nas camadas superficiais da pele por um período prolongado de tempo. O hidrogel contendo 3-benzofenona em nanopartículas poliméricas revestidas com quitosana apresentou uma formulação inovadora para superar as limitações do uso diário de protetor solar.

Em outro trabalho do grupo, BENDER e colaboradores (2012), desenvolveram uma LNC com carga superficial negativa para posterior revestimento com quitosana. Neste trabalho foi testada a hemocompatibilidade das nanocápsulas de núcleo lipídico contendo lecitina, estabilizadas com polissorbato 80 e revestidas com quitosana. Foi visto através de estudos *in vivo* que tanto as nanopartículas revestidas com quitosana quanto as que não possuíam o revestimento com quitosana, apresentaram hemocompatibilidade, indicando que este tipo de sistema pode ser empregado para o desenvolvimento de formulações visando administração por via intravenosa.

2.4 MANANA (*Saccharomyces cerevisiae*)

A Manana é um polissacarídeo altamente ramificado, formado por unidades de manose, com peso molecular da ordem de $5,2 \times 10^4$ g/mol, obtido através do micro-organismo *Saccharomyces cerevisiae* (AKIYAMA et al., 2007). Considerando a expressiva presença de receptores de manose na superfície das células dendríticas e macrófagos, a manana se torna uma alternativa bastante consistente para ser utilizada como revestimento de superfície em uma nanocápsula polimérica de núcleo lipídico com vista à vetorização ativa ao sistema imunológico (Figura 1).

Com base na estrutura química da manana comercial, podemos notar a presença de grupos fosfato, que apresentam caracteristicamente carga negativa. Uma hipótese para a funcionalização de superfície seria a interação eletrostática da manana com as nanocápsulas previamente revestidas com quitosana. Desta forma, ocorreria a adsorção da manana sob a superfície quitosilada e positiva da nanocápsula, viabilizando a vetorização ativa de fármacos através de nanocápsulas.

2.5 REVESTIMENTOS COM MANANA

GHOTBI, e colaboradores (2011) sintetizaram nanopartículas poliméricas de PLGA com terminação éster ou ácido carboxílico e mostraram que a adição de manana à superfície da nanopartícula aumentou a taxa de internalização em células dendríticas de camundongos, devido ao fato de que a manana é reconhecida pelo receptor de manose presente na superfície deste tipo de célula. O polissacarídeo pode ser incorporado nas nanopartículas durante as etapas de emulsificação ou após a formação das nanopartículas, pela ligação da manana na superfície das partículas liofilizadas, através de adsorção física ou conjugação química na terminação ácido carboxílico. O efeito do método de incorporação e do tipo de polímero, na extensão da adsorção das nanopartículas fluorescentes pelas células dendríticas foi investigado através de citometria de fluxo, sendo que o marcador utilizado foi o isotiocianato de fluoresceína. A maior concentração de manana na superfície da partícula foi proporcionada pela estratégia de ligação covalente com terminação ácido

carboxílico das nanopartículas de PLGA, sendo que o máximo de captura pelas células dendríticas foi alcançado com a utilização das nanopartículas de PLGA com terminação ácido carboxílico contendo manana tanto covalentemente ligada, quanto adsorvida. Os resultados apresentados pelo estudo sugerem que as nanopartículas de PLGA decoradas com manana possuem grandes chances de serem utilizadas na vetorização ativa de fármacos e/ou vacinas para células dendríticas, que são células-chave para a ativação da imunidade mediada por células-T.

Em outro estudo com células dendríticas, HADDADI, e colaboradores (2014) sintetizaram nanopartículas poliméricas com (PLGA) e incorporaram manana através de conjugação química por dois diferentes métodos, sendo o primeiro com a adição de uma solução de manana durante o estágio de preparação das nanopartículas no primeiro estágio de emulsificação, e o segundo método através da incorporação da manana na superfície das nanopartículas previamente formadas e liofilizadas. Com o intuito de investigar os parâmetros de imunogenicidade em termos de estimulação destas células foram sintetizadas nanopartículas poliméricas tanto com PLGA terminado em éster quanto PLGA terminado em COOH. As células dendríticas tratadas com as nanopartículas de PLGA com terminação de COOH conjugadas com manana mostraram um maior desempenho em melhorar as funções biológicas, se comparadas com as outras formulações testadas. Ocorreu um aumento da expressão das citocinas CD86 e CD40 em presença das nanopartículas revestidas com manana, além da elevação dos níveis de IL-6, IL-12 e TNF- α . Somente as nanopartículas revestidas com uma grande quantidade de manana (900 ug/mL) foram capazes de induzir a resposta alogênica das células T.

ZHU, e colaboradores (2013) em um estudo com macrófagos associados a tumores, sintetizaram nanopartículas poliméricas com PLGA contendo PEG e posteriormente revestidas com manose, capazes de serem captadas especificamente por este tipo de macrófagos e não por macrófagos normais (sistema mononuclear fagocítico). As longas e hidrofílicas cadeias de PEG são extremamente maleáveis podendo se dobrar em forma de escudo e proteger a manose/manana de ser captada por macrófagos normais. Quando esta partícula chega ao microambiente ácido do tumor, ocorre uma hidrólise do PEG, fazendo com que ele não mais proteja a manose/manana na superfície

da partícula, dando espaço para que a partícula seja captada pelos macrófagos associados a tumores.

YU, e colaboradores (2010) utilizaram nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) para se ligar DNA através de interações iônicas. Um dos problemas das SLN é a falta de capacidade de vetorização. Com base nisto, foram sintetizados ligantes com manana-PE (manana-fosfatidiletanolamina) e aplicados para a modificação de superfície de nanopartículas lipídicas sólidas para a obtenção de Man-SLN-DNA, visando a vetorização de macrófagos alveolares. Man-SLN-DNA mostraram baixa toxicidade em comparação com as SLN-DNA. Os resultados mostraram que as partículas modificadas com manana podem melhorar a habilidade de vetorização do nanocarreador e que as Man-SLN-DNA podem vir a ser um vetor não viral promissor.

VEDANTAM, e colaboradores (2013) desenvolveram nanopartículas de ouro contendo manose (GNP) para tratamento de *Escherichia coli* (EC-178) no trato urinário. Este agente uropatogênico causa infecção recorrente ligando-se especificamente às adesinas das células cancerígenas da próstata (células DU-145). Neste estudo foi investigado o tempo de ligação da EC-178 com as células DU-145. Foi visto que as nanopartículas ligadas com as células EC-178 mostraram um percentual de viabilidade parecido quando comparadas com as células de controle DU-145. Por outro lado, as células bacterianas EC-178 causaram a morte celular em torno de 6 horas. Quando as nanopartículas Mn-GNPs e as células EC-178 foram adicionadas juntas às células DU-145, foi observada uma viabilidade de 64%. Mas quando as Mn-GNP foram misturadas previamente com as EC-178 e então adicionadas às células Du-145, foi observada uma viabilidade de 73%. Isto mostra que quando as nanopartículas são misturadas às células EC-178 previnem a ligação posterior entre as células DU-145, aumentando a viabilidade celular. Mesmo não sendo um aumento significativo, é mostrado que pode ocorrer uma competição de ligação entre as células EC-178 e as nanopartículas de ouro contendo manana.

ASTHANA, e colaboradores (2014) desenvolveram nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular solúvel em água contendo manana (MCH) para vetorização de oligonucleotídeos (ODN) a macrófagos. As nanopartículas foram formuladas a partir do método de auto-organização utilizando a proporção de N/P (mols de grupamentos amina do MCH por grupamentos

fosfato do ODN), sendo que a completa complexação do MCH/ODN foi atingida em uma relação de carga 1:1. A quitosana manossilada foi sintetizada pela reação entre os grupamentos amina da quitosana e os grupamentos isotiocianato do α -D-manopiranosil fenil isotiocianato. A carga positiva da MCH e a carga negativa do ODN tem a tendência de reforçar as interações eletrostáticas entre si para formar nanopartículas de MCHODN. As nanopartículas de MCHODN demonstraram uma eficiência de transfecção muito maior em células 264.7 (receptores de manana de ursos) do que células Hela, e não possuem toxicidade significativa observada em todas as concentrações de MCH. As nanopartículas MCHODN demonstraram boa capacidade para formar nanoconstruções com oligonucleotídeos e mostraram também adequadas propriedades físico-químicas para entrega de genes, sendo que também não apresentaram toxicidade e apresentaram uma maior transferência de genes nas células 264.7, demonstrando um potencial seguro e eficiente para a entrega de genes.

JING, e colaboradores (2013), desenvolveram um nano sistema com um ligante duplo para vetorização tanto para células cancerígenas HepG2 quanto para células de Kupffer (KPs) no fígado. Nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) catiônicas foram utilizadas como vetor e a proteína plasmídica verde aperfeiçoada (pEGFP) foi utilizada como gene modelo. Transferrina (Tf) e manana (M) foram ligadas em polietilenoglicol fosfatidiletanolamina (PEG-PE) e PE separadamente para que se tivesse transferrina-PEG-PE (T-PEG-PE) e manana-PE (M-PE) como ligantes para a superfície modificada dos carreadores que foram utilizadas como os ligantes alvo. A eficiência da transfecção dos ligantes duplos modificados (D-modificados) foi avaliada em animais modelo. SLN aperfeiçoadas com pEGFP (D-SLN/pEGFP) demonstraram um diâmetro de 198 nm e uma capacidade de carregamento de gene de 89%. D-SLN/pEGFP exibiram uma eficiência de transfecção 25% maior do que as SLN/pEGFP modificadas apenas com manana (M-PE) em células HepG2 e nas SLN/pEGFP modificadas apenas com T-PEG-PE (T-SLN/pEGFP) em células de Kupffer isoladas de ratos. Foi concluído que T-PEG-PE e M-PE podem funcionar como excelentes alvos ligantes ativos para melhorar a habilidade de vetorização celular dos carreadores e dos vetores

com ligantes duplos modificados, podendo ser aplicado como um vetor promissor para a entrega de genes.

KONG, e colaboradores (2011) sintetizaram nanopartículas bioadesivas utilizando PLGA para vetorização de genes em células de Kupffer e utilizando pEGFP (proteína plasmídica verde aperfeiçoada) como gene modelo. Neste estudo foi sintetizado MAN-PE (manana-fosfatidiletanolamina) que foi aplicado para a modificação da superfície das nanopartículas bioadesivas de PLGA onde foram comparados resultados das nanopartículas com DNA, contendo superfície modificada (MAN-DNA-NPs) e partículas sem superfície modificada (DNA-NPs). As nanopartículas sem modificação de superfície apresentaram formato esférico, enquanto as nanopartículas modificadas com manana apresentaram formato esférico com uma película escura ao redor, indicando que o revestimento ocorreu. A eficiência de ligação não demonstrou diferença significativa entre a MAN-DNA-NPs e a DNA-NPs, sendo que a ligação da manana na superfície das nanopartículas não separou o DNA do complexo. Os perfis de liberação foram praticamente os mesmos, mostrando que o revestimento com manana não impede a liberação do DNA. Com este estudo concluiu-se que essas nanopartículas podem ser vetorizadas para o fígado e transfeccionadas com sucesso para as células Kupffer, sendo que isto pode ser explicado pelo açúcar mediador de lecitina que ativa o mecanismo de vetorização.

JIANG, e colaboradores (2012) sintetizaram um ligante conjugado contendo manana-polietilenoglicol-L- α -fosfatidiletanolamina (MN-PEG-PE) para utilização em nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) catiônicas. Neste estudo foram comparados dois estágios para modificação utilizando o mesmo ligante (MN-PEG-PE) para identificar qual o método preferível para vetorização de genes, sendo pré-modificação (A-MN-PEG-PE) e pós-modificação (B-MN-PEG-PE) do carreador SLN/DNA. Como gene modelo foi utilizado pEGFP (proteína plasmídica verde aperfeiçoada). As propriedades foram comparadas *in vitro* e *in vivo* através de transfecção de células de Kupffer como modelo. Nos estudos *in vitro* e *in vivo*, B-MN-PEG-PE demonstrou uma maior eficiência de transfecção após 48 horas e 72 horas do que A-MN-PEG-PE. Neste estudo, o PEG-PE é utilizado como espaçador e a MAN é quem se liga nos sítios de manose dos macrófagos. Foi sugerido que o comprimento e a flexibilidade do

espaçador entre os grupos carboidrato e a superfície do carreador influenciam a vetorização específica e a captação pelos macrófagos. Concluiu-se que o carreador pós-modificado tem uma vantagem sobre o carreador pré-modificado, tendo uma maior expressão genética em células Kupffer de ratos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Estas evidências mostram a forte capacidade de vetorização dos carreadores de genes contendo MAN-PEG-PE.

Para o revestimento das nanocápsulas de núcleo lipídico estabilizadas com polissorbato 80 e revestidas com quitosana, foi utilizada uma nova metodologia baseada em interações eletrostáticas entre os grupamentos fosfato da manana e a quitosana que reveste a superfície das nanopartículas. Com base na literatura estudada e considerando as potencialidades associadas ao planejamento de nanocarreadores poliméricos revestidos com manana, é possível compreender a importância desta nova metodologia utilizada e o interesse crescente nesta área da ciência.

3. METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS UTILIZADOS

- Poli(*epsilon*-caprolactona) (PCL) $M_n = 10.000$ g/mol e $M_w = 14.000$ g/mol (Aldrich);
- Monoestearato de sorbitano (Span[®] 60) Delaware – Brasil);
- Polissorbato 80 (Delaware – Brasil)
- Triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico (TCC) (Delaware – Brasil)
- Lecitina - Fosfatidilcolina 75% LIPOID (S75) (Gerbas Química Farmacêutica Ltda)
- Manana (código do produto: 9036888) (Sigma - Aldrich)
- Membrana de celulose 0,45 μm (código WHA10463463) (Whatman)
- Quitosana de baixo peso molecular (código 448869) (Sigma – Aldrich)

3.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- Evaporador rotatório Büchi R-114 (Büchi, Suíça)
- Banho de aquecimento Büchi B-480 (Büchi, Suíça)
- Placa de agitação magnética (Fisatom, modelo 752^a)
- Zetasizer[®] Nanoseries (Malvern Reino Unido).
- Mastersizer[®] 2000 (Malvern, Reino Unido).

3.3 SOLVENTES UTILIZADOS

- Água destilada
- Água mili-Q (Destilador/deionizador Miliq-Q[®] - Millipore – EUA)
- Álcool etílico 95% (Vetec, Sigma – Aldrich)
- Ácido acético glacial (Nuclear – Brasil)

Todos os reagentes, produtos e solventes foram utilizados da forma como fornecidos.

3.4 MÉTODOS

3.4.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico

As formulações de nanocápsulas de núcleo lipídico estabilizadas com polissorbato 80 e lecitina foram preparadas utilizando-se a metodologia previamente descrita (BENDER e colaboradores, 2012), baseada no método de deposição de polímero desenvolvido por FESSI e colaboradores (1989). Também foram utilizadas as concentrações de ácido cáprico e caprílico e monoestearato de sorbitano otimizadas por JÄGER (2009).

O procedimento envolve uma fase orgânica preparada em acetona (250 mL, dissolvendo-se a poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (1000 mg), o Span[®] 60 (380 mg) e o triglicerídeo dos ácidos cáprico e caprílico (TCC) (1200 μ L). Foi preparada também uma fase etanólica dissolvendo-se o LIPOID S75 (600 mg) em 40 mL de etanol, que posteriormente foi adicionada à fase orgânica. Esta mistura foi então injetada em uma solução aquosa (500 mL) contendo polissorbato 80 (800 mg) sob agitação a 40^o C. A mistura foi então evaporada a pressão reduzida para a eliminação da acetona, que foi retirada do balão de recolhimento para posterior retirada da água da suspensão. Após o evaporação total da acetona, evaporou-se a água até que a suspensão fosse concentrada a um volume menor que 100 mL. Com a ajuda de um balão volumétrico ajustou-se volume final para 100 mL. Chamou-se esta formulação de LNC⁻

3.4.2 Revestimento das nanocápsulas de núcleo lipídico utilizando quitosana

Para o revestimento da LNC⁻ preparou-se uma solução de quitosana 1% (m/m), adicionando-se 0,1 g de quitosana e completando-se com uma solução

de ácido acético 1% (m/m) até o volume final de 10 mL. A solução de quitosana (10 mL) foi então adicionada à LNC⁻ (90 mL) sob agitação moderada. Deixou-se agitando por 2 h à temperatura ambiente. Chamou-se esta formulação de LNC⁻Quit⁺.

3.4.3 Revestimentos das LNC⁻Quit⁺ com manana

3.4.3.1 Metodologia 1: revestimento da LNC⁻Quit⁺ por gotejamento sobre a solução de manana

Com o intuito de revestir as LNC⁻Quit⁺ com manana a primeira e mais prática estratégia utilizada foi o gotejamento da solução de manana sobre a LNC⁻Quit⁺, sendo que as concentrações utilizadas foram escolhidas pelo fato de que em soluções de manana mais concentradas ocorre a formação de bolhas e as análises das nanopartículas não são confiáveis.

Para este revestimento, utilizou-se a estratégia de interações eletrostáticas layer-by-layer. Foi feita uma solução mãe contendo 6,075 mg de manana em 10 mL de solução. Utilizando esta solução foram feitas diluições e os revestimentos foram feitos utilizando-se 0,1 mL de água e 0,1 mL de solução de manana, sendo que as concentrações das soluções de manana utilizada foram: 0,01 mg/mL; 0,03 mg/mL; 0,06 mg/mL; 0,09 mg/mL; 0,12 mg/mL. Em 1,8 mL de LNC⁻Quit⁺. Gotejou-se 0,1 mL de água e 0,1 mL de solução de manana nas diferentes concentrações, sendo que as concentrações finais de manana foram de: 0,5 µg/mL; 1,5 µg/mL; 3,0 µg/mL; 4,5 µg/mL; 6,0 µg/mL para um volume final de 2 mL. As concentrações também podem ser expressas em µg de manana / mg de quitosana, sendo: 0,055 µg de manana / mg de quitosana; 0,166 µg de manana / mg de quitosana; 0,333 µg de manana / mg de quitosana; 0,5 µg de manana / mg de quitosana; 0,666 µg de manana / mg de quitosana. Deixou-se agitando por 2 h em temperatura ambiente. Chamou-se esta formulação de LNC⁻Quit⁺Man1.

3.4.3.2 Metodologia 2: revestimento da LNC⁻Quit⁺ por injeção da solução de manana

A segunda metodologia utilizada diferencia-se da primeira pelo fato de que a LNC⁻Quit⁺ é injetada na solução de manana. Esta estratégia foi utilizada seguindo-se a teoria da formação das nanocápsulas de núcleo lipídico, sendo que uma solução orgânica A é injetada em uma solução aquosa B e temos por fim A revestido com B. Com isto, injetou-se a LNC⁻Quit⁺ na solução de manana para que a LNC⁻Quit⁺ fosse revestida pela manana. Nesta metodologia as concentrações utilizadas foram menores se comparadas com a primeira metodologia, devido ao fato de que nesta metodologia a concentração de partículas é menor que na metodologia 1. Estas concentrações utilizadas também foram baixas para que não ocorresse a formação de bolhas.

Para os revestimentos das LNC⁻Quit⁺ com manana através da estratégia layer-by-layer foi feita uma solução mãe contendo 2,15 mg de manana em 10 mL de solução. Os revestimentos foram feitos injetando-se 4 mL de LNC⁻Quit⁺ em 6 mL de solução de manana, sendo as soluções de manana nas concentrações de: 0,833 µg/mL; 2,5 µg/mL; 5,0 µg/mL; 7,5 µg/mL; 10 µg/mL. As concentrações finais de manana foram de: 0,5 µg/mL; 1,5 µg/mL; 3,0 µg/mL; 4,5 µg/mL; 6,0 µg/mL para um volume final de 10 mL. . As concentrações também podem ser expressas em µg de manana / mg de quitosana, sendo: 0,125 µg de manana / mg de quitosana; 0,375 µg de manana / mg de quitosana; 0,750 µg de manana / mg de quitosana; 1,125 µg de manana / mg de quitosana; 1,5 µg de manana / mg de quitosana. Deixou-se agitando por 2 h em temperatura ambiente. Chamou-se esta formulação de LNC⁻Quit⁺Man2.

3.4.3.3 Metodologia 2 B: revestimento da LNC⁻Quit⁺ por injeção da solução de manana abrangendo as faixas de concentração das metodologias anteriores.

Para a metodologia 2B os experimentos foram feitos da mesma forma que a metodologia 2, sendo que a diferença neste caso é uma maior faixa de concentração utilizada (concentração expressa em µg de manana / mg de quitosana), que abrange as faixas de concentrações das duas metodologias

anteriores. Esta faixa de concentração foi feita para que as metodologias pudessem ser comparadas.

Para os revestimentos das LNC⁻Quit⁺ com manana através da estratégia layer-by-layer foi feita uma solução mãe contendo 20 mg de manana em 100 mL de solução. Os revestimentos foram feitos injetando-se 4 mL de LNC⁻Quit⁺ em 6 mL de solução de manana, sendo as soluções de manana nas concentrações de: 0,666 µg/mL; 0,133 µg/mL; 0,333 µg/mL; 0,666 µg/mL; 1,333 µg/mL; 3,333 µg/mL; 6,666 µg/mL. As concentrações finais são: 0,01 µg manana / mg quitosana; 0,02 µg manana / mg quitosana; 0,05 µg manana / mg quitosana; 0,10 µg manana / mg quitosana; 0,20 µg manana / mg quitosana; 0,50 µg manana / mg quitosana e 1,00 µg manana / mg quitosana respectivamente. Deixou-se agitando por 2 h em temperatura ambiente. Chamou-se esta formulação de LNC⁻Quit⁺Man2B.

3.4.4 Distribuição de tamanho, polidispersão e diâmetro médio das LNCs por difração de laser (Master Sizer)

A caracterização das nanopartículas foi realizada utilizando-se o equipamento Mastersizer[®] 2000 (Malvern UK).

Uma amostra líquida sem diluição prévia foi diretamente adicionada na unidade de análise por via úmida contendo água destilada como meio dispersante. Para as formulações LNC⁻ e LNC⁻Quit⁺ foi feita uma réplica de cada diferente lote. Para a LNC⁻ foi utilizado o índice de refração 1,590 e para a LNC⁻Quit⁺ 1,345 e ambas com obscuração mínima de 2%.

3.4.5 Distribuição de tamanho, polidispersão e diâmetro médio das LNCs por espalhamento de luz dinâmico (zeta sizer)

As análises de diâmetro foram realizadas no aparelho Zetasizer[®] Nanoseries ZS (Malvern, Reino Unido).

Para as análises de DLS, as amostras foram preparadas diluindo-se a suspensão de nanopartículas quinhentas vezes (500x) com água MilliQ[®] (previamente filtrada em 0,45 µm) em balão volumétrico (adicionou-se 20 µL e

completou-se até 10 mL). As amostras foram vertidas em cubeta apropriadas (Cubeta descartável 10 mm, 4,5 mL) e analisadas em triplicata de medidas, sendo cada replica uma media de 12 varreduras de 10 segundos cada. Os resultados foram obtidos por ajuste da curva de correlação pelo método dos cumulantes e pelo algoritmo CONTIN, sendo expressos em nm.

3.4.6 Determinação do potencial zeta das LNCs

As análises de potencial zeta foram realizadas no aparelho Zetasizer® Nanoseries ZS (Malvern, Reino Unido).

Para as análises de potencial zeta as amostras foram preparadas diluindo-se a suspensão de nanopartículas quinhentas vezes (500x) com solução de cloreto de sódio (filtrada em 0,45 μm) em balão volumétrico (adicionou-se 20 μL e completou-se até 10 mL). As amostras foram vertidas em cubeta apropriada (Cubeta descartável 10 mm, 4,5 mL) e analisadas em triplicata de medidas, sendo cada replica uma media de 12 varreduras de 10 segundos cada. Os resultados obtidos foram calculados a partir da determinação da mobilidade eletroforética e são expressos em valores de mV.

3.4.7 Determinação do pH das formulações

Os valores de pH das suspensões foram medidos utilizando-se um potenciômetro com eletrodo de vidro a 25 °C sem diluição das amostras, e previamente calibrado com tampão pH=4 e pH=7 (Haloquímica indústria e comércio Ltda).

3.4.8 Análise de diâmetro em função da concentração de manana (zeta sizer)

As análises de potencial zeta foram realizadas no aparelho Zetasizer® Nanoseries ZS (Malvern, Reino Unido).

Para as análises de DLS as amostras foram preparadas diluindo-se a suspensão de nanopartículas quinhentas vezes (500x) com água MilliQ® (previamente filtrada em 0,45 μm) em balão volumétrico (adicionou-se 20 μL e completou-se até 10 mL). As amostras foram vertidas em cubeta apropriada (Cubeta descartável 10 mm, 4,5 mL) e analisadas, sendo uma media de 12 varreduras de 10 segundos cada. Os resultados foram obtidos por ajuste da curva de correlação pelo método dos cumulantes e pelo algoritmo CONTIN, sendo expressos em nm.

3.4.9 Determinação do potencial zeta em função da concentração de manana

As análises de potencial zeta foram realizadas no aparelho Zetasizer® Nanoseries ZS (Malvern, Reino Unido).

Para as análises de potencial as amostras foram preparadas diluindo-se a suspensão de nanopartículas quinhentas vezes (500x) com água MiliQ (filtrada em 0,45 μm) em balão volumétrico (adicionou-se 20 μL e completou-se até 10 mL). As amostras foram vertidas em cubeta apropriada (Cubeta descartável 10 mm, 4,5 mL) e analisadas em triplicata de medidas, sendo cada replica uma media de 12 varreduras de 10 segundos cada. Os resultados obtidos foram calculados a partir da determinação da mobilidade eletroforética e são expressos em valores de mV para o potencial zeta.

3.4.10 Determinação da viscosidade em função da concentração de manana

Levando-se em consideração que a manana é uma macromolécula é possível sugerir que com o aumento de sua concentração em uma solução aquosa ocorra a formação de um gel e com isso a viscosidade aumente.

As análises de viscosidade foram realizadas em um Viscosímetro Vibracional Série SV-10 (AND, faixa 0,3 mPa.s à 10.000 mPa.s).

Foi feita a calibração do equipamento utilizando-se 35 mL de água a uma temperatura de $26,6 \pm 0,1$ °C, ajustando-se o valor da viscosidade para 0,92 mPa.s quando necessário.

Para as análises de viscosidade, todas as formulações foram adicionadas sem diluição prévia em cubeta de acrílico (volume mínimo 10 mL). Foram feitas 6 medições de viscosidade, sendo uma medição a cada 10 segundos durante 1 minuto.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. SUSPENSÕES DE NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO

As nanocápsulas de núcleo lipídico foram preparadas por deposição interfacial de polímero, apresentando aspecto macroscópico homogêneo. As formulações foram analisadas por difração de laser demonstrando uma população unimodal nanométrica (Figura 2), representando que existe apenas uma população de partículas no meio analisado. O índice de refração utilizado foi de 1,590 (referente ao látex de poliestireno), e a adição de amostra na unidade úmida foi suficiente para uma obscuração de 2.14%. Também são mostrados os valores de D[4,3] sendo 0.128 μm , valor de D[3,2] 0.117 μm , valor de d(0.1) 0.081 μm , valor de d(0.5) 0.123, valor de d(0.9) 0.183 μm , valor de span 0,825 e área específica de 48,9 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$. As formulações LNC⁻ apresentaram um pH = 4,6.

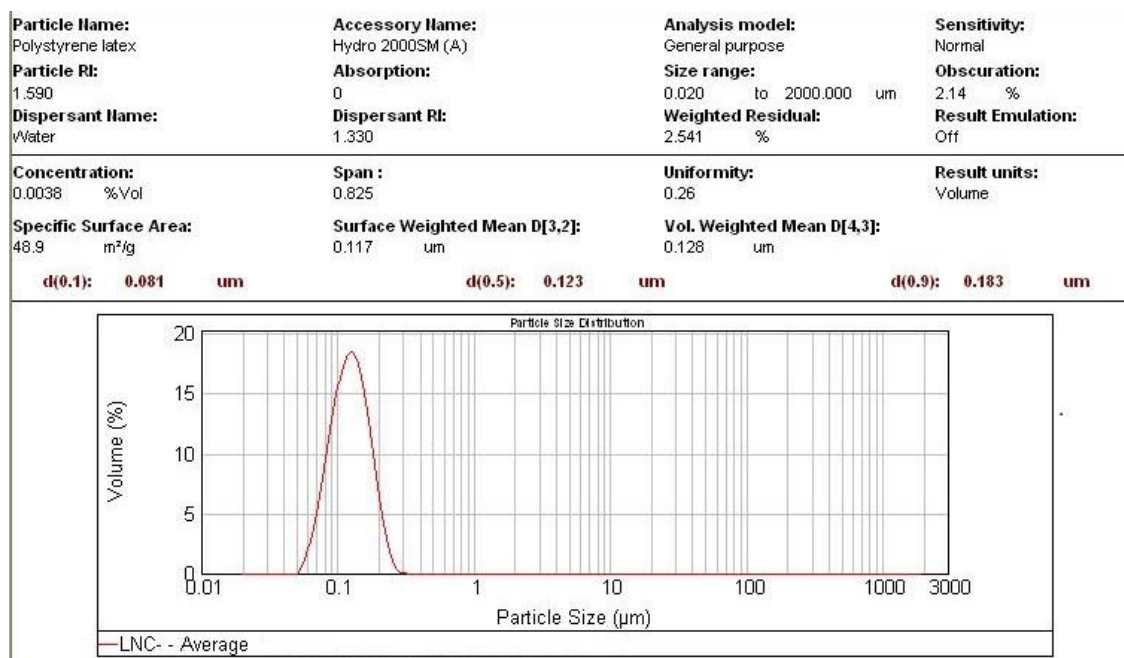


Figura 2: Distribuição de tamanho das nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC⁻) determinada por difração de laser.

As nanocápsulas foram posteriormente revestidas com quitosana e apresentaram também por difração de laser uma população nanométrica unimodal (Figura 3). O índice de refração utilizado foi de 1,345 (referente à quitosana), e a adição de amostra na unidade úmida foi suficiente para uma

obscuração de 2.21%. Também são mostrados (Figura 3) os valores de D[4,3] sendo 0.132 μm , valor de D[3,2] 0.116 μm , valor de d(0.1) 0.077 μm , valor de d(0.5) 0.125 μm , valor de d(0.9) 0.199 μm , valor de span 0.978 e área específica de 51.5 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$. As formulações LNC⁻Quit⁺ apresentaram um pH = 4,00

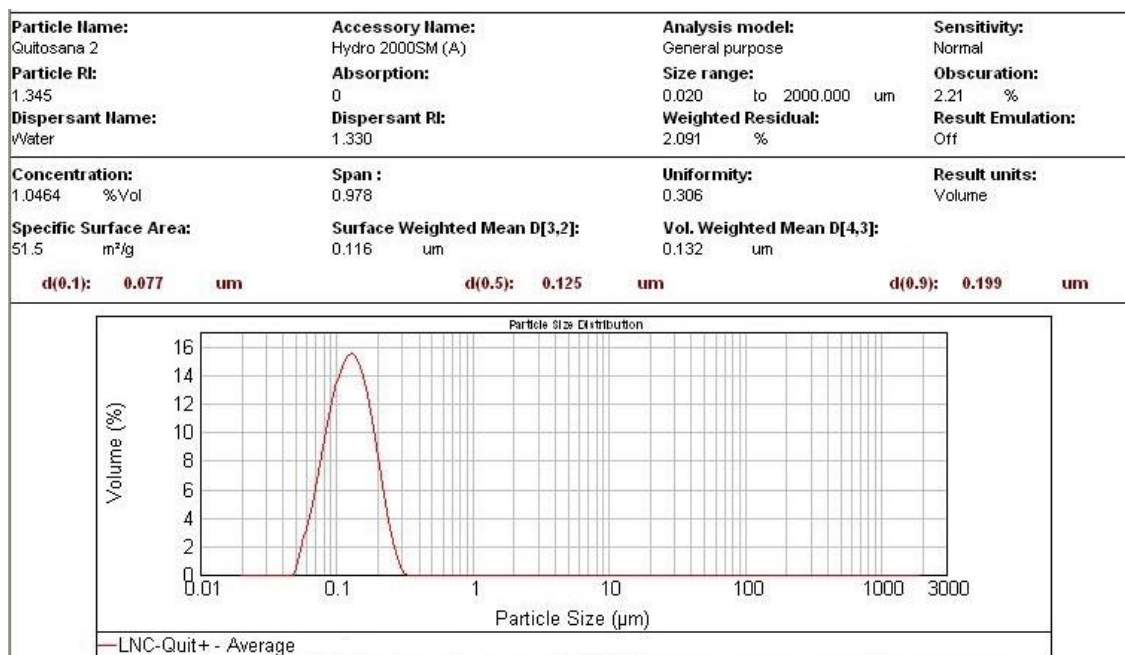


Figura 3: Distribuição de tamanho das nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com quitosana (LNC⁻Quit⁺) determinada por difração de laser.

Após a verificação de que apenas populações nanométricas unimodais estavam presentes, foram realizadas as análises de espalhamento de luz dinâmico de cada amostra para a determinação do diâmetro médio de cada formulação (Figura 4 e 5).

Analisando a figura 3 referente à LNC⁻, pode-se notar um perfil de curva monomodal, demonstrando que o sistema coloidal possui partículas da fase dispersa aproximadamente do mesmo tamanho, sendo que a intensidade deste pico é de 100% das partículas com diâmetro de 1161 nm com largura do pico de 66 nm. O resultado de índice de polidispersão obtido foi de 0,137 indicando a formação de sistemas monodispersos, sendo considerado um ótimo valor para uma curva unimodal (GOVENDER et al, 1999).

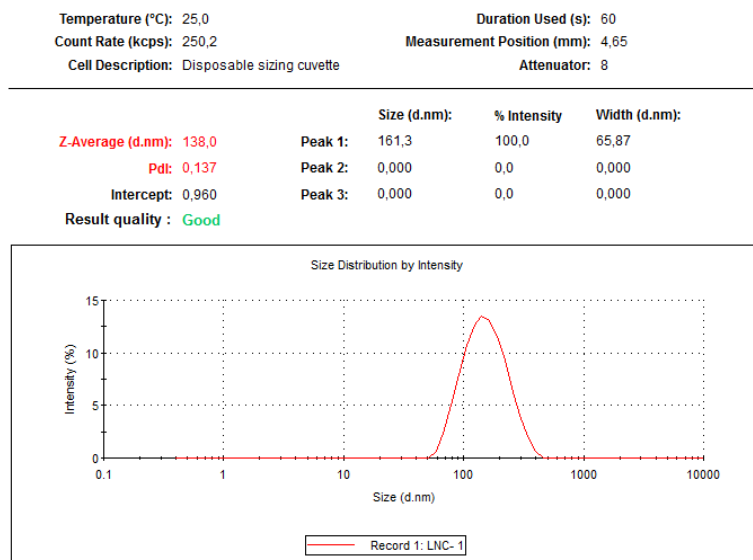


Figura 4: Análise de espalhamento de luz dinâmico realizada na formulação LNC⁻.

Analisando a figura 4 referente à LNC⁻Quit⁺ tem-se um perfil de curva monomodal e assim como na LNC⁻ as partículas da fase dispersa possuem aproximadamente o mesmo tamanho, sendo que a intensidade deste pico é de 100% para partículas com um diâmetro de 197 nm com largura de pico de 88 nm. O índice de polidispersão obtido foi de 0,208 indicando a formação de um sistema monodisperso e sendo considerado um ótimo valor para uma curva unimodal.

Com os resultados de espalhamento de luz dinâmico (tabela I) e potencial zeta (tabela III) é possível concluir que o revestimento com quitosana realmente ocorreu. Primeiramente temos um aumento no diâmetro quando é feito o revestimento com quitosana, sendo que a LNC⁻ possui um diâmetro de 161 nm e quando revestida com quitosana passa a ter 197 nm. Tratando-se do potencial zeta, é visto que ocorre uma inversão nas cargas, sendo que a LNC⁻ possui um potencial zeta de -7,5 mV e a LNC⁻Quit⁺ passa a ter 23,6 mV. Esta inversão de cargas demonstra que a superfície da partícula foi revestida.

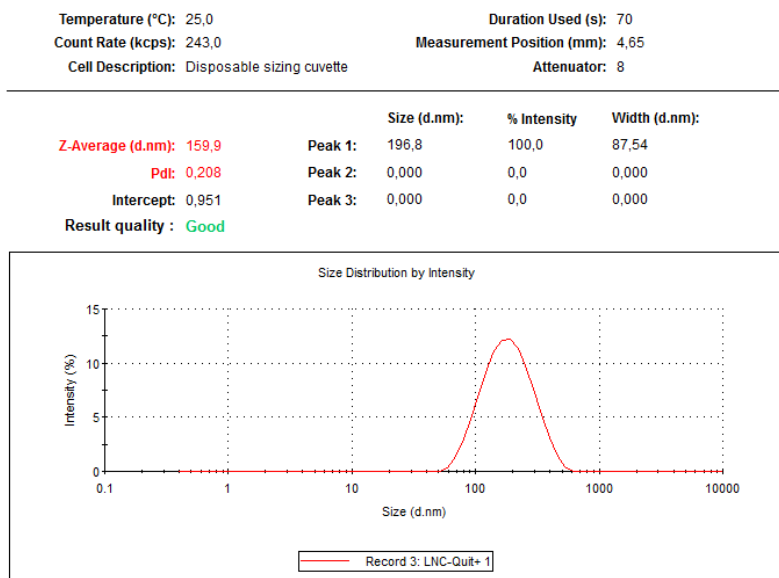


Figura 5: Análise de espalhamento de luz dinâmico realizada em uma suspensão de nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas com quitosana.

4.2. REVESTIMENTOS DAS LNC⁻QUIT⁺ COM MANANA POR INTERAÇÕES ELETROSTÁTICAS (METODOLOGIA 1)

Uma vez caracterizada a formulação de LNC⁻ e LNC⁻Quit⁺, deu-se continuidade aos revestimentos com manana na superfície das nanopartículas, utilizando-se a estratégia de interações eletrostáticas pela metodologia 1. Para esta parte do estudo foram feitos três lotes diferentes de LNC⁻ e LNC⁻Quit⁺ e cada série de revestimentos feita em um dos diferentes lotes (tabelas I, II e III).

Foi feita uma curva com diferentes concentrações de manana para que pudesse ser observado o comportamento das nanopartículas (tabela IV e figuras 5). As diferentes concentrações utilizadas foram de: 0,5 µg/mL; 1,5 µg/mL; 3,0 µg/mL; 4,5 µg/mL; 6,0 µg/mL.

Na Tabela I é possível observar os valores referentes aos diâmetros das nanopartículas nos diferentes lotes sintetizados para posterior revestimento com manana. Comparando os valores das formulações LNC⁻ e LNC⁻Quit⁺ observa-se que quando ocorre o revestimento com quitosana o diâmetro aumenta de 159 ± 5 para 194 ± 19 mostrando que ocorre a formação de uma camada de quitosana que faz com que o diâmetro das nanopartículas aumente.

Tabela I: Valores referentes ao diâmetro das formulações, expressos em nm.

Formulação	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Média ± DP
LNC-	160	163	154	159 ± 5
LNC-Quit+	177	191	215	194 ± 19

Para os valores de mobilidade eletroforética da LNC⁻ em todos os casos tem-se valores negativos devido a grupamentos fosfato que estão presentes na fosfatidilcolina utilizada na formulação. A quitosana utilizada para o revestimento da LNC⁻ possui um valor de mobilidade eletroforética positivo, com isso, quando o revestimento com quitosana é feito, ocorre uma inversão no valor da mobilidade eletroforética de $-0,6917 \pm 0,4$ para $1,4233 \pm 0,6$ (tabela II), sendo que o mesmo ocorre também para o potencial zeta (tabela III).

Na Tabela II é possível observar os valores referentes à mobilidade eletroforética das nanopartículas nos diferentes lotes sintetizados para posterior revestimento com manana.

Tabela II: Valores referentes à mobilidade eletroforética das formulações, expressos em $\mu\text{mcm/Vs}$.

Formulação	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Média \pm DP
LNC-	-0,383	-0,529	-1,163	-0,6917 \pm 0,4
LNC-Quit+	1,004	1,136	2,130	1,4233 \pm 0,6

Na Tabela III é possível observar os valores referentes ao potencial zeta das nanopartículas nos diferentes lotes sintetizados para posterior revestimento com manana.

Tabela III: Valores referentes ao potencial zeta das formulações, expressos em mV.

Formulação	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Média \pm DP
LNC-	-4,9	-6,8	-16,1	-9,2 \pm 6,0
LNC-Quit+	12,8	14,5	27,2	18,2 \pm 7,9

Nos revestimentos das LNC⁻Quit⁺ com manana feitos utilizando-se a estratégia de interações eletrostáticas através da metodologia 1, os resultados mostram que em todas as concentrações utilizadas, se considerado o valor do desvio padrão, os valores dos diâmetros permanecem praticamente os mesmo (tabela IV). Foi feito teste ANOVA que mostrou que os resultados não possuem diferença significativa. Estes resultados demonstram que os revestimentos possivelmente não ocorreram, já que com o aumento da concentração de manana não é visto um aumento ou diminuição do diâmetro das nanopartículas.

Na Tabela IV é possível observar os valores referentes aos diâmetros das nanopartículas revestidas com diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas pela metodologia 1.

Tabela IV: Valores de diâmetro das LNC⁻Quit⁺Man nas diferentes concentrações de Manana pela metodologia 1, expressos em nm.

Manana µg/mL	Reação 1	Reação 2	Reação 3	Média ± DP
0,0*	177	191	215	194 ± 19
0,5	173	217	344	245 ± 89
1,5	168	218	200	196 ± 25
3,0	279	212	222	238 ± 36
4,5	172	206	209	196 ± 20
6,0	166	265	209	213 ± 50

0,0*: LNC⁻Quit⁺

Na figura 5 e 6 podem ser observados os perfis de diâmetros e de potencial zeta respectivamente, de todos os revestimentos, onde os mesmos foram feitos em triplicata de lotes. Nas concentrações de 1,5 µg/mL e 3,0 µg/mL observa-se um diâmetro na escala nanométrica, diferentemente dos outros, que possuem certas quantidades de agregados na escala micrométrica. É possível sugerir que estas populações micrométricas nas concentrações de 0,5 µg/mL, 4,5 µg/mL e 6,0 µg/mL sejam agregados formados por manana juntamente com quitosana. Com o aumento da concentração de manana, o diâmetro das nanopartículas deveria ter uma variação (tanto para mais quanto para menos) e o que ocorre aqui é a formação de populações nanométricas menores que as populações das nanopartículas e agregados micrométricos, evidenciando novamente que os revestimentos não ocorreram.

Nas concentrações de 0,5 µg/mL, 1,5 µg/mL e 6,0 µg/mL também possuem populações nanométricas menores do que as referentes às nanopartículas. Considerando que a manana é um polissacarídeo com uma estrutura de cadeia muito grande, sugere-se que estas populações nanométricas sejam formadas por cadeias de manana difundidas em solução que interagem entre si.

Na figura 6 para os revestimentos das concentrações de 4,5 $\mu\text{g/mL}$ e 6,0 $\mu\text{g/mL}$ é possível notar mais de um pico nos perfis de potencial zeta. Este pico possui um valor menor do que do que o dos picos majoritários, sugerindo que o equipamento pode estar identificando manana livre em solução, o que também pode ser confirmado pelos perfis de diâmetro da figura 5.

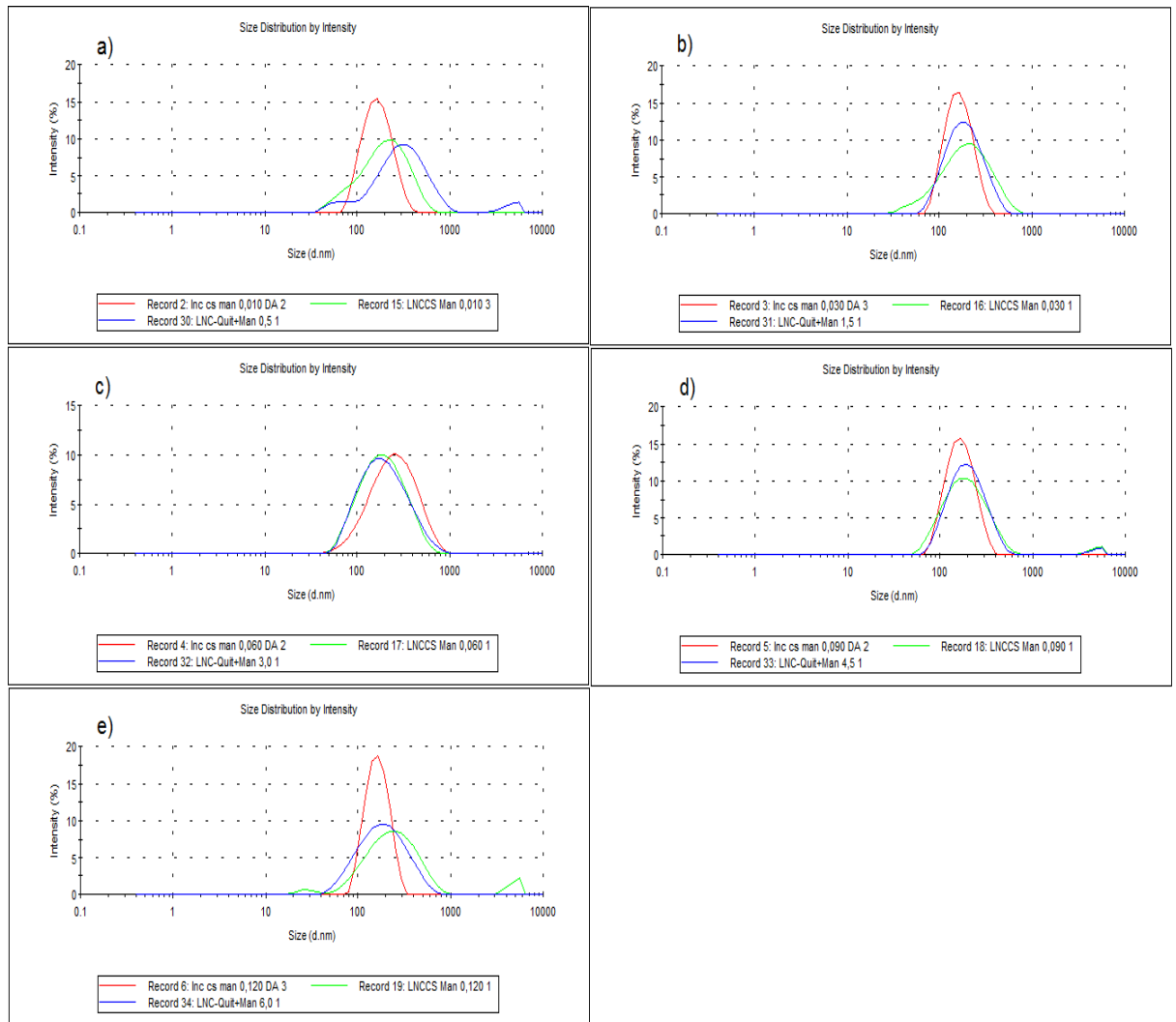


Figura 5: Perfis de diâmetro das LNC-Quit+Man nas diferentes concentrações de manana utilizando-se a metodologia 1. a) 0,5 $\mu\text{g/mL}$; b) 1,5 $\mu\text{g/mL}$; c) 3,0 $\mu\text{g/mL}$; d) 4,5 $\mu\text{g/mL}$; 6,0 $\mu\text{g/mL}$. Cada gráfico mostra as três réplicas sobrepostas.

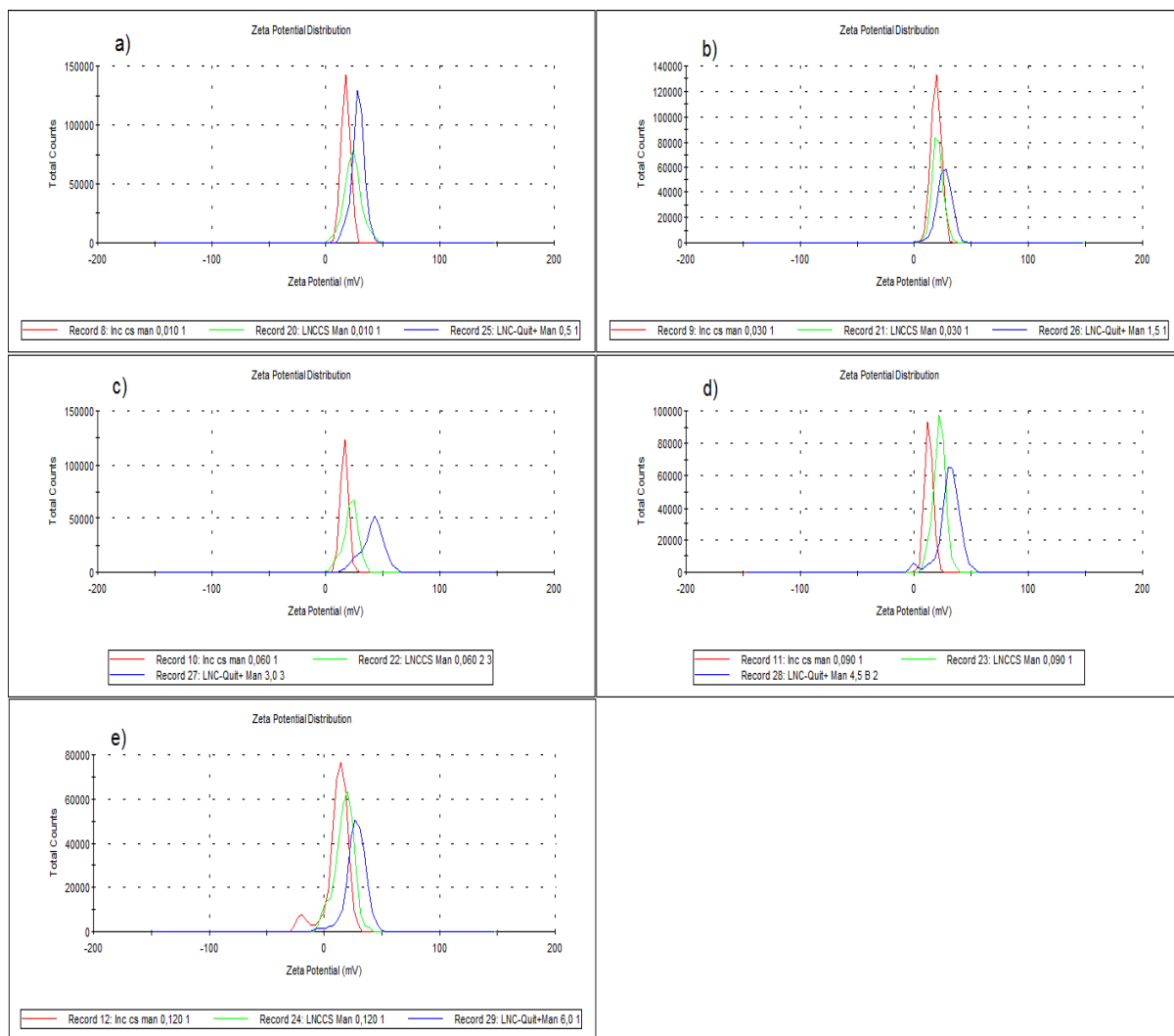


Figura 6: Perfis de Potencial zeta das LNC⁻Quit⁺Man nas diferentes concentrações de manana utilizando-se a metodologia 1. a) 0,5 µg/mL; b) 1,5 µg/mL; c) 3,0 µg/mL; d) 4,5 µg/mL; 6,0 µg/mL. Cada gráfico mostra as três réplicas sobrepostas.

As nanopartículas utilizadas neste trabalho são formuladas com lecitina 75% (presença de grupamento fosfato que confere carga parcialmente negativa) e posteriormente revestidas com quitosana, sendo que a superfície da partícula, após ser revestida com quitosana, demonstra uma inversão de carga, passando a apresentar carga parcialmente positiva. A manana possui carga parcial negativa devido ao grupamento fosfato presente em sua estrutura, com isso, quando a partícula positiva é revestida com manana, a mobilidade eletroforética e o potencial zeta teoricamente deveriam diminuir.

Com relação à mobilidade eletroforética, inicialmente a LNC⁻Quit⁺ possuía uma mobilidade de $1,4 \pm 0,6 \mu\text{mcm/Vs}$. Com o aumento da concentração de manana a mobilidade eletroforética teoricamente deveria diminuir, devido à carga parcialmente negativa da manana. Para todas as concentrações utilizadas, se considerado o desvio padrão, a mobilidade eletroforética permanece praticamente a mesma, sugerindo que o revestimento não ocorreu. Com isso, pode-se sugerir que ocorre o desprendimento de quitosana da superfície da partícula, e que esta quitosana juntamente com a manana formam microagregados de manana revestidos com quitosana, mascarando o resultado da mobilidade eletroforética e fazendo com que os valores não se alterem.

Na Tabela V é possível observar os valores referentes à mobilidade eletroforética das nanopartículas revestidas com diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas pela metodologia 1.

Tabela V: Valores de mobilidade eletroforética das LNC⁻Quit⁺Man nas diferentes concentrações de Manana pela metodologia 1, expressos em $\mu\text{mcm/Vs}$.

Manana $\mu\text{g/mL}$	Reação 1	Reação 2	Reação 3	Média \pm DP
0,0*	1,00	1,14	2,13	$1,42 \pm 0,62$
0,5	1,35	1,84	2,20	$1,79 \pm 0,43$
1,5	1,49	1,60	2,06	$1,72 \pm 0,30$
3,0	1,26	1,68	3,17	$2,04 \pm 1,00$
4,5	0,99	1,72	2,22	$1,64 \pm 0,62$
6,0	0,85	1,34	2,12	$1,44 \pm 0,64$

0,0*: LNC⁻Quit⁺

Pelos dados obtidos nas análises pode-se dizer que os revestimentos com manana não ocorreram, primeiramente devido aos valores de diâmetro, onde se encontrou populações micrométricas e nanométricas em escalas diferentes das nanopartículas. Outra evidência é a mobilidade eletroforética, que não apresentou mudança em relação às nanopartículas sem manana.

4.3. REVESTIMENTOS DAS LNC⁻QUIT⁺ COM MANANA POR INTERAÇÕES ELETROSTÁTICAS (METODOLOGIA 2)

Considerando que ao utilizar a metodologia 1, com gotejamento das soluções de manana sobre a suspensão de nanopartículas, não foram detectadas mudanças significativas nos diâmetros e propriedades das nanopartículas, optou-se por realizar um novo conjunto de experimentos mudando a metodologia, conforme descrito na Parte Experimental. Nesses experimentos a proporção manana/LNC⁻Quit⁺ foi aumentada em cerca de 15 vezes, sendo que a suspensão de nanopartículas foi injetada nas soluções de manana. Foram utilizadas soluções de manana com as mesmas concentrações do primeiro conjunto de experimentos, mudando apenas os volumes relativos dos componentes.

Foi feita uma curva (tabela VII) com diferentes concentrações de manana para que pudesse ser observado o comportamento das nanopartículas. As concentrações utilizadas foram de: 0,5 µg/mL; 1,5 µg/mL; 3,0 µg/mL; 4,5 µg/mL; 6,0 µg/mL. Nesta parte do estudo foi feito apenas um lote de LNC⁻ e LNC⁻Quit⁺ e o mesmo, utilizado para a triplicata de revestimentos nas diferentes concentrações de manana.

Na Tabela VI é possível observar os valores referentes ao diâmetro, mobilidade eletroforética e potencial zeta das formulações LNC⁻ e LNC⁻Quit⁺ do lote 4, utilizadas para posterior revestimento com manana. Nesta tabela é possível observar que ocorre a inversão do potencial zeta de -16,1 mV para 27,2 mV e aumento do diâmetro de 154 nm para 214 nm quando as nanopartículas são revestidas com quitosana, sendo os valores dentro do esperado.

Tabela VI: Valores de diâmetro (nm), mobilidade eletroforética ($\mu\text{mcm/Vs}$) e potencial zeta (mV) referentes à formulação do lote 4.

Formulação	Diâmetro	Mobilidade Eletroforética	Potencial Zeta
LNC-	154	-1,16	-16,1
LNC-Quit+	214	2,13	27,2

Nos revestimentos feitos utilizando-se a estratégia de interações eletrostáticas das nanopartículas com manana através da metodologia 2, os resultados mostram que inicialmente nas concentrações de 0,50 $\mu\text{g/mL}$, 1,5 $\mu\text{g/mL}$ e 6,0 $\mu\text{g/mL}$ ocorre uma diminuição no diâmetro das nanopartículas de 157 nm, 167 nm e 171 nm respectivamente (tabela VII), em relação à LNC⁻ Quit⁺ (214 nm). Nas concentrações de 3,0 $\mu\text{g/mL}$ e 4,5 $\mu\text{g/mL}$, se levado em consideração o desvio padrão obtido, os diâmetros praticamente não se alteram. Pode-se sugerir que a diminuição dos diâmetros das nanopartículas revestidas com quitosana se deve ao fato de ter ocorrido uma contração da cobertura por questões eletrostáticas, ocorrendo uma compactação. Outra sugestão para esta diminuição é que na maioria das soluções existem contaminantes de polissacarídeos livres (manana) que são macromoléculas e que impactam na média dos diâmetros, por isto é necessário analisar os perfis, pois somente as médias não são suficientes.

Na tabela VII é possível observar os valores referentes aos diâmetros das nanopartículas revestidas com diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas através da metodologia 2, sem considerar as populações micrométricas obtidas nas formulações. Esta tabela está relacionada com a figura 9, onde podem ser observados os perfis de diâmetro de todos os revestimentos. Também é possível notar que a concentração de 4,5 $\mu\text{g/mL}$ apresenta um desvio padrão maior que os das outras formulações

Tabela VII: Valores de diâmetro das LNC-Quit+Man nas diferentes concentrações de Manana pela metodologia 2 expressos em nm.

Manana $\mu\text{g/mL}$	Reação 4A	Reação 4B	Reação 4C	Média \pm DP
0,0*				214
0,5	148	151	170	157 \pm 12
1,5	159	182	159	167 \pm 13
3,0	230	160	208	199 \pm 36
4,5	183	273	166	208 \pm 57
6,0	148	175	189	171 \pm 21

0,0*: Formulação LNC-Quit⁺

Na figura 9 podem ser observados os perfis de diâmetros de todos os revestimentos, onde os mesmos foram feitos em triplicata de lotes. Nas concentrações de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ e 3,0 $\mu\text{g/mL}$ observa-se que as partículas possuem apenas um diâmetro na escala nanométrica, diferentemente dos outros revestimentos feitos, que têm certas quantidades de agregados na escala micrométrica. É possível sugerir que estas populações micrométricas nas concentrações de 1,5 $\mu\text{g/mL}$, 4,5 $\mu\text{g/mL}$ e 6,0 $\mu\text{g/mL}$ sejam agregados formados por manana em excesso juntamente com quitosana.

Nas concentrações de 4,5 $\mu\text{g/mL}$ e 6,0 $\mu\text{g/mL}$ também possuem populações nanométricas menores do que as referentes às nanopartículas. Considerando que a manana é um polissacarídeo com uma estrutura de cadeia muito grande, sugere-se que estas populações nanométricas sejam formadas por cadeias de manana difundidas em solução que interagem entre si.

ANOVA demonstrou que não existe diferença significativa entre os valores das médias de diâmetro das reações 4A, 4B e 4C.

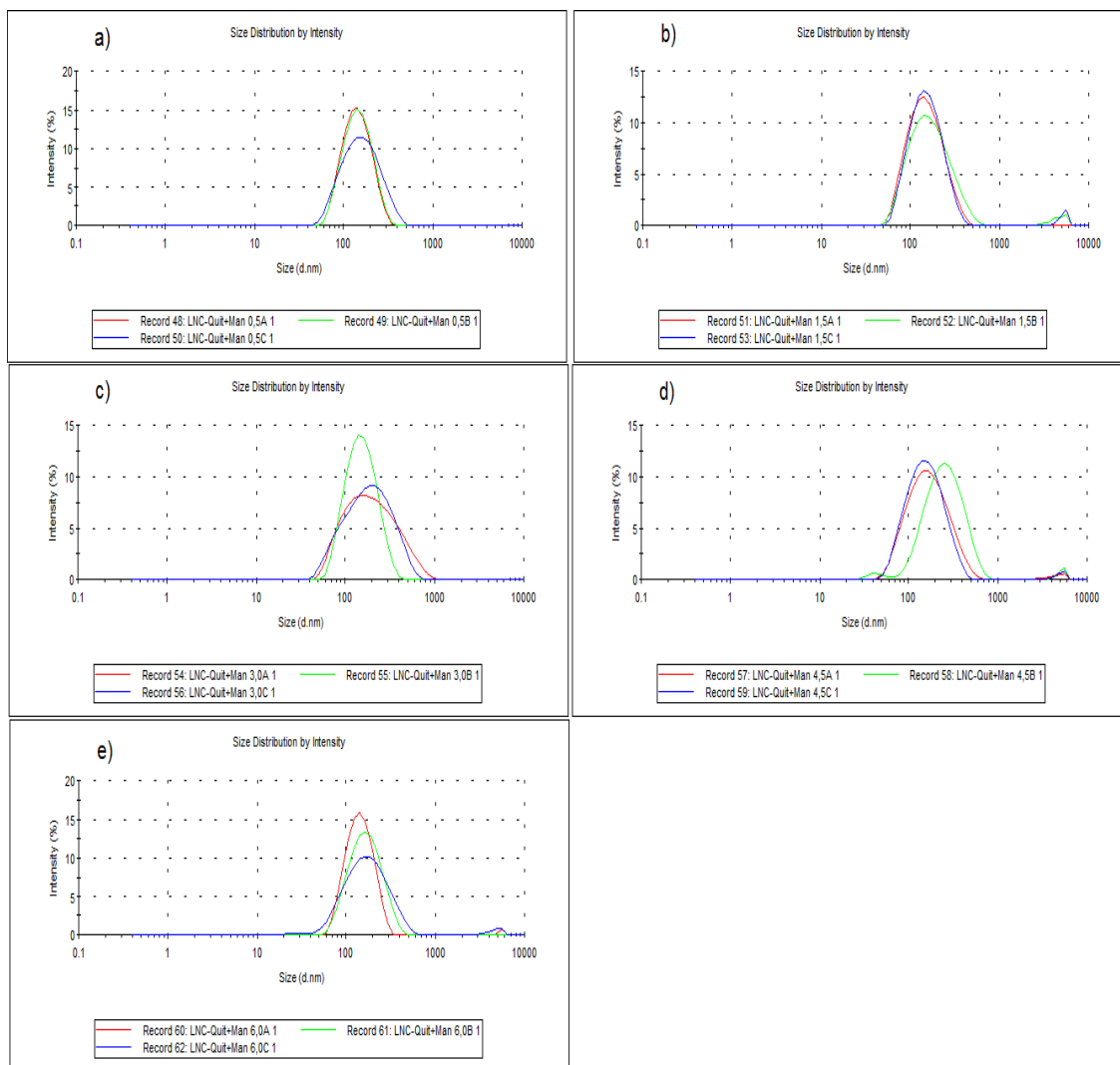


Figura 7: Perfis de diâmetro das LNC-Quit+Man nas diferentes concentrações de manana através da metodologia 2. a) 0,5 µg/mL; b) 1,5 µg/mL; c) 3,0 µg/mL; d) 4,5 µg/mL; 6,0 µg/mL. Cada gráfico mostra as três réplicas sobrepostas.

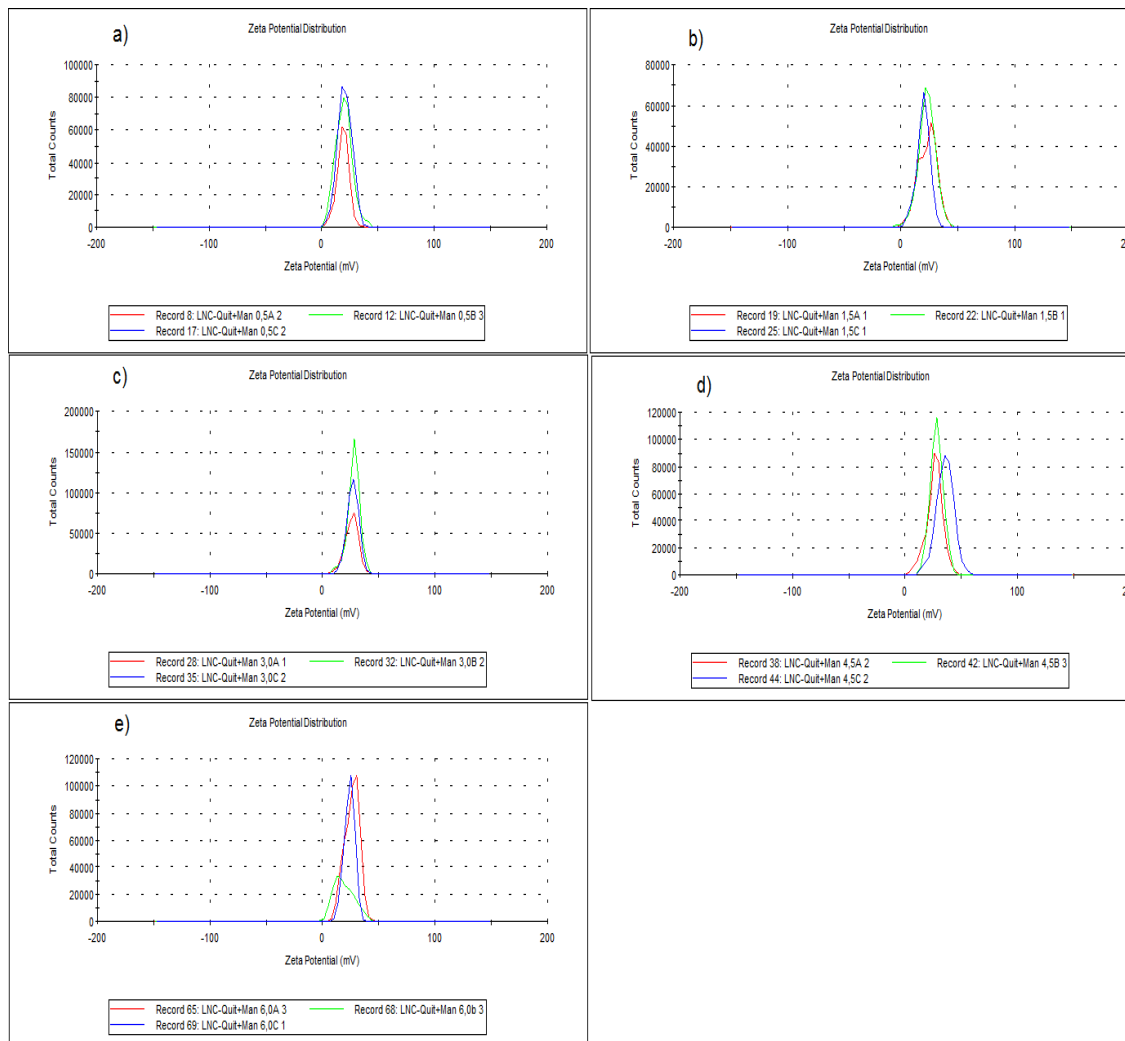


Figura 8: Perfis de potencial zeta das LNC⁻Quit⁺Man nas diferentes concentrações de manana através da metodologia 2. a) 0,5 µg/mL; b) 1,5 µg/mL; c) 3,0 µg/mL; d) 4,5 µg/mL; 6,0 µg/mL. Cada gráfico mostra as três réplicas sobrepostas.

Na tabela VIII é possível observar os valores referentes ao potencial zeta das nanopartículas revestidas com diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas através da metodologia 2, sendo que para a concentração de 4,5 µg/mL de manana o potencial zeta é o mesmo da LNC⁻Quit⁺ e que para todas as outras concentrações ocorre uma diminuição destes valores.

Se observados os valores de potencial zeta nestas concentrações (tabela VIII), pode-se notar que os mesmos são iguais (considerando desvio padrão) aos das nanopartículas revestidas somente com quitosana. Sugere-se que pode estar ocorrendo a formação de agregados de manana, revestidos por quitosana que se desprende da superfície das nanopartículas, sendo evidenciado pela figura 9 onde são mostradas populações nanométricas em faixas menores do que a das nanopartículas. O fato do valor do potencial zeta ser praticamente o mesmo das nanopartículas revestidas apenas com quitosana, mostra que o equipamento obteve a medida apenas da quitosana superficial, tanto dos agregados quanto das nanopartículas.

Tabela VIII: Valores referentes ao potencial zeta das LNC⁻Quit⁺Man nas diferentes concentrações de manana pela metodologia 2 expressos em mV.

Manana µg/mL	Reação 4A	Reação 4B	Reação 4C	Média ± DP
0,0*				28,3
0,5	18,8	19,6	20,5	19,6 ± 0,8
1,5	23,2	22,9	19,5	21,9 ± 2,0
3,0	25,8	27,6	26,9	26,8 ± 0,9
4,5	26,2	28,0	35,3	29,8 ± 4,8
6,0	26,1	19,2	23,9	23,1 ± 3,5

0,0*: Formulação LNC⁻Quit⁺

Estes valores de potencial zeta demonstram que a manana pode não possuir grupamentos fosfato suficientes para que ocorra uma diminuição nos valores de potencial zeta.

Foram feitas análises de viscosidade das nanopartículas revestidas com manana para que se pudesse observar a influência da manana livre no meio. Em todas as concentrações de manana os valores foram inferiores ao valor da

LNC^{Quit}, sendo que diminuíram de 5,56 mPa.s para 2,58 mPa.s, 2,61 mPa.s, 2,70 mPa.s, 2,65 mPa.s e 2,82 mPa.s respectivamente (tabela IX).

Levando em consideração o desvio padrão das viscosidades obtidas na tabela IX é possível afirmar que nas concentrações de 0,5 µg/mL, 1,5 µg/mL, 3,0 µg/mL e 4,5 µg/mL os valores são praticamente iguais. Na concentração de 0,6 µg/mL tem-se um excesso de manana, onde ocorre a formação de um gel, fazendo com que o valor de viscosidade seja maior do que nas outras concentrações.

Na tabela IX é possível observar a comparação dos valores de viscosidade entre as soluções de manana e as nanopartículas contendo manana. Levando em consideração que a viscosidade da água pura é 1,00 mPa.s à 20 °C pode-se notar que as soluções de manana estão muito diluídas e sua viscosidade está muito próxima à viscosidade da água.

Tabela IX: Valores comparativos de viscosidade entre as soluções de manana e as nanopartículas revestidas com manana.

Manana µg/mL	Soluções de Manana	Revestimentos
0,5	1,02	2,58 ± 0,620
1,5	0,99	2,61 ± 0,570
3,0	1,02	2,70 ± 0,101
4,5	1,03	2,65 ± 0,096
6,0	1,05	2,82 ± 0,042

Com relação à viscosidade quanto maior a concentração de manana em solução, maior deve ser seu valor. Na tabela IX são mostrados os valores de viscosidade para as diferentes soluções de manana utilizadas e é possível notar que em todas essas concentrações os valores de viscosidade estão muito próximos aos da água, e isto ocorre pelo fato de que a concentração de manana utilizada é muito pequena, não sendo o suficiente para demonstrar uma variação na viscosidade das soluções.

Para que se pudesse avaliar a estabilidade das nanopartículas revestidas com manana foram feitas novas análises após 24 horas, sendo que as formulações foram estocadas em temperatura próxima a 5 °C.

A figura 15 mostra os perfis dos diâmetros das nanopartículas revestidas nas diferentes concentrações de manana após 24 horas. Na concentração de

0,5 $\mu\text{g/mL}$ há só uma população de partículas com diâmetro nanométrico. Nas concentrações 1,5 $\mu\text{g/mL}$, 3 $\mu\text{g/mL}$ e 6 $\mu\text{g/mL}$ surge uma população adicional com o diâmetro micrométrico. Já nas concentrações 4,5 $\mu\text{g/mL}$ e 6 $\mu\text{g/mL}$ também são observadas populações nanométricas com diâmetros menores que nas partículas usuais.

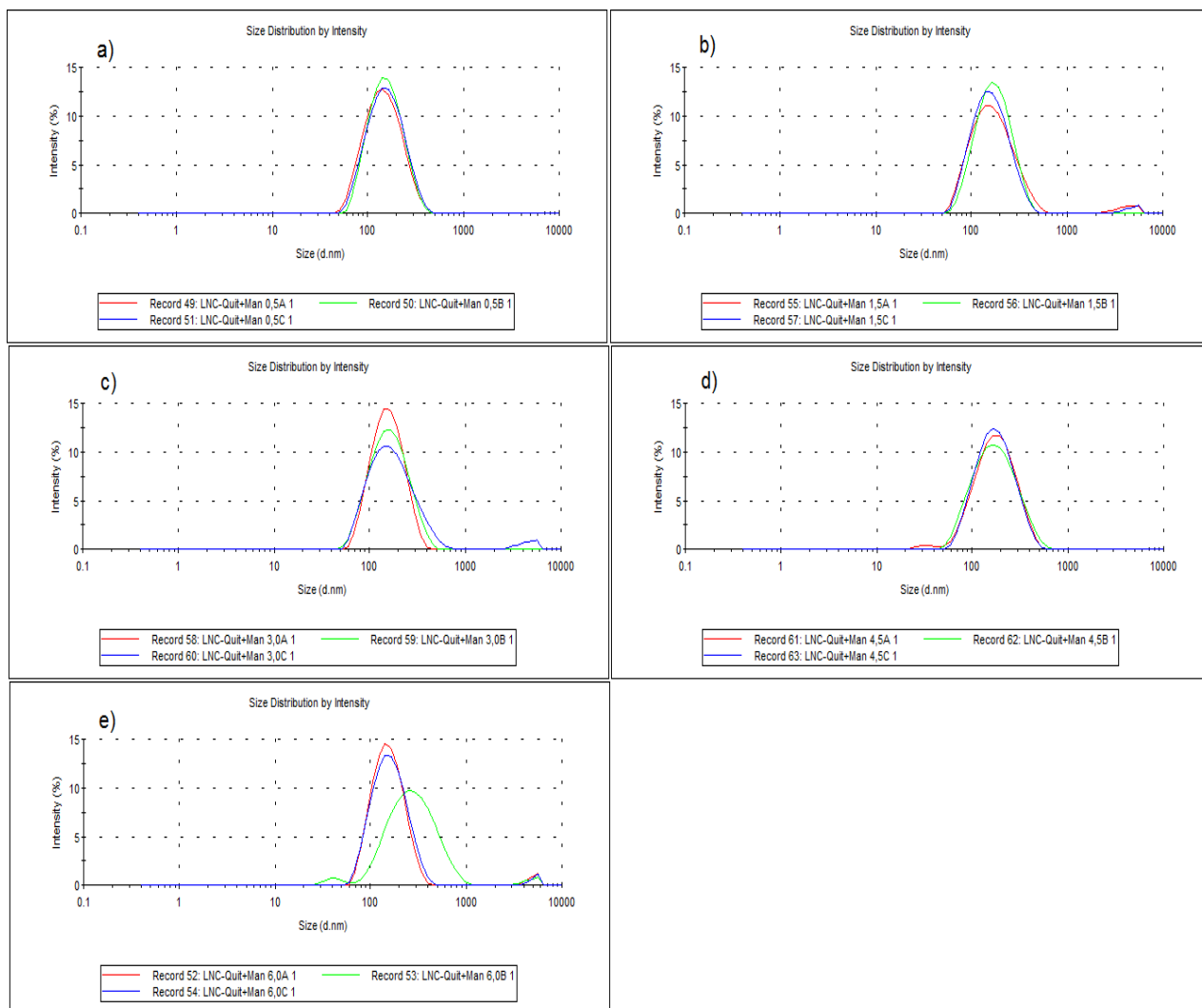


Figura 9: Perfis de diâmetro das LNC-Quit+Man nas diferentes concentrações de manana após 24 horas. a) 0,5 $\mu\text{g/mL}$; b) 1,5 $\mu\text{g/mL}$; c) 3,0 $\mu\text{g/mL}$; d) 4,5 $\mu\text{g/mL}$; 6,0 $\mu\text{g/mL}$. Cada gráfico mostra as três réplicas sobrepostas.

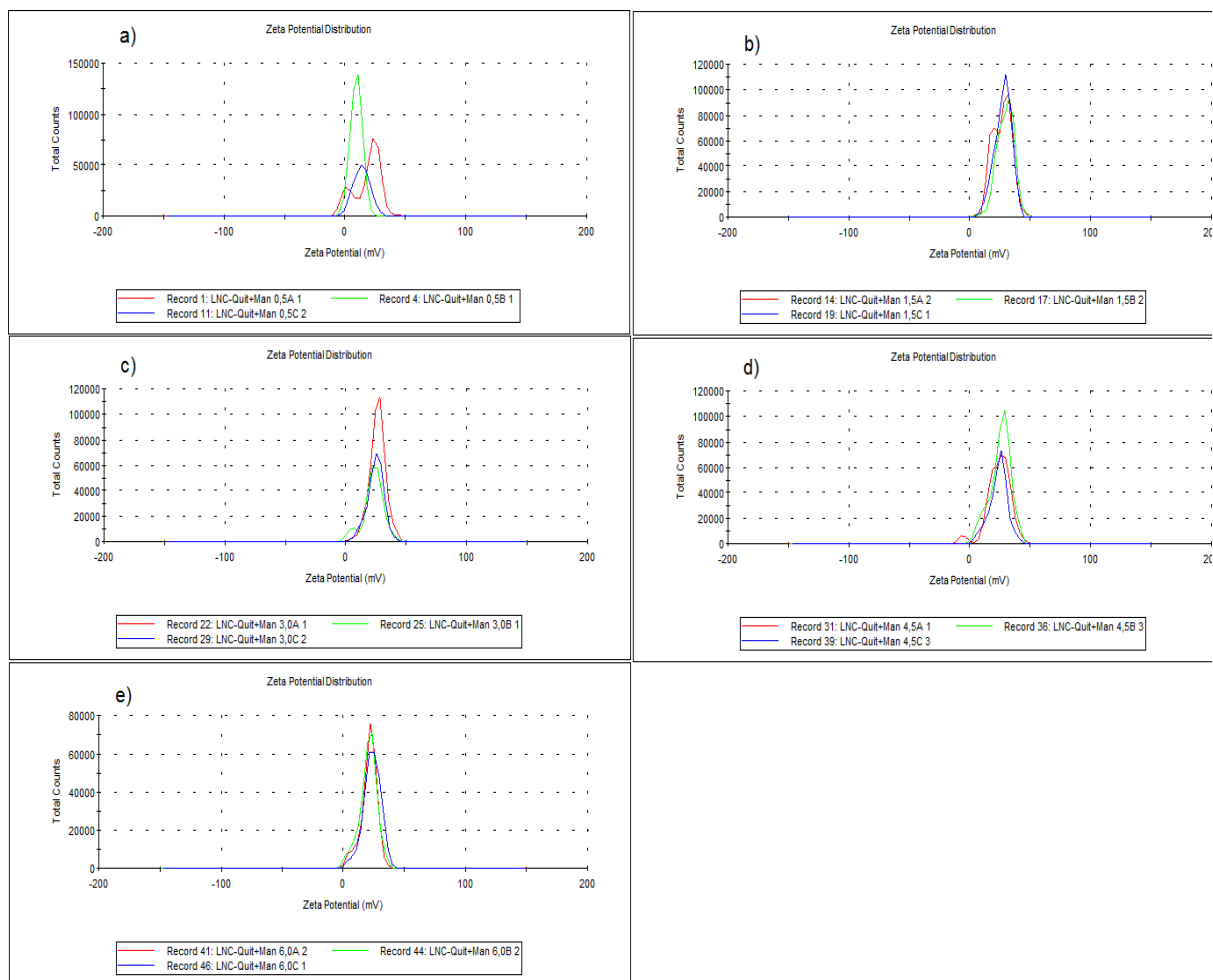


Figura 10: Perfis de potencial zeta das LNC-Quit⁺Man nas diferentes concentrações de manana após 24 horas. a) 0,5 µg/mL; b) 1,5 µg/mL; c) 3,0 µg/mL; d) 4,5 µg/mL; 6,0 µg/mL. Cada gráfico mostra as três réplicas sobrepostas.

Na tabela X é possível observar os valores referentes aos diâmetros das nanopartículas revestidas com diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas através da metodologia 2 após 24 horas, sem considerar as populações micrométricas obtidas nas formulações. Esta tabela e a figura 15 mostram que o diâmetro se mantém praticamente o mesmo.

Tabela X: Valores comparativos de diâmetro das LNC⁻Quit⁺Man nas diferentes concentrações de manana após reação e após 24 horas. Valores expressos em nm.

Manana µg/mL	Diâmetro após reação	Diâmetro após 24 horas
0,5	157 ± 12	161 ± 5
1,5	167 ± 13	178 ± 7
3,0	199 ± 36	174 ± 12
4,5	208 ± 57	189 ± 2
6,0	171 ± 21	211 ± 81

Na tabela XI é possível observar os valores referentes ao potencial zeta das nanopartículas revestidas com diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas através da metodologia 2 após 24 horas. Nesta tabela e na figura 16, é visto que na concentração de 0,5 µg/mL assim como nas concentrações de 1,5 µg/mL, 3,0 µg/mL e 4,5 µg/mL, ocorre o aparecimento de um segundo pico, demonstrando que existe outra população. Com este resultado de potencial zeta, pode-se sugerir que após 24 horas a manana se desprende da superfície da partícula. Na concentração de 6,0 µg/mL o potencial zeta não apresenta um segundo pico, indicando que nesta concentração a manana pode não ter se desprendido. Teste ANOVA demonstrou que não existe diferença significativa entre as médias das duas populações de diâmetro após reação e após 24 horas.

Tabela XI: Valores comparativos de potencial zeta das LNC⁻Quit⁺Man nas diferentes concentrações de manana após reação e após 24 horas. Valores expressos em mV.

Manana µg/mL	Potencial Zeta após reação	Potencial Zeta após 24 horas
0,5	19,63 ± 0,850	11,8 ± 2,13
1,5	21,87 ± 2,055	27,4 ± 2,23
3,0	26,77 ± 0,907	22,0 ± 6,00
4,5	29,83 ± 4,819	18,5 ± 7,70
6,0	23,07 ± 3,525	21,7 ± 1,60

Na tabela XII é possível observar os valores referentes à viscosidade das nanopartículas revestidas com diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas através da metodologia 2 após 5 dias. Nesta tabela são mostrados os valores de viscosidade, onde ocorre uma diminuição de $2,58 \pm 0,620$ mPa.s para $1,39 \pm 0,035$ mPa.s sugerindo que ocorre uma reestruturação da dispersão coloidal após 5 dias.

Tabela XII: Valores comparativos de viscosidade das LNC⁻Quit⁺Man nas diferentes concentrações de manana após reação e após 24 horas. Valores expressos em mPa.s.

Manana µg/mL	Viscosidade após reação	Viscosidade após 5 dias
0,5	2,58 ± 0,620	1,39 ± 0,035
1,5	2,61 ± 0,570	1,40 ± 0,114
3,0	2,70 ± 0,101	1,30 ± 0,188
4,5	2,65 ± 0,096	1,29 ± 0,042
6,0	2,82 ± 0,042	1,28 ± 0,060

Na concentração de 0,5 µg/mL os resultados anteriores sugerem que pode ter ocorrido o revestimento, e com o dado da viscosidade 5 dias depois, é possível notar a reestruturação do sistema. Nas outras concentrações, pode ter ocorrido a estabilização de agregados, fazendo com que a manana não esteja livre em solução, diminuindo assim a viscosidade do meio.

4.4. REVESTIMENTOS DAS LNC⁻QUIT⁺ COM MANANA POR INTERAÇÕES ELETROSTÁTICAS ABRANGENDO AS DUAS FAIXAS DE CONCENTRAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANTERIORES (METODOLOGIA 2B)

Considerando que as duas metodologias anteriores possuíam proporções diferentes de manana / LNC⁻Quit⁺, foi feita uma nova metodologia abrangendo as duas faixas de concentrações das anteriores, com o intuito de compará-las. Com o resultado obtido na metodologia 2, foi determinado que o método utilizado seria o de injeção da LNC⁻Quit⁺ nas soluções de manana. Seguiu-se com os experimentos conforme descrito previamente na Parte Experimental. Para melhor comparar as concentrações utilizadas nas metodologias anteriores com a metodologia 2B, foi feita a tabela XIII, onde é possível observar a faixa das concentrações em µg manana / mg quitosana de todas as metodologias utilizadas.

Tabela XIII: comparação entre as concentrações utilizadas nas metodologias 1, 2 e 2B. Valores de concentração em µg de manana / mg de quitosana.

Metodologia 1	Metodologia 2	Metodologia 2B
-	-	0,010
-	-	0,020
0,055	-	0,050
0,166	-	0,100
0,333	0,125	0,200
0,500	0,375	0,500
0,666	0,750	1,000
-	1,125	-
-	1,500	-

Para dar continuidade nos revestimentos, foi feita uma LNC⁻ que posteriormente foi revestida com quitosana. Na tabela XIV são mostrados os valores referentes ao diâmetro e potencial zeta das formulações LNC⁻ e LNC⁻Quit⁺ do lote feito para a metodologia 2B (lote 5) para posterior revestimento com manana. Nesta tabela é possível observar que ocorre a inversão do

potencial zeta de -7,5 mV para 23,6 mV e aumento de diâmetro de 161 nm para 197 nm quando as nanopartículas são revestidas com quitosana, sendo os valores dentro do esperado.

Tabela XIV: Valores de diâmetro (nm), mobilidade eletroforética ($\mu\text{mcm/Vs}$) e potencial zeta (mV) referentes à formulação do lote 5.

Formulação	Diâmetro	Mobilidade Eletroforética	Potencial Zeta
LNC-	161	-0,587	-7,5
LNC-Quit+	197	1,853	23,6

Foi feita uma curva (tabela XV) com diferentes concentrações de manana para que pudesse ser observado o comportamento das nanopartículas. As concentrações utilizadas serão demonstradas através de μg de manana / mg de quitosana, sendo que essas concentrações foram de: 0,01 μg manana/mg quitosana; 0,02 μg manana/mg quitosana; 0,05 μg manana/mg quitosana; 0,10 μg manana/mg quitosana; 0,20 μg manana/mg quitosana; 0,50 μg manana/mg quitosana e 1,00 μg manana/mg quitosana. Nesta parte do estudo foi feito apenas um lote de LNC⁻ e LNC⁻Quit⁺ e o mesmo, utilizado para a triplicata de revestimentos nas diferentes concentrações de manana.

Tabela XV: Valores de diâmetro das LNC-Quit+Man nas diferentes concentrações de Manana pela metodologia 2 expressos em nm.

Manana $\mu\text{g/mL}$	Reação 5A	Reação 5B	Reação 5C	Média \pm DP
0,0*				197
0,01	183	170	185	179 \pm 8
0,02	155	206	156	172 \pm 29
0,05	183	181	156	173 \pm 15
0,10	217	169	185	190 \pm 24
0,20	197	167	178	181 \pm 15
0,50	162	189	155	169 \pm 18
1,00	174	183	192	183 \pm 9

0,0*: Formulação LNC⁻Quit⁺

Nos revestimentos feitos utilizando-se a estratégia de interações eletrostáticas das nanopartículas com manana através da metodologia 2B, com

relação ao diâmetro (figura 11 e tabela XV), os resultados mostraram que em todas as concentrações utilizadas ocorreu a formação de micro agregados, e que nas concentrações de 0,02 µg de manana / mg de quitosana e 1,00 µg de manana / mg de quitosana ocorrem também, populações em escala nanométrica menores do que as de nanopartículas. É possível que essas populações nanométricas menores sejam formadas por cadeias de manana livre em solução e que o potencial zeta para estas concentrações sejam referentes aos micro agregados. Foi feito teste ANOVA e foi visto que não existe diferença significativa entre as médias dos valores das reações 5A, 5B e 5C.

Tabela XVI: Valores referentes ao potencial zeta das LNC⁻Quit⁺Man nas diferentes concentrações de manana pela metodologia 2B, expressos em mV.

Manana µg/mL	Reação 5A	Reação 5B	Reação 5C	Média ± DP
0,0*				23,6
0,01	18,5	11	20,4	16,5 ± 3,5
0,02	14,2	20,8	24,3	19,8 ± 5,1
0,05	14,7	19,9	20,2	18,3 ± 3,1
0,10	20,1	12,5	17,7	16,8 ± 3,9
0,20	20,8	22,8	25,7	23,1 ± 2,5
0,50	24,8	18,1	23,9	22,3 ± 3,6
1,00	16,2	23	25,6	21,6 ± 4,9

0,0*: Formulação LNC⁻Quit⁺

Tratando-se do potencial zeta (figura 12 e tabela XVI), para as concentrações de 0,01 µg manana / mg quitosana; 0,02 µg manana / mg quitosana; 0,05 µg manana / mg quitosana; 0,10 µg manana / mg quitosana; 0,20 µg manana / mg quitosana e 1,00 µg manana / mg quitosana, ocorre a formação de um segundo pico próximo a zero, sugerindo que devido a interação da manana com a quitosana na superfície das nanopartículas, pode ter ocorrido o desprendimento de algumas cadeias de quitosana e formado agregados microscópicos. É visto que estes agregados microscópicos possuem potencial zeta igual à zero, sendo que isto ocorre somente com

algumas partículas, e que a maioria delas continua em escala nanométrica e revestida com quitosana, com potencial zeta um pouco mais elevado do que as partículas revestidas somente com quitosana. Este potencial zeta mais elevado é devido à quitosana que se desprende da superfície das nanopartículas, sendo que este aumento ocorre nas concentrações de 0,02 μg manana / mg quitosana, 0,20 μg manana / mg quitosana, 0,50 μg manana / mg quitosana e 1,00 μg manana / mg quitosana.

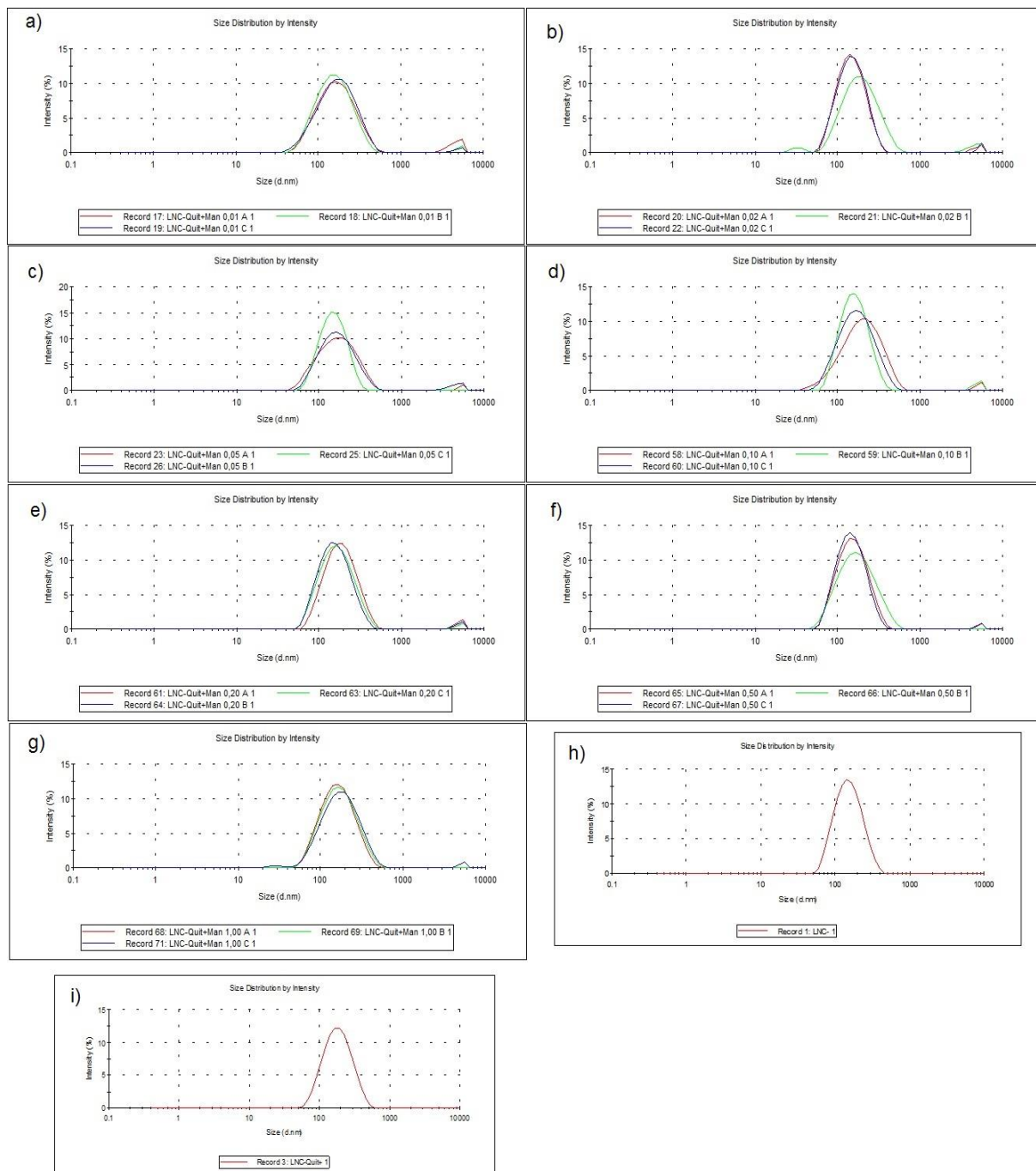


Figura 11: Perfis de diâmetro das LNC⁻Quit⁺Man₂B nas diferentes concentrações de manana através da metodologia 2. a) 0,01 µg manana/mg quitosana; b) 0,02 µg manana/mg quitosana; c) 0,05 µg manana/mg quitosana; d) 0,10 µg manana/mg quitosana; e) 0,20 µg manana/mg quitosana; f) 0,50 µg manana/mg quitosana; g) 1,00 µg manana/mg quitosana; h) LNC⁻ e i) LNC⁻Quit⁺.

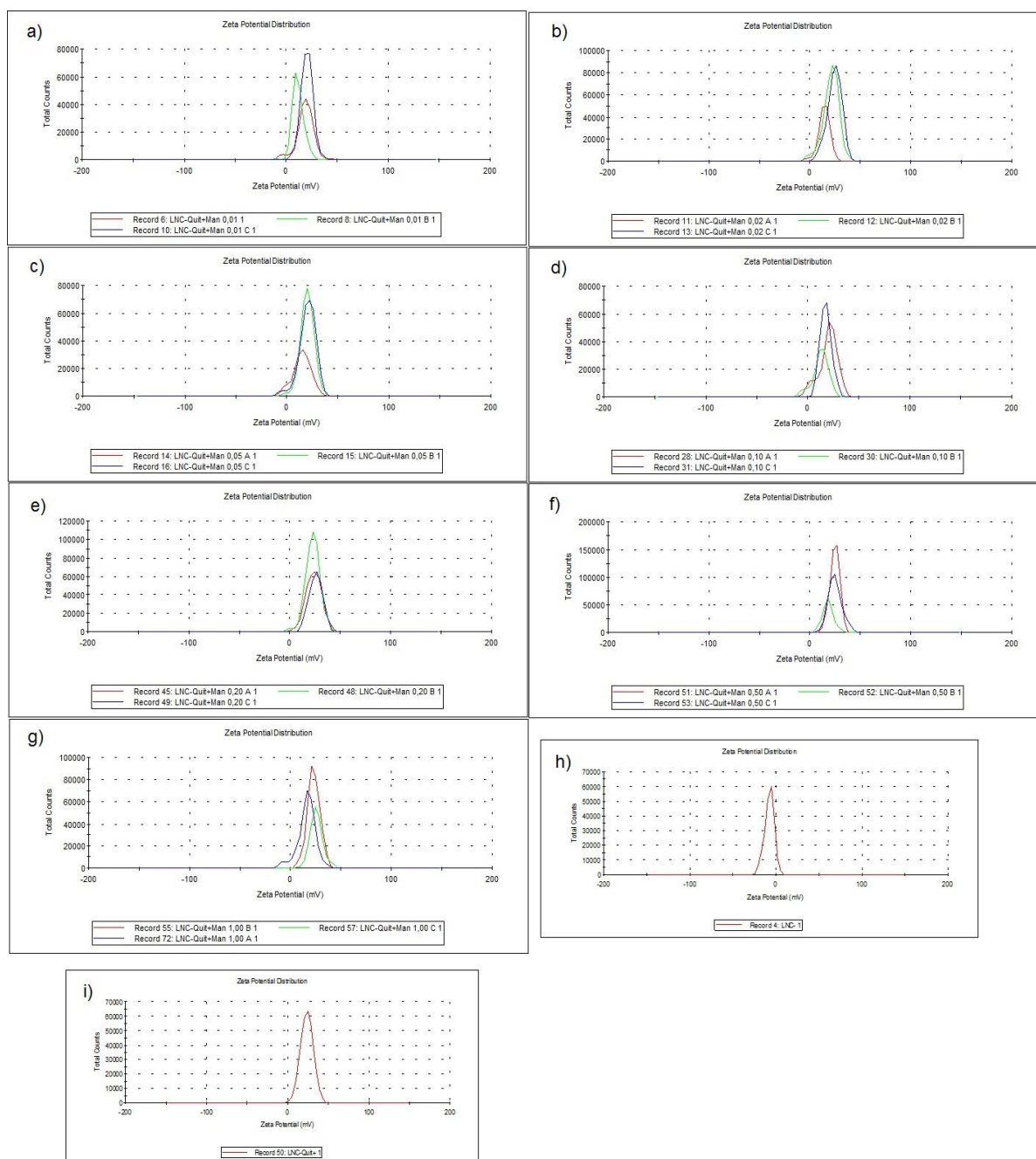


Figura 12: Perfis de potencial zeta das LNC-Quit⁺Man2B nas diferentes concentrações de manana através da metodologia 2. a) 0,01 μg manana/mg quitosana; b) 0,02 μg manana/mg quitosana; c) 0,05 μg manana/mg quitosana; d) 0,10 μg manana/mg quitosana; e) 0,20 μg manana/mg quitosana; f) 0,50 μg manana/mg quitosana; g) 1,00 μg manana/mg quitosana; h) LNC⁻ e i) LNC-Quit⁺.

5. CONCLUSÃO

A metodologia 1 mostrou que os valores obtidos não são reprodutíveis, sendo que tanto pelas análises de potencial zeta quanto pelas análises de diâmetro não é possível ter uma conclusão concreta. Os resultados obtidos nessa metodologia não demonstraram uma similaridade entre si.

Com relação à metodologia 2, é possível sugerir que o revestimento das nanopartículas ocorreu na concentração de 0,125 µg manana / mg quitosana (0,5 µg/mL), pois os valores se mostraram reprodutíveis, tendo uma diminuição nos valores de diâmetro e de potencial zeta. Foi visto também que após 24 horas a manana se desprende da superfície da partícula. Com o resultado de que a manana se desprende da superfície da partícula após 24 horas, sugere-se a criação de um kit para que a formulação seja feita na hora de sua utilização. Tratando-se da viscosidade, observa-se uma diminuição da mesma após 5 dias, sugerindo que tenha ocorrido uma reestruturação da dispersão coloidal.

A metodologia 2B foi feita para que se pudesse provar que os revestimentos abaixo da concentração de 0,125 µg manana / mg quitosana ocorrem, mas foi visto que o comportamento das nanopartículas é similar em concentrações menores que esta, não ocorrendo os revestimentos, muito provavelmente pelo fato de que as interações de hidrogênio entre a água e a manana são mais fortes do que as interações eletrostáticas dos grupamentos fosfato da manana com a quitosana que reveste a superfície das partículas. Também é possível concluir que a quantidade de grupamentos fosfato presentes na manana não sejam suficientes para manter a estabilidade da partícula.

Neste trabalho também é possível observar que as metodologias utilizadas (potencial zeta e diâmetro) não possuem sensibilidade suficiente para identificar uma diferença nas nanopartículas das diferentes amostras, sendo que se considerado o desvio padrão de algumas amostras, os valores são iguais, não sendo possível identificar se os revestimentos realmente ocorreram, se ocorreu a formação de agregados de manana, agregados de partículas ou agregados formados por quitosana que se desprende da superfície da partícula. Com a análise dos resultados só é possível dizer que o agregado

formado possui potencial zeta igual à zero, não sendo possível dizer qual é o agregado formado.

Com isso, uma das perspectivas deste trabalho seria a utilização das metodologias propostas por HADDADI (2014) para a utilização de um polímero com terminações ácido carboxílico a fim de melhorar a força de ligação entre a manana e a quitosana presente na superfície da partícula. Outra perspectiva seria a utilização da metodologia proposta por ASTHANA (2014) para que a proporção N/P (mols de grupamentos amina da quitosana por grupamentos fosfato do manana) fosse mantida em 1:1 para a obtenção da completa complexação. Outras perspectivas seriam a verificação dos agregados formados através da quantificação da manana e testes de aglutinação frente à concanavalina A e captação e reconhecimento de captação em macrófagos.

6. ANEXOS

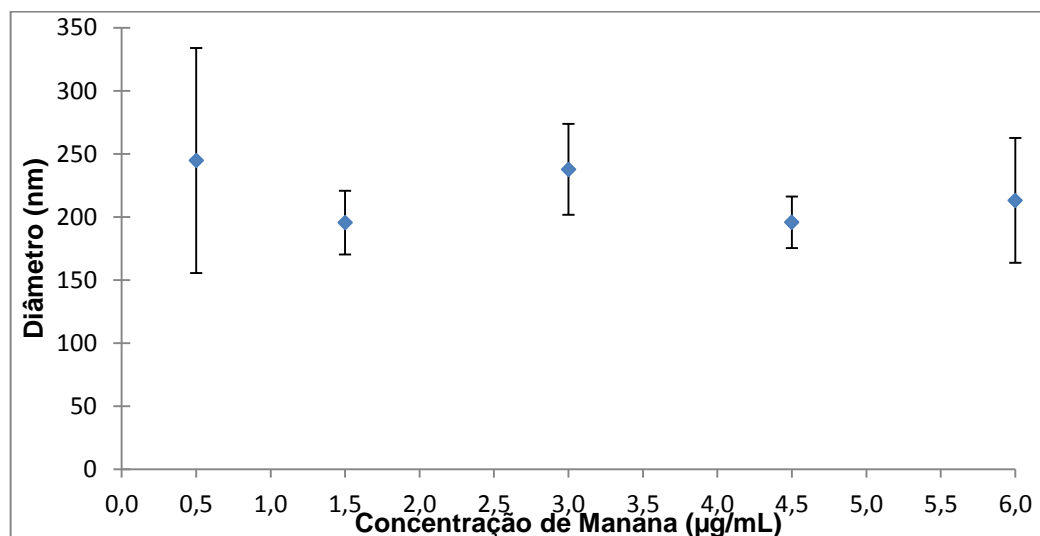


Figura 13: Comportamento das nanopartículas frente às diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas. Valores referentes aos diâmetros versus concentração das LNC⁻Quit⁺Man⁻ obtidos.

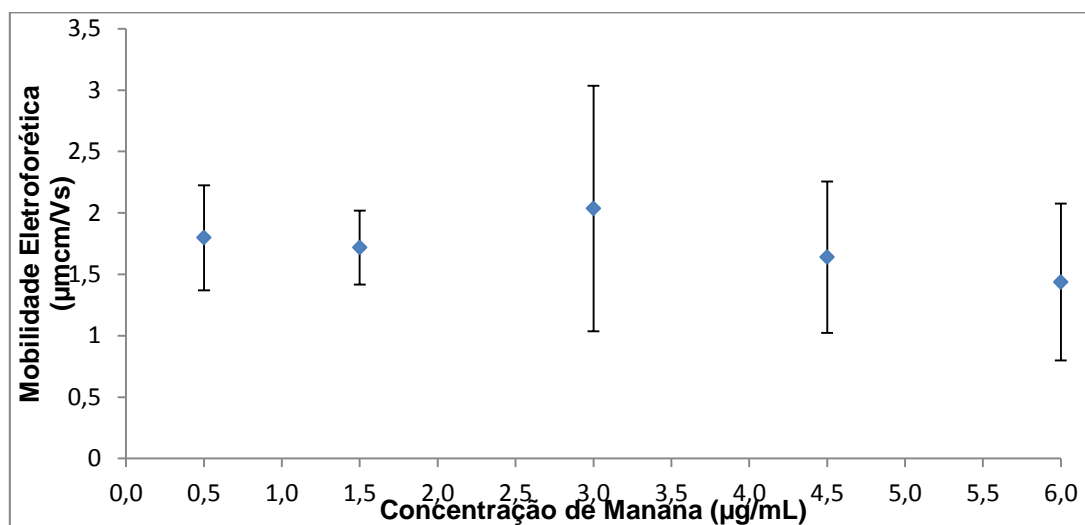


Figura 14: Comportamento das nanopartículas frente às diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas. Valores referentes à mobilidade eletroforética versus concentração das LNC⁻Quit⁺Man⁻ pela metodologia 1.

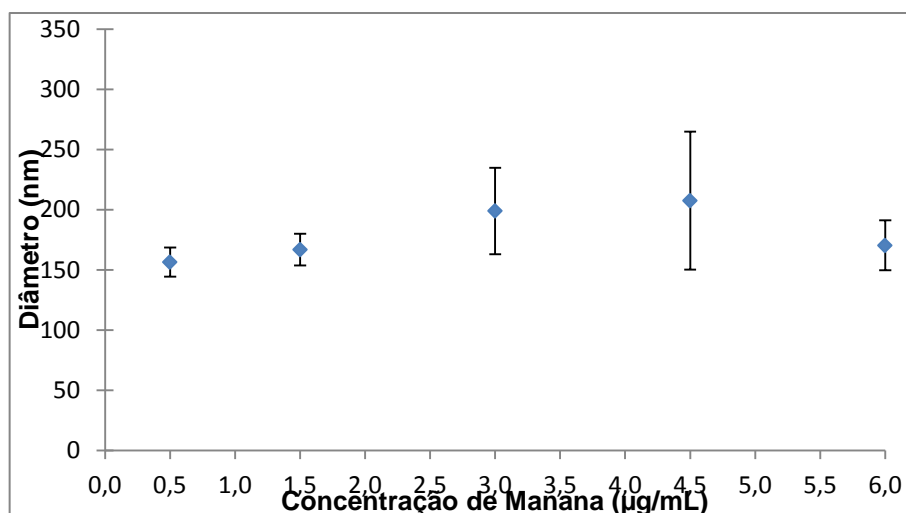


Figura 15: Comportamento das nanopartículas frente às diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas pela metodologia 2. Valores referentes aos diâmetros versus concentração das LNC⁻Quit⁺Man obtidos.

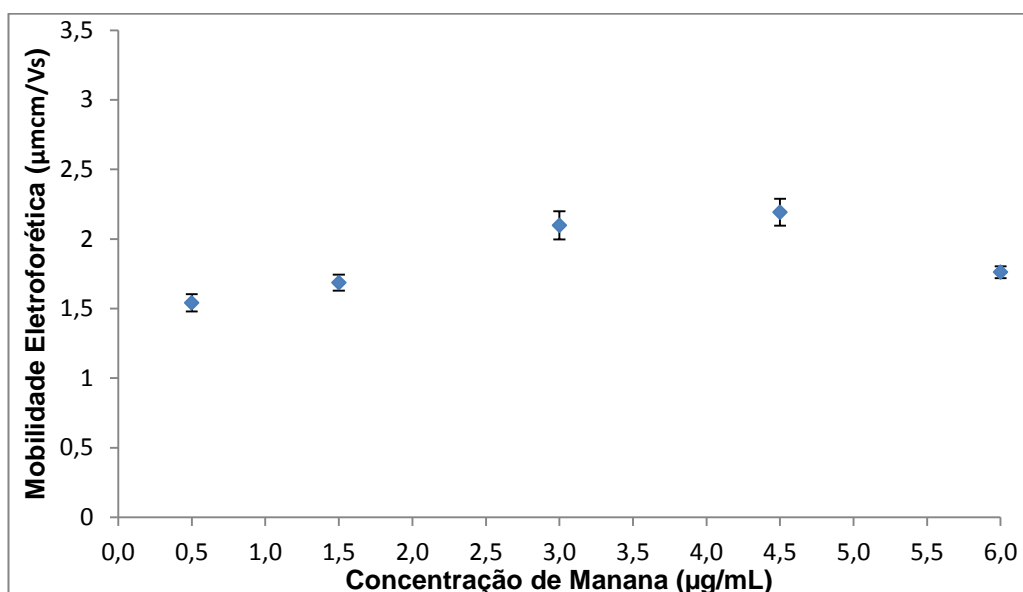


Figura 16: Comportamento das nanopartículas frente às diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas pela metodologia 2. Valores referentes às mobilidades eletroforéticas versus concentração das LNC⁻Quit⁺Man obtidos.

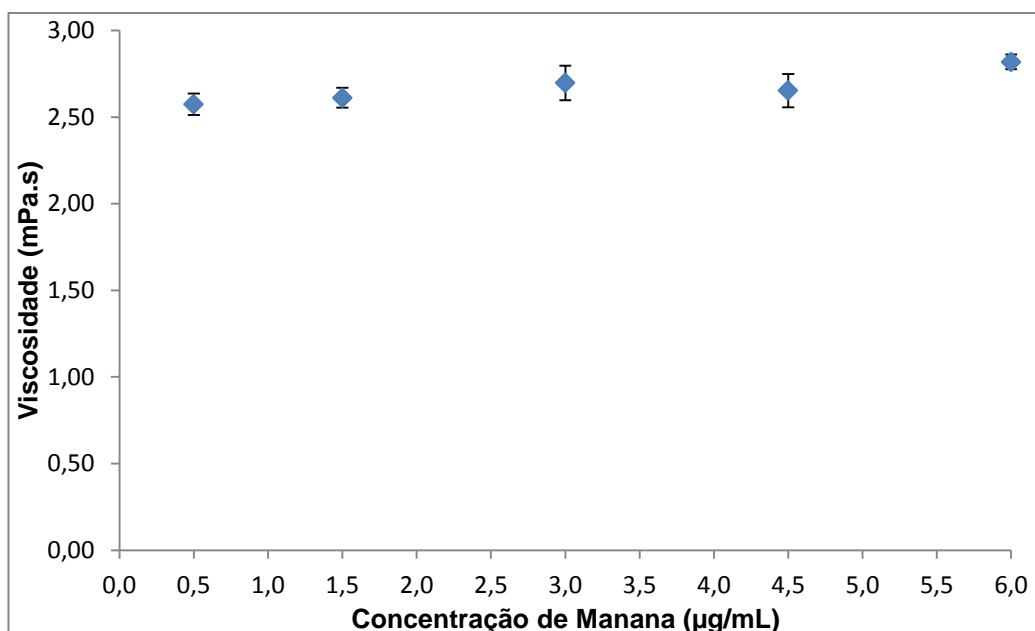


Figura 17: Comportamento das nanopartículas frente às diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas pela metodologia 2. Valores referentes à viscosidade versus concentração das LNC⁻ Quit⁺Man obtidos.

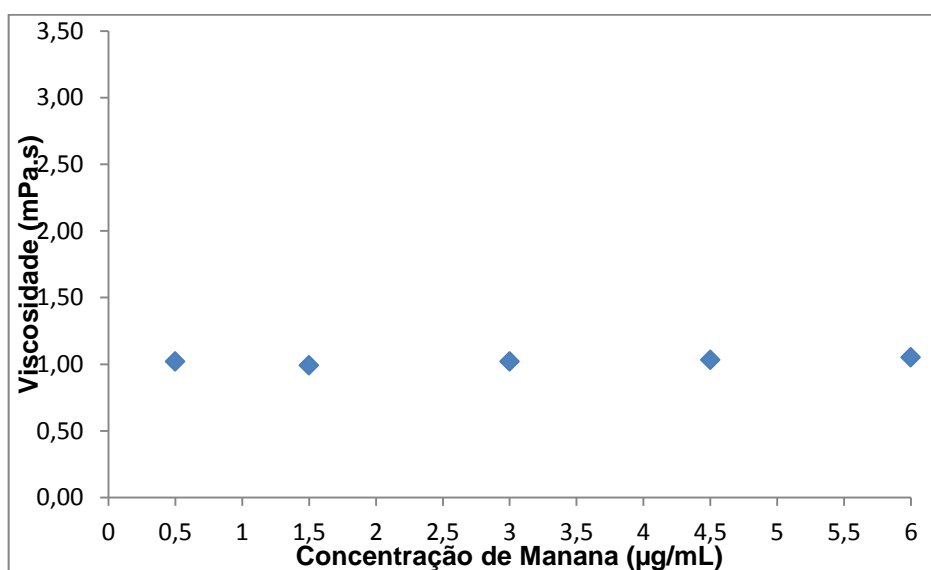


Figura 18: Viscosidade das soluções de manana nas diferentes concentrações utilizadas para os revestimentos das LNC⁻Quit⁺.

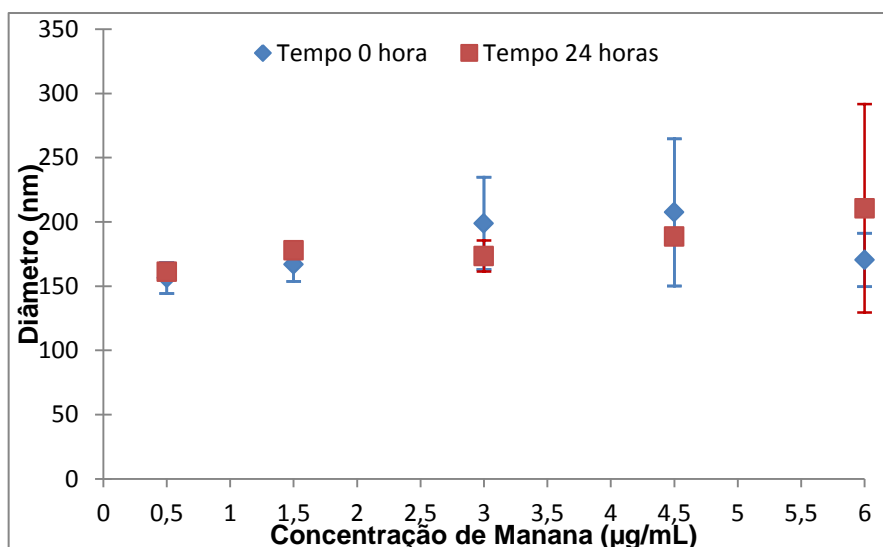


Figura 19: Comportamento das nanopartículas frente às diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas. Valores comparativos dos diâmetros versus concentração das LNC⁻Quit⁺Man nos tempos de zero hora e 24 horas.

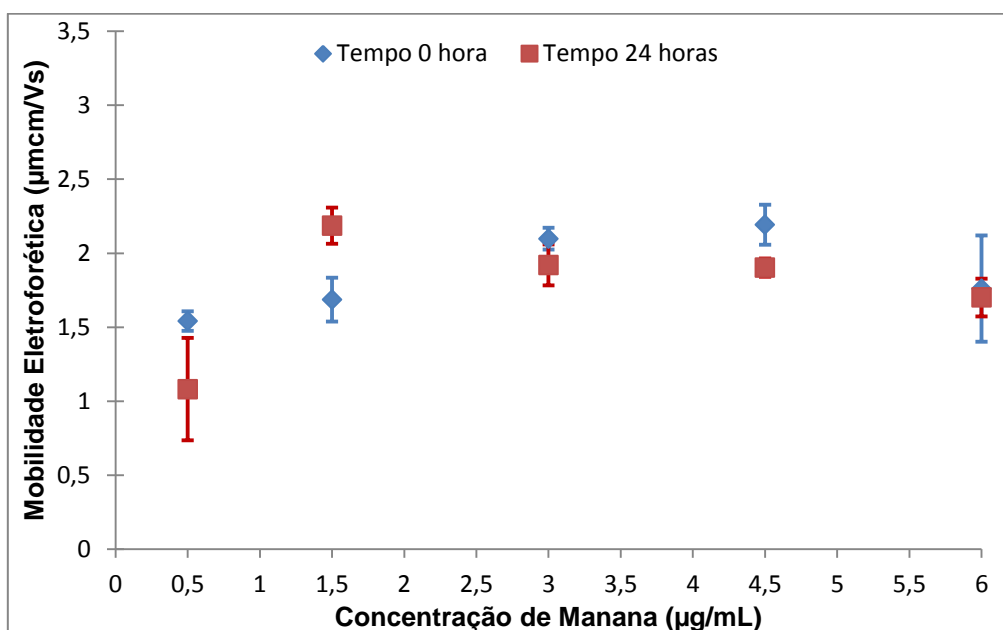


Figura 20: Comportamento das nanopartículas frente às diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas. Valores comparativos das mobilidades eletroforética versus concentração das LNC⁻Quit⁺Man nos tempos de zero hora e 24 horas.

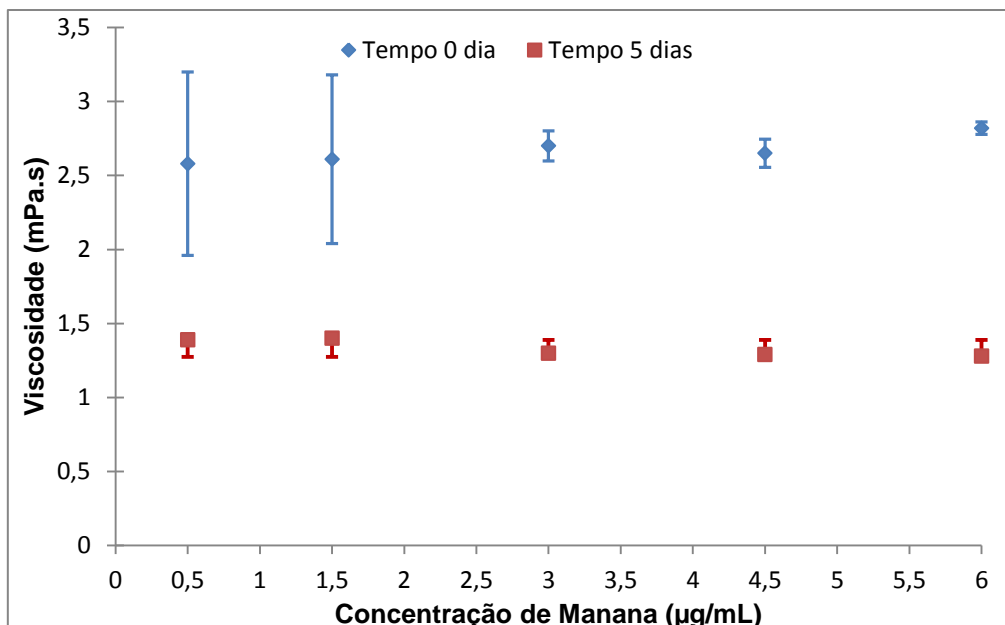


Figura 21: Comportamento das nanopartículas frente às diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas. Valores comparativos da viscosidade versus concentração das LNC⁻Quit⁺Man nos tempos de 0 (zero) dia e 5 dias.

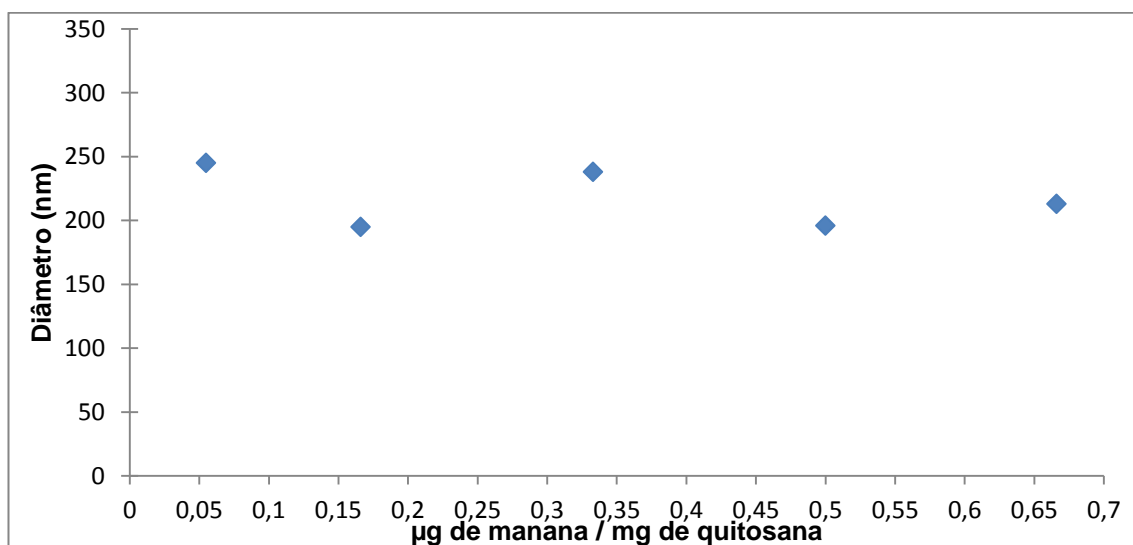


Figura 22: Comportamento das nanopartículas frente às diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas pela metodologia 1. Valores referentes aos diâmetros versus concentração das LNC⁻Quit⁺Man⁻ obtidos.

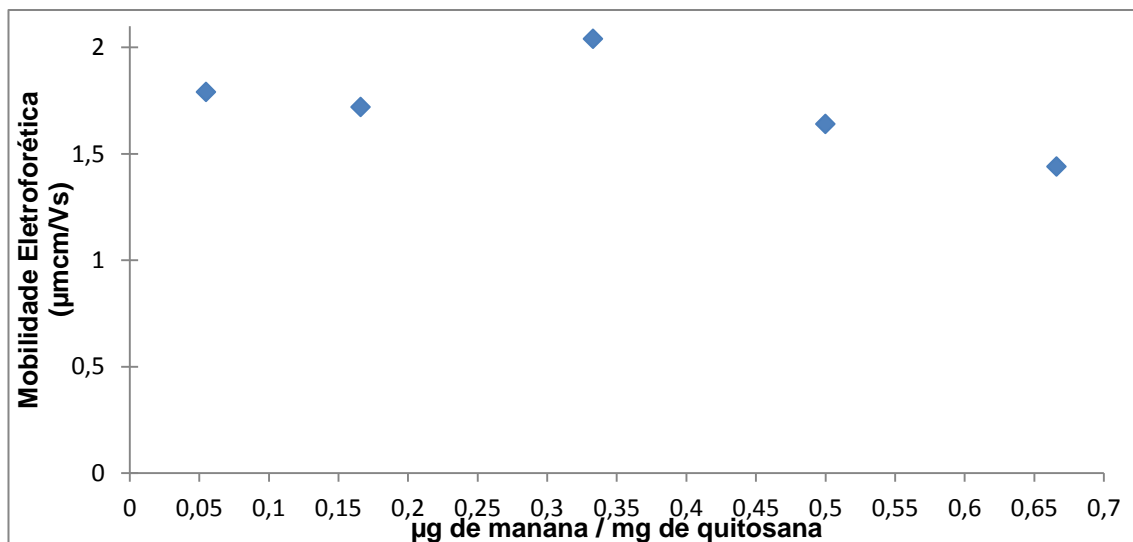


Figura 23: Comportamento das nanopartículas frente às diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas. Valores referentes à mobilidade eletroforética versus concentração das LNC⁻Quit⁺Man⁻ pela metodologia 1.

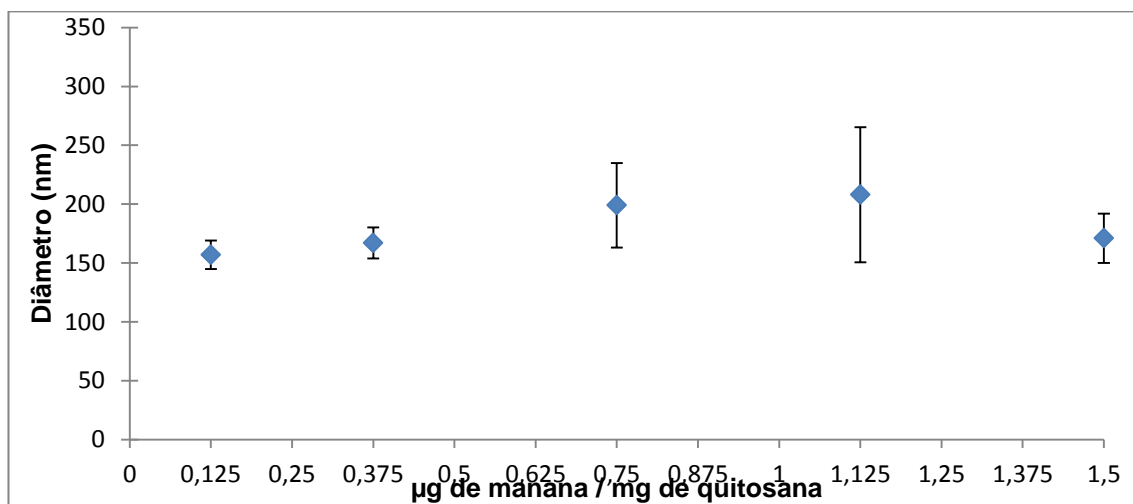


Figura 24: Comportamento das nanopartículas frente às diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas pela metodologia 2. Valores referentes aos diâmetros versus concentração das LNC⁻Quit⁺Man⁻ obtidos.

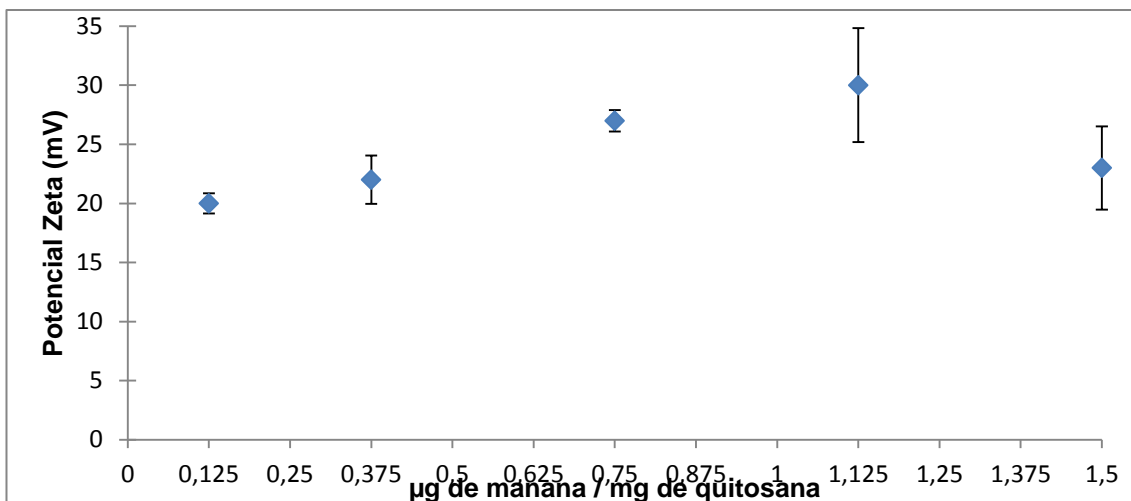


Figura 25: Comportamento das nanopartículas frente às diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas pela metodologia 2. Valores referentes ao potencial zeta versus concentração das LNC⁻Quit⁺Man obtidos.

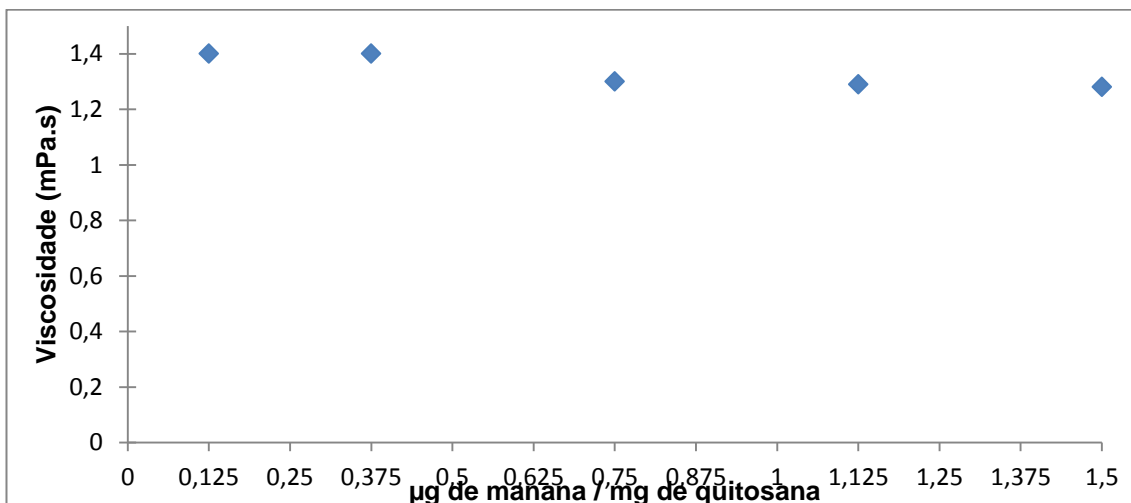


Figura 26: Comportamento das nanopartículas frente às diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas pela metodologia 2. Valores referentes à viscosidade versus concentração das LNC⁻Quit⁺Man obtidos.

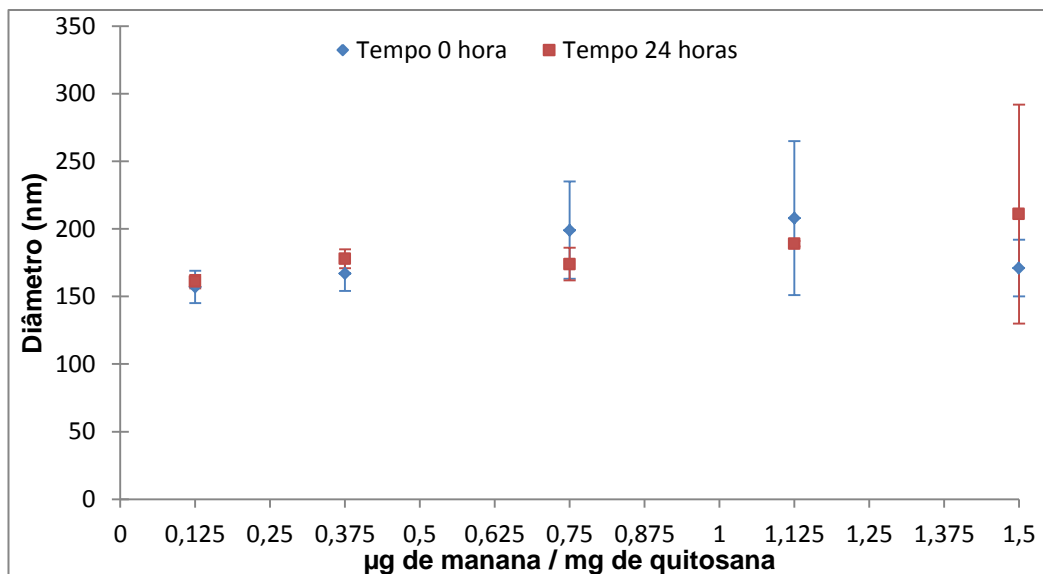


Figura 27: Comportamento das nanopartículas frente às diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas. Valores comparativos dos diâmetros versus concentração das LNC⁻Quit⁺Man nos tempos de zero hora e 24 horas.

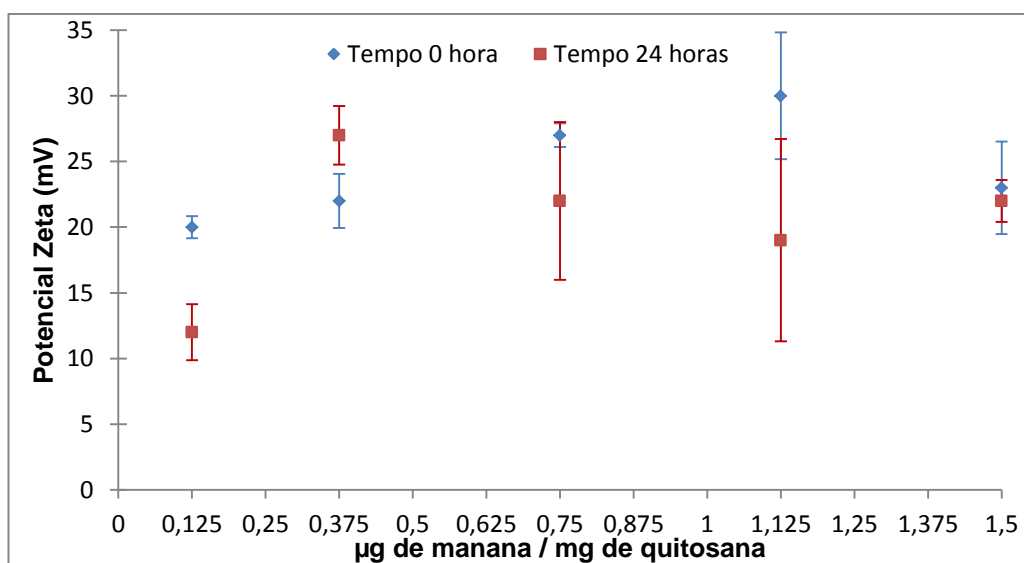


Figura 28: Comportamento das nanopartículas frente às diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas. Valores comparativos do potencial zeta versus concentração das LNC⁻Quit⁺Man nos tempos de zero hora e 24 horas.

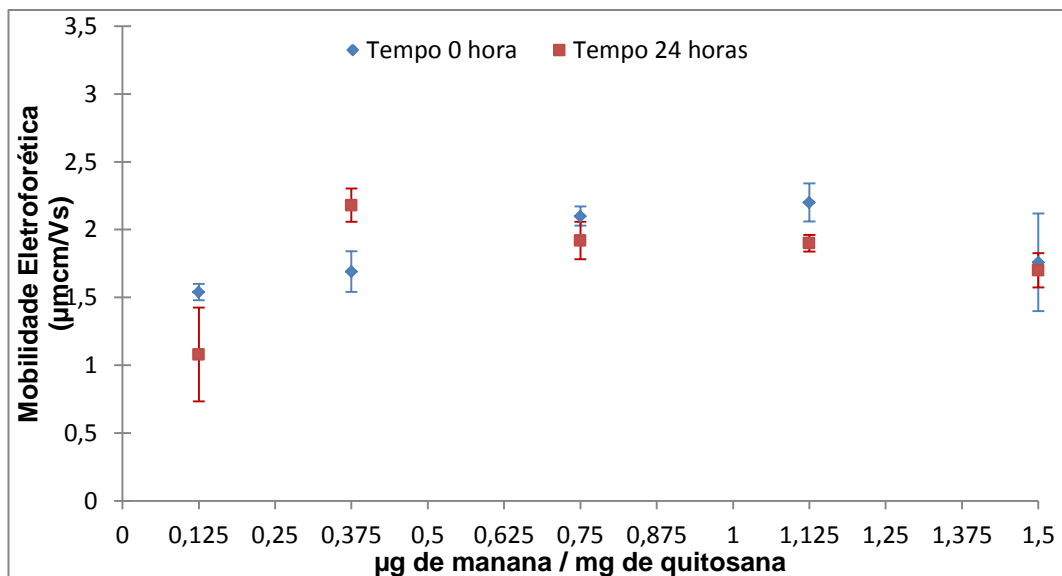


Figura 29: Comportamento das nanopartículas frente às diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas. Valores comparativos das mobilidades eletroforética versus concentração das LNC⁻ Quit⁺Man nos tempos de zero hora e 24 horas.

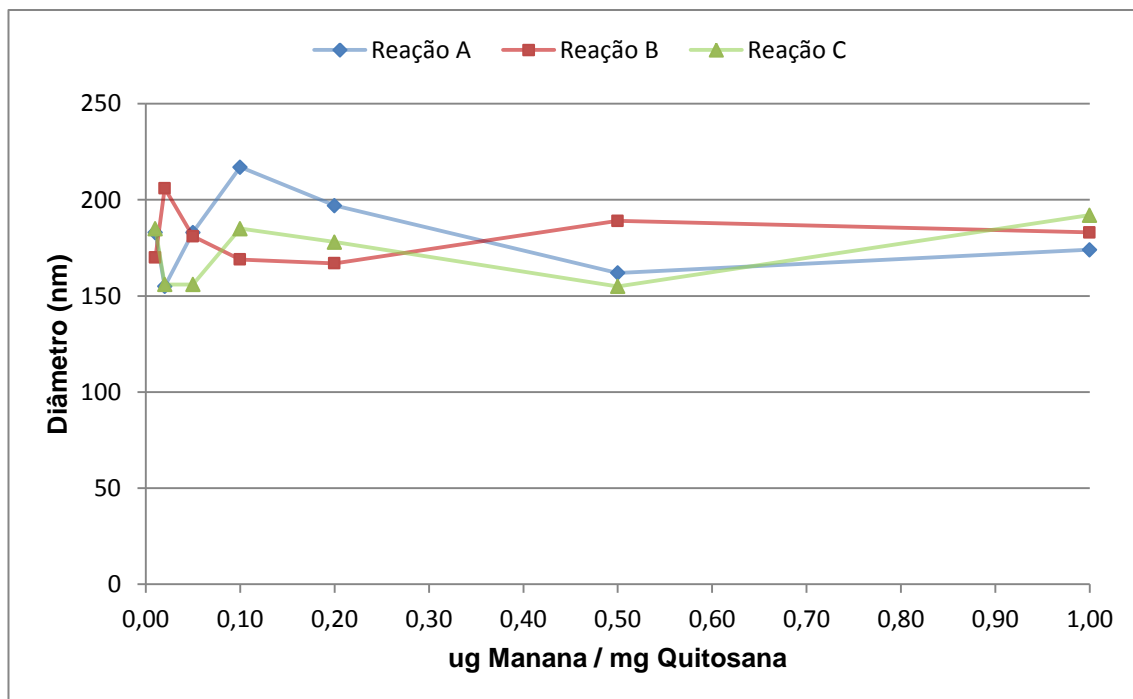


Figura 30: Comportamento das nanopartículas frente às diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas. Valores comparativos dos diâmetros versus concentração das LNC⁻Quit⁺Man através da metodologia 2B. Valores representativos das reações: A, B e C nas cores azul, vermelho e verde respectivamente.

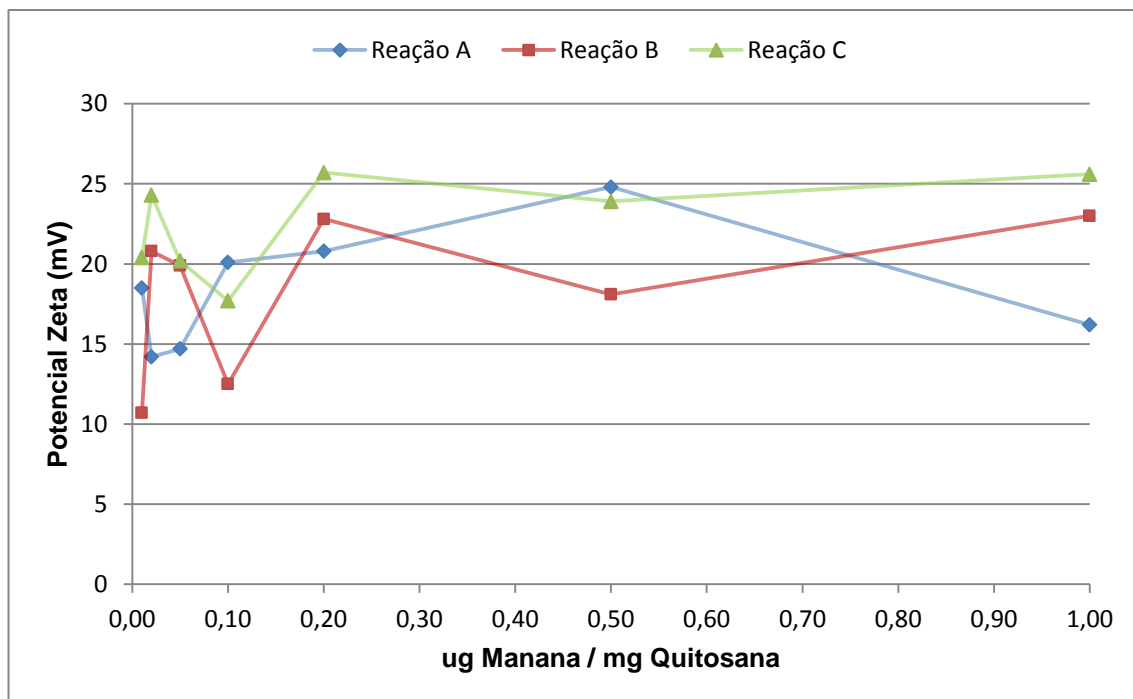


Figura 31: Comportamento das nanopartículas frente às diferentes concentrações de manana por estratégia de interações eletrostáticas. Valores comparativos dos potenciais zeta versus concentração das LNC^{Quit}Man através da metodologia 2B. Valores representativos das reações: A, B e C nas cores azul, vermelho e verde respectivamente.

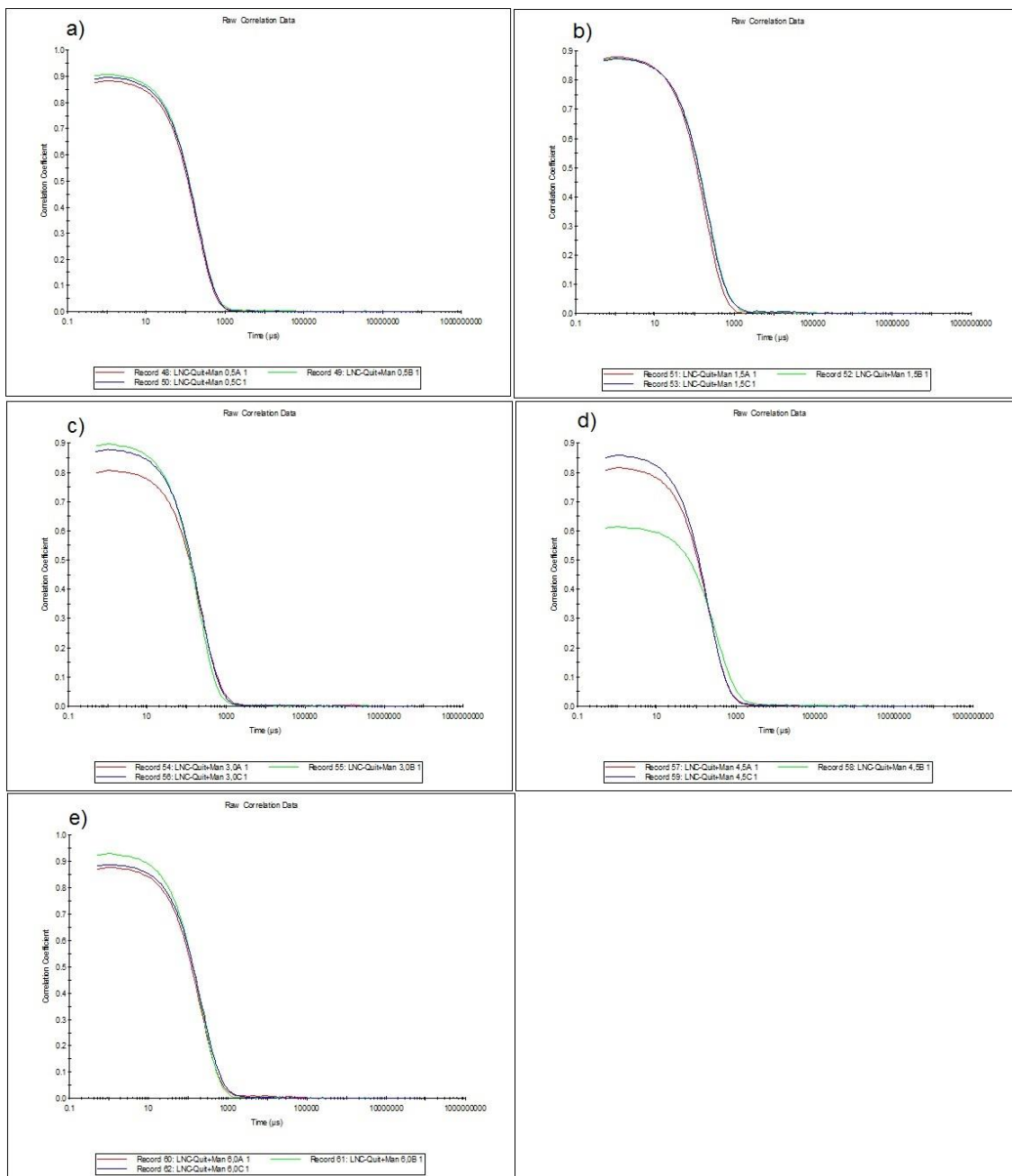


Figura 32: Perfis de correlação das LNC-Quit⁺Man nas diferentes concentrações de manana utilizando-se a metodologia 2. Valores referentes às concentrações de: a) 0,5 µg/mL; b) 1,5 µg/mL; c) 3,0 µg/mL; d) 4,5 µg/mL; 6,0 µg/mL. Cada gráfico mostra as três réplicas sobrepostas.

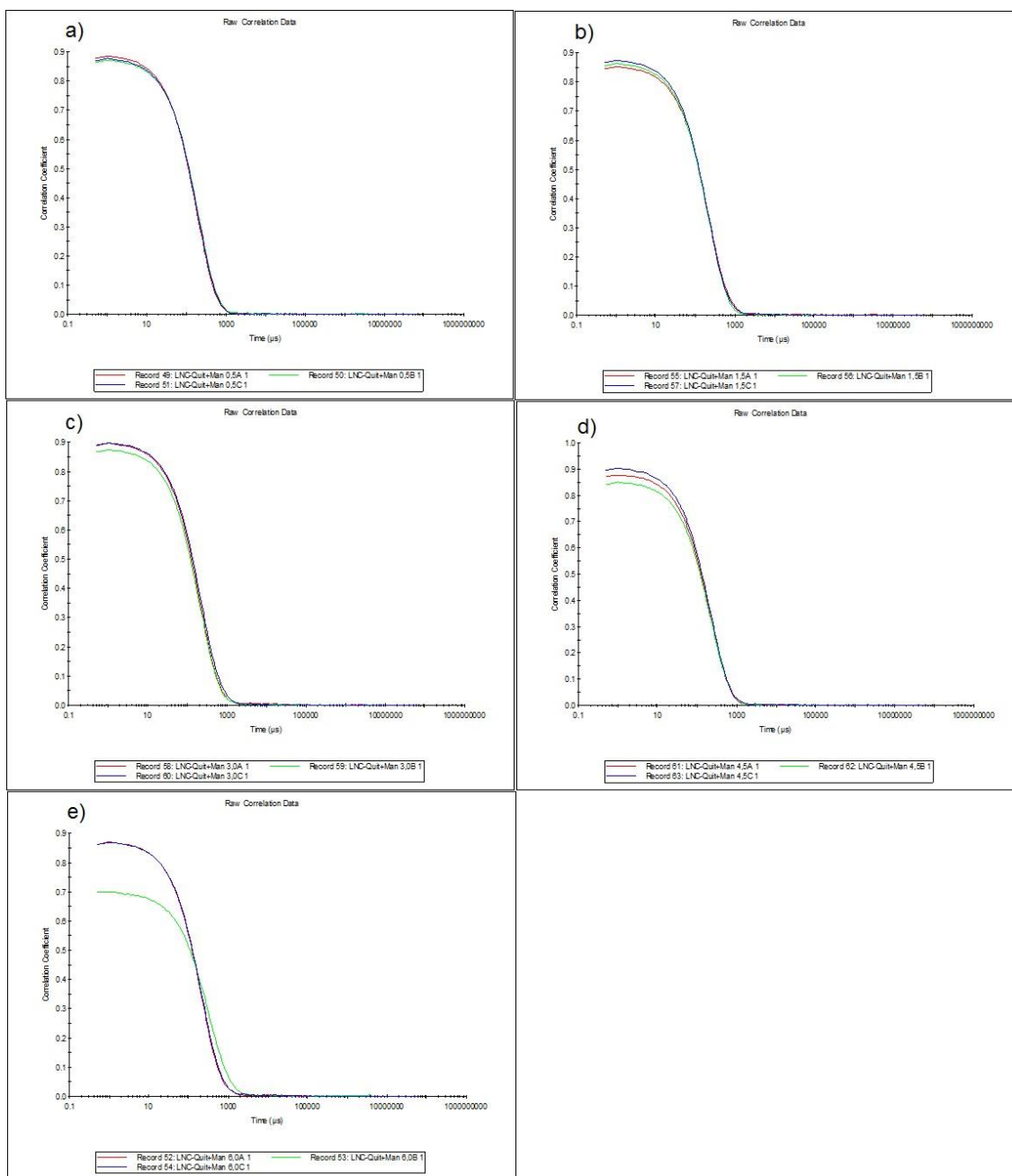


Figura 33: Perfis de correlação das LNC-Quit+Man nas diferentes concentrações de manana utilizando-se a metodologia 2 após 24 horas de reação. Valores referentes às concentrações de: a) 0,5 µg/mL; b) 1,5 µg/mL; c) 3,0 µg/mL; d) 4,5 µg/mL; 6,0 µg/mL. Cada gráfico mostra as três réplicas sobrepostas.

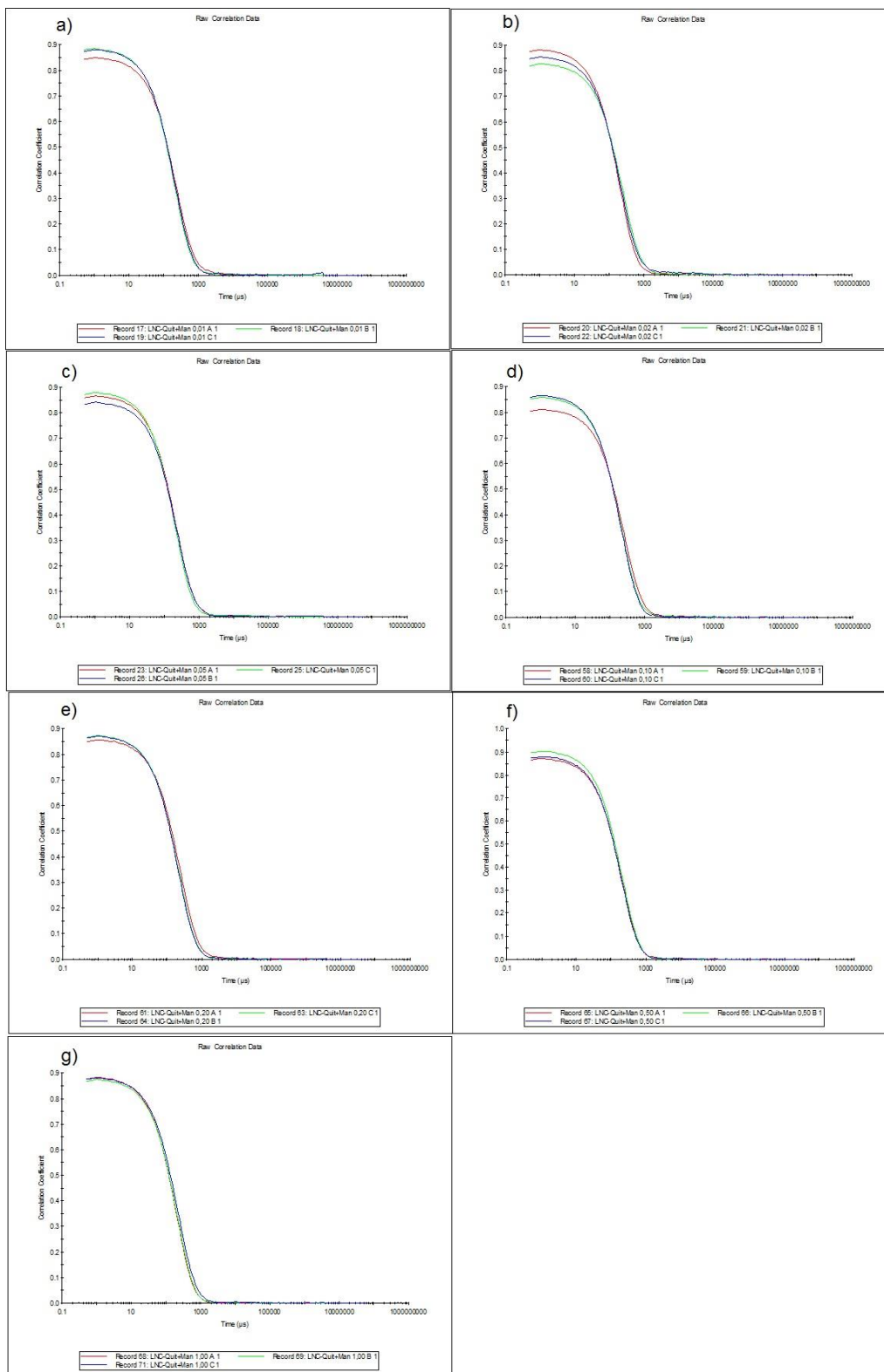


Figura 34: Perfis de correlação das LNC^{Quit}+Man nas diferentes concentrações de manana utilizando-se a metodologia 2B. Valores de concentração demonstrados em µg de manana / mg de quitosana. Valores referentes às concentrações de: a) 0,01; b) 0,02; c) 0,05; d) 0,10; e) 0,20; f) 0,50; g) 1,00. Cada gráfico mostra as três réplicas sobrepostas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, N. N., et al., **Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery**, Journal of Controlled Release, vol. 100, nº 1, pp. 5-28, 2004.

AKIYAMA, E., et al., Self-Assembled Nanogels of Cholesteryl-Modified Polysaccharides: Effect of the Polysaccharide Structure on Their Association Characteristics in the Dilute and Semidilute Regimes. **Biomacromolecules**, 8, 2366-2373, **2007**.

ASTHANA, G. S., et al, Mannosylated Chitosan Nanoparticles for Delivery of Antisense Oligonucleotides for Macrophage Targeting. **BioMed Research Internetwork**, ID 526391, 2014.

BARRAT, G., Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. **Cellular and Molecular Life Science CMLS**. 60, 1, 21-37,2003.

BARROS, D., et al., Surface functionalization of polymeric nanospheres modulates macrophage activation: relevance in Leishmaniasis therapy, **Nanomedicine**, 10(3), 387–403, 2015.

BENDER, E. A., et al., Hemocompatibility of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics** 426, 271– 279, 2012.

BERNARDI, A. *et al.*, Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: An in vitro study. **European Journal of Pharmacology**, [S.I.], v. 586, n. 1–3, p. 24-34, 2008.

BERNARDI, A. et al., Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. **Cancer Letters**, [S.I.], v. 281, n. 1, p. 53-63, 2009.

BERMAN, J. D., Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years.

BHUMKAR, D. R., et al., Chitosan Reduced Gold Nanoparticles as Novel Carriers for Transmucosal Delivery of Insulin, **Pharmaceutical Research**, Vol. 24, No. 8, 2007.

BOYER, C., et al., An overview of protein–polymer particles, **Soft Matter**, 2010.

BULCÃO, R. P., et al., Do poly(épsilon-caprolactone) lipid-core nanocapsules induce oxidative or inflammatory damage after in vivo subchronic treatment?, **Toxicology Research**, 4, 994, 2015.

CALVO, P., et al., Comparative in Vitro Evaluation of Several Colloidal Systems, Nanoparticles, Nanocapsules, and Nanoemulsions, as Ocular Drug Carriers, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Vol. 85, No. 5, 1996.

CARUSO, F.; MÖHWALD, H. Preparation and Characterization of Ordered Nanoparticle and Polymer Composite Multilayers on Colloids, **Langmuir**, 15, 8276-8281, 1999.

CAVALCANTI, A., et al., Nanorobot Hardware Architecture for Medical Defense. **Sensors**. 8, 2932-2958, 2008.

CAVALCANTI, A. et al., Nanorobot for Brain Aneurysm. **The International Journal of Robotics Research**, [S.l.], v. 28, n. 4, p. 558-570, 2009.

COUVREUR, P.; BARRAT, G; FATTAL, E; LEGRAND, P; VAUTHIER, C. Nanocapsule Technology: A Review. **Therapeutic Drug Carrier Systems**. V. 19. N. 2. P. 99-134, 2002.

CRUZ, L., SOARES, L. U., DALLA COSTA, T., MEZZALIRA, G., SILVEIRA, N. P., GUTERRES, S. S., POHLMANN, A. R. Diffusion and mathematical

modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**. V.313, P.198-205, 2006.

DAMGÉ, C., et al., Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats, **Journal of Controlled Release**, 117, 163-170, 2007.

DODANE, V.; VILIVALAM, V. D. Pharmaceutical applications of chitosan, **research focus**, 1998.

FERRARI, M., Câncer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature**. 5, 161-171, 2005.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsules Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, V. 55, P. r1-r4, 1989.

FROZZA, R. L., et al., Characterization of trans-Resveratrol-Loaded Lipid-Core Nanocapsules and Tissue Distribution Studies in Rats, **Journal of Biomedical Nanotechnology**, [S.I.], v. 6, n. 6, p. 694-703, 2010.

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

GARLEA, A.; MELNIG, V.; POPA, M.I. Nanostructured chitosan–surfactant matrices as polyphenols nanocapsules template with zero order release kinetics. **Journal of Materials science: Materials in medicine**. V. 21 P. 1211–1223, 2010.

GHOTBI, Z.; HADDADI, A.; HAMDY, S.; HUNG, R. W.; SAMUEL, J.; LAVASANIFAR, A. Active targeting of dendritic cells with mannan-decorated PLGA nanoparticles **Journal of drug targeting**, 2011.

GOVENDER, T., et al., PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug, **Journal of controlled release**, 57 171–185, 1999.

GUTERRES, S. S.; SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R. Preparação e aplicações de nanopartículas para liberação controlada de fármacos. In: MORALES, M. M. (Ed.). **Terapias avançadas: células tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada a saúde: Atheneu**, Cap.17. p. 247-264, 2007.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. **Drugs Target Insights**. V. 2. P. 147-157, 2007.

GUZEY, D., McCLEMENTS, J. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry, **Advances in Colloid and Interface Science** 128–130 227–248, 2006.

HAAS, S. E., et al., Nanoencapsulation increases quinine antimalarial efficacy against Plasmodium berghei in vivo, **Int. J. Antimicrob. Agents** 34, 156–161, 2009.

HADDADI, A.; HAMDY, S.; GHOTBI, Z.; SAMUEL, J.; LAVASANIFAR, A. Immunoadjuvant activity of the nanoparticles' surface modified with mannan, **Nanotechnology** 25 355101 (13pp), 2014.

HARDE, H., et al., Development of stabilized glucomannosylated chitosan nanoparticles using tandem crosslinking method for oral vaccine delivery, **Nanomedicine**, 2013.

JÄGER, A., STEFANI, V., GUTERRES, S. S., POHLMANN, A. R. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **International Journal of Pharmaceutics**. V.338, P.297-305, 2007.

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

JAIN, K., et al, A review of glycosylated carriers for drug delivery, **Biomaterials**, 33 4166-4186, 2012.

JANES, K. A., et al., Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules, **Advanced Drug Delivery Reviews** 47 83–97, 2001.

JIANG, Z., et al, Comparison of two kinds of nanomedicine for targeted gene therapy: premodified or postmodified gene delivery systems. **International Journal of Nanomedicine**, 7 2019-2031, 2012.

JING, F., et al, Dual ligands modified double targeted nano-system for liver targeted gene delivery, **Pharmaceutical biology**, informa healthcare, 2013.

KONG, F., et al, Mannan-Modified PLGA Nanoparticles for Targeted Gene Delivery, **International Journal of Photoenergy**, ID 926754, 2012.

JORNADA, et al., Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity, **Soft Matter** 8, 6646, 2012.

JOSHI, M. D., et al., Targeting tumor antigens to dendritic cells using particulate carriers, **Journal of Controlled Release**, 161, 25–37, 2012.

KHALID, M. N., et al., Water state characterization, swelling behavior, thermal and mechanical properties of chitosan based networks, **European Journal of Pharmaceutical Sciences** 15, 425–432, 2002.

LOI, M., A., et al., Encapsulation of Conjugated Oligomers in Single-Walled Carbon Nanotubes: Towards Nanohybrids for Photonic Devices. **Advanced Materials**. 22, 14, 1635-1639, 2010.

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

LÓPEZ-LEÓN, T. et al., Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior, **Journal of Colloid and Interface Science** 283 344–351, 2005.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticles Characterization: A Comprehensive Physicochemical Approach. **S.T.P. Pharma Sciences**, V. 1, n. 4, P. 221-241, 1991.

MISHRA, D., et al., Nanoparticle systems as tools to improve drug delivery and therapeutic efficacy, **Society for Biomaterials**, 2013.

MORA-HUERTAS, C. E., et al., Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. 358, 113-142, 2010.

MÜLLER, C. R., et al., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 26, 343, **2000**.

OLIVEIRA, C., et al., An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations, **Soft Matter**, 9, 1141, 2013.

POHLMANN, A. R.; MEZZALIRA, G.; VENTURINI, C. G.; CRUZ, L.; BERNARDI, A.; JÄGER, E.; BATTASTINI, A. O.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. Determining the simultaneous presence of drug nanocrystals in drug-loaded polymeric nanocapsule aqueous suspensions: A relation between light scattering and drug content. **International Journal of Pharmaceutics**, V. 359, P.288-293, 2008.

POLETTO, F. S. JAGER, E., CRUZ, L., POHLMANN, A. R., GUTERRES, S. S. The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. **Materials Science and Engineering**. V, 28, P.472, 2008.

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

RAMPINO, A., et al., Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability, **International Journal of Pharmaceutics**, 455 219– 228, 2013.

SANDI, R. L., Studies on cell adhesion and Concanavalin A-induced agglutination of *Candida albicans* after mannan extraction, **J. Med. Microbiol**, Vol. 24 145-150, 1987.

SATOH, T. Unimolecular micelles based on hyperbranched polycarbohydrate cores, **Soft Matter**, 2008.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE SISTEMAS POLIMÉRICOS NANOPARTICULADOS PARA ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS, **Quim. Nova**, Vol. 26, No. 5, 726-737, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. V. 21, Nº 2, P.99-106, 2002.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**. V. 26, Nº 5, P.726-737, 2003.

SHAH, L. K. and AMIJI, M. M., Intracellular delivery of saquinavir in biodegradable polymeric nanoparticles for HIV/AIDS, **Pharm. Res.**, 23, 2638–2645, 2006.

SHENOY, D. B. AND AMIJI, M. M., Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer **Int. J. Pharm.** 293, 261–270, 2005.

SIQUEIRA, N. M, et al, Innovative Sunscreen Formulation Based on Benzophenone-3-Loaded Chitosan-Coated Polymeric Nanocapsules, **Skin Pharmacology and Physiology**, 24:166-174, 2011.

SONVICO, F., et al., Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. **International Journal of Pharmaceutics**. 324, 1, 67-73, 2006.

SOPPIMATH, K. S., et al., Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices **Journal of Controlled Release** 70 1–20, 2010.

TEDESCO, A. C., et al., Introdução à Nanotecnologia. **Atheneu**, 237-246, 2007.

VEDANTAM, P., et al., Size-dependent cellular toxicity and uptake of commercial colloidal gold nanoparticles in DU-145 cells **Cancer Nano** 4:13–20, 2013.

VENTURINI, C. G., et al., Formulation of lipid core nanocapsules, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2011.

VILANOVA, J. C. O., et al., Aplicações farmacêuticas de polímeros, **Química Nova**, 20, 2010.

WANG, J. J., et al., Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. **Int. J. Nanomedicine**. 6, 765-744, 2011.

WOODRUFF, M. A. AND HUTMACHER, D. W., **The retur of a forgotten polymer – Polycaprolactone in the 21st century**, *Prog. Polym. Sci.*, 35, 1217-1256, 2010.

WU, G., et al., Novel Mannan-PEG-PE Modified Bioadhesive PLGA Nanoparticles for Targeted Gene Delivery, **Journal of Nanomaterials**, 2012.

YU, W., et al., Mannan-Modified Solid Lipid Nanoparticles for Targeted Gene Delivery to Alveolar Macrophages, **Pharm Res** 27:1584–1596, 2010.

ZHU, S., et al. Targeting of Tumor-Associated Macrophages Made Possible by PEG Sheddable, Mannose-Modified Nanoparticles, **Molecular Pharmaceutics**, 2013.

ZONGHUA, L., et al., Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2008.