



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Câmpus de Araraquara  
Instituto de Química



**Supra-anfifílicos como estratégia para modulação da permeação cutânea de fármacos e nanopartículas.**

Dissertação de mestrado de **Jovan Duran Alonso**, pós-graduando em Química pelo Instituto de Química – UNESP.

**Orientador:** Prof. Dr. Clóvis Augusto Ribeiro

**Coorientador:** Dr. Leonardo Miziara Barboza Ferreira

**Mestrando:** Jovan Duran Alonso

Araraquara

2019

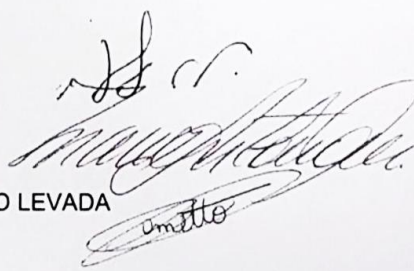
**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JOVAN DURAN ALONSO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA, DO INSTITUTO DE QUÍMICA - CÂMPUS DE ARARAQUARA.**

Aos 22 dias do mês de julho do ano de 2019, às 09:00 horas, no(a) Anfiteatro Central, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. CLOVIS AUGUSTO RIBEIRO - Orientador(a) do(a) Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara, Prof. Dr. MARCOS ANTONIO CORREA do(a) Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara, Prof.ª Dr.ª PATRICIA ROBERTA DAMETTO LEVADA do(a) Centro Educacional e Técnico de Araraquara / CETEC - Araraquara, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de JOVAN DURAN ALONSO, intitulada "**Supra-anfifílicos como estratégia para modulação da permeação cutânea de fármacos e nanopartículas**". Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final:       
  Aprovado  . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. CLOVIS AUGUSTO RIBEIRO

Prof. Dr. MARCOS ANTONIO CORREA

Prof.ª Dr.ª PATRICIA ROBERTA DAMETTO LEVADA



CONFERE COM O ORIGINAL

em 22 de julho de 2019

SEÇÃO TÉCNICA DE PÓS-GRADUAÇÃO IQ/Ar

  
 ROBSON ADRIANO LIMA  
 Supervisor Técnico de Seção - Substituto

FICHA CATALOGRÁFICA

A454s      Alonso, Jovan Duran  
              Supra-anfifílicos como estratégia para modulação da  
              permeação cutânea de fármacos e nanopartículas / Jovan  
              Duran Alonso. – Araraquara - São Paulo : [s.n.], 2019  
              66 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química

Orientador: Clóvis Augusto Ribeiro

Coorientador: Leonardo Miziara Barbosa Ferreira

1. Análise térmica. 2. Tecnologia farmacêutica.  
3. Química supramolecular. 4. Pele. 5. Nanotecnologia.  
I. Título.

## **DADOS CURRICULARES**

### **IDENTIFICAÇÃO**

Nome: Jovan Duran Alonso

Nome em citações bibliográficas: Alonso, J.D.

### **ENDEREÇO PROFISSIONAL**

Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Departamento de Analítica, Laboratório de Análise Térmica – Rua Professor Francisco Degni, 55, Jardim Quitandinha, Araraquara, São Paulo 14800-060

### **FORMAÇÃO ACADEMICA**

2012 – 2017 Gradação em Ciências Farmacêuticas

- Grande área: Fármacos e Medicamentos
- Subárea: Tecnologia Farmacêutica
- Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP
- Orientador: Clóvis Augusto Ribeiro
- Coorientador: Leonardo Miziara Barbosa Ferreira

### **EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL E DIDÁTICA**

Estágio Docência

- Disciplina: Espectroanalítica
- Curso: Bacharelado em Química
- Período: 2º Semestre/ 2017
- Instituição: Instituto de Química - UNESP
- Supervisor: Edilene Cristina

## PRINCIPAL PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA NO PERÍODO (2016 –2018)

Artigo completo publicado em periódico

- Ferreira, L.M., Kurokawa, S.S., Alonso, J.D., Cassimiro, D.L., Souza, A.L.R.D., Fonseca, M., Sarmiento, V.H.V., Regasini, L.O. and Ribeiro, C.A., 2016. Structural and thermal behavior of meglumine-based supra-amphiphiles in bulk and assembled in water. **Langmuir**, 32(45), pp.11878-11887.
- Cassimiro, D.L., Ferreira, L.M., de Souza, A.L.R., Fonseca, M., Kurokawa, S.S., Alonso, J.D., Sarmiento, V.H.V. and Ribeiro, C.A., 2018. On the influence of fatty acid chain unsaturation on supramolecular gelation of aminocarbohydrate-based supra-amphiphiles. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 134(3), pp.1599-1609.
- Ferreira, L.M., Alonso, J.D., Kiill, C.P., Ferreira, N.N., Buzzá, H.H., de Godoi, D.R.M., de Britto, D., Assis, O.B.G., Seraphim, T.V., Borges, J.C. and Gremião, M.P.D., 2018. Exploiting supramolecular interactions to produce bevacizumab-loaded nanoparticles for potential mucosal delivery. **European Polymer Journal**, 103, pp.238-250.

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer a Deus por todas as oportunidades em minha vida, pelas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho e por todo o aprendizado.

Gostaria de dedicar a minha tese a minha mãe, Ivana. Obrigado por todo o carinho e amor, obrigado por tudo que você sacrificou para me ver bem e contente. Eu tomo você, mãe, como um exemplo de vida, que mesmo com todas as adversidades você nunca perdeu o sorriso no rosto nem sua gentileza. Eu espero poder retornar tudo aquilo que você me proporcionou. Meu amor por você é imensurável.

Gostaria de dedicar também a minha avó, Iracema, a qual eu perdi durante o mestrado. Eu sinto de não poder ter ficado contigo nos últimos tempos e isso me parte o coração porque eu cresci contigo. Ainda sinto em chegar em casa e saber que a senhora não está me esperando, mas eu sei que onde estiver, você estará olhando por mim. Obrigado por todo o amor.

Gostaria de agradecer ao meu querido orientador Clóvis Augusto Ribeiro. Professor, eu não tenho palavras para agradecer tudo que o senhor fez por mim até hoje, desde o carinho que você me trata até ao aprendizado. Mesmo nos meus momentos de dificuldades em que eu não acreditei em mim mesmo e pensei em desistir, o senhor me apoiou e me fez crescer como pessoa e como cientista. Me falta palavras para agradecer sua bondade. Obrigado do fundo do meu coração.

Obrigado ao meu pai e a meu irmão por todo carinho na minha criação e sempre me apoiando, cuidando de mim e servindo como exemplo.

Obrigado ao meu coorientador Leonardo Miziara. Leo, você mais que um amigo é como um irmão com quem eu sempre pude contar. Também sempre me ajudando a ser uma pessoa melhor e um cientista, você está do meu lado desde que entrei na faculdade e abriu as portas do mundo da ciência para mim, também acreditando no meu potencial. Obrigado por tudo amado amigo.

Obrigado ao Elinton Wiermann por todo carinho e amor nesses anos, fazendo dos meus finais de semanas melhor, sendo meu parceiro e tornando a vida uma jornada mais fácil.

Obrigado a Lucy Saguara. Lu, muito mais que uma amiga você é uma irmã que amo e nunca mediu esforços para me ver bem. Sempre atenta como eu estava, você cuidou de mim. Obrigado por todo carinho depositado e por ser uma inspiração como pessoa.

Obrigado aos meus amigos de infância Ariel Veronesi, Rodrigo Prestes, Gabriel Lima e Thiago Leal. Mesmo a gente estando a quilômetros de distância, toda vez que lhes vejo eu sinto que volto a ser criança e queria que o tempo parasse para voltar a viver ao lado de vocês. Vocês não têm ideia da falta que me fazem. Já tenho mais da metade de minha vida com vocês e espero que tenha pelo resto dela. Amo vocês amigos.

Obrigado a minha amada amiga Ingrid Ambiel. Minha madrinha de curso, você é a veterana que qualquer bixo sonha em ter. Você é superinteligente e mesmo com a distância é uma amiga que pude contar em todas horas.

Obrigado ao meu colega Luis Felipe Bricks, com quem eu dividi casa por 7 anos. Agradeço por todo o carinho e pela amizade durante esses anos todos e até os dias presentes pelos bons momentos compartilhados e se preocupar comigo.

Obrigado ao professor Marcos Antônio Correa por todo carinho e por me aceitar na nova jornada do doutorado. Assim como o Clóvis, você é uma inspiração como profissional, alguém que eu estimo e obrigado pela confiança depositada em mim.

Obrigado ao meu querido amigo Bruno Mantea, por todas as conversas e almoços, pelas horas de jogos e por sempre me colocar um sorriso no rosto.

Obrigada a minha querida amiga Fernanda Kolenyak. Mais do que uma parceira de pesquisa, você é uma grande amiga. Obrigado por toda atenção e conhecimento compartilhado, por tudo que pude desenvolver com você e pelo tanto que você agregou na minha formação.

Obrigado a Kayla Alarcon por todo conhecimento compartilhado e por todo carinho. Espero poder retornar tudo que me ensinou.

Obrigado ao professor Hernane Barud que sempre dispôs do seu tempo para conversar e contribuir ao trabalho. Agradeço por sempre deixar as portas do seu laboratório abertas e pela proatividade.

Obrigado aos meus colegas de laboratório Diógenes Dias, Francisco, Sonia Almeida e as professoras Marisa Crespi e Adélia Almeida. Gosto muito do meu grupo de Pesquisa em que sempre pude contar com amizade e conhecimento. Gosto de que todo mundo procura se ajudar e é um lugar que pude aprender muito. Em especial a minha amiga Flaviana Andrade, que em tão pouco tempo se tornou tão querida e um exemplo de superação.

Obrigado aos meus amigos do lab de farmacotécnica Marcia Oyafuso, Fernanda Boni, Natalia Noronha, Gi Calixto, Jessica Bernegossi, Karen Santos, e em especial a Camila Rondero (que me ajudou de prontidão com o que precisava). Obrigado por todo

carinho tantos nos anos de graduação e pós. Espero poder ajudar o tanto que vocês sempre me apoiaram. Obrigado também aos professores Maria Palmira Daflon e Marlus Chorilli por sempre estarem de portas abertas a mim.

Obrigado aos meus amigos Fernando Borges, Saidy Duran, Hernan Mantilla, Amanda Baptista e Renan. Grato a todo carinho e pelos ótimos momentos compartilhados.

Obrigado a minha tia Valquiria por todo o carinho. Obrigado por sempre ter me tratado com amor. Tia, te tenho no meu coração.

Obrigado a Ana Luiza Michelleto. Mais do que uma excelente aluna, você é uma amiga que sempre pude contar. É uma alegria e satisfação ter você em nosso lab.

# Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Pele: uma barreira complexa à permeação de fármacos e nanoestruturas .....	16
1.2	Nano-bio interface: influência da interface sistema de liberação/pele na permeação cutânea ..	17
1.3	Química Supramolecular e Nanoarquitetônica como bases para o <i>design</i> racional de sistemas de liberação tópico/transdérmico .....	18
1.4	Supra-anfifílicos baseados em meglumina como estratégia na permeação de fármacos e sistemas nanoparticulados .....	19
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....	21
2.1	Pele e permeação: promissora via não-invasiva .....	21
2.2	Química Supramolecular e a construção de novos sistemas de liberação. ....	25
2.3	Supra-anfifílicos X tensoativos convencionais.....	27
2.4	Fluoresceína e Nanopartículas de prata: Aplicações.....	29
3	OBJETIVOS E PRINCIPAIS RESULTADOS ESPERADOS .....	33
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	Sistema de Liberação em estudo.....	33
4.2	<i>Design</i> do Estudo .....	34
4.3	Planejamento e síntese dos supra-anfifílicos .....	35
4.4	Microscopia de luz polarizada .....	35
4.5	Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	35
4.6	Estudos de bioadesão.....	36
4.7	Conclusões preliminares e escolha do sistema para incorporação.....	36
4.8	Síntese e caracterização das nanopartículas de prata. ....	36
4.8.1	Síntese .....	36
4.9	Incorporação e Característica macroscópica do sistema. ....	37
4.10	Microscopia de luz polarizada – com e sem Marcador/ NP .....	37
4.11	Microscopia de luz polarizada - Hot stage.....	37
4.12	Microscopia de fluorescência.....	37
4.13	Análises reológicas .....	37
4.13.1	Análise reológica contínua .....	37
4.13.2	Análise reológica oscilatória .....	38
4.14	Planejamento de experimentos, análise e interpretação dos dados.....	38
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
5.1	Planejamento e síntese dos supra-anfifílicos. ....	38
5.2	Obtenção dos géis líquido-cristalinos.....	39
5.3	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	43
5.4	Bioadesão .....	46

5.5	Conclusões preliminares e escolha do sistema para incorporação.....	47
5.6	Síntese das nanopartículas de prata (AgNP) .....	47
5.7	Incorporação e Característica macroscópica do sistema. ....	48
5.8	Microscopia de luz polarizada – com e sem Marcador/ NP .....	49
5.9	Microscopia de luz polarizada - Hot stage.....	50
5.10	Microscopia de fluorescência .....	52
5.11	Calorimetria exploratória diferencial - DSC.....	53
5.12	Reologia .....	55
5.12.1	Análise reológica contínua .....	55
5.12.2	Análise reológica oscilatória .....	57
6	Conclusões:.....	59
7	REFERÊNCIAS .....	61

## Lista das figuras

Figura 1 - Ilustração de como se dá o design racional para o sistema de liberação .....	18
Figura 2 - Ilustração molecular do supra-anfifílico.....	20
Figura 3 - Estrutura da pele .....	22
Figura 4 - Exemplificação de ligações supramoleculares.....	26
Figura 5 - Ilustração da ligação supramolecular entre grupamento carboxila e meglumina .....	29
Figura 6 - Esquematização de como se dá síntese da prata. ....	30
Figura 7 - Fluoresceína. A esquerda sua estrutura molecular, no centro em solução aquosa sob luz ultravioleta e à direita seu espectro de absorção e emissão.....	32
Figura 8 - Esquematização do estudo.....	34
Figura 9 - Esquematização da síntese do supra-anfifílico .....	39
Figura 10 - Ilustração de como é dada a síntese dos supra-anfifílicos.....	39
Figura 11 - Microscopia de luz polarizada demonstrando as mesofases obtidas.....	42
Figura 12 - Curva DSC para os precursores e os supra-anfifílicos .....	44
Figura 13 - Curvas DSC para os géis obtidos. MGAE demonstrando transição vítrea, fusão da água e transição gel-sol ao passo que o MGAO só demonstra fusão da água. ....	44
Figura 14 - Força bioadesiva dos géis .....	46
Figura 15 - Ilustração do obtido das sínteses de nanopartícula de prata, a esquerda o grupo controle (precipitado por centrifugação) e a direita com meglumina como redutora .....	48
Figura 16 - Ilustração de cada formulação contendo o marcador. A esquerda, o sistema MGAE das formulações 2 a 5 e no MGAO de 1 a 5, todas com 0,1% de fluoresceína; à direita, em 0,1% e 1 % de fluoresceína. ....	49
Figura 17 - Imagens da microscopia de luz polarizada do sistema sem incorporar ativos, com a nanopartícula de prata e com a fluoresceína nas concentrações de 0,1% e 1%.....	49
Figura 18 - Imagens de microscopia de luz polarizada acoplada a hot stage, ilustrando a transição de fase do MGAE e o gel MGAO.....	51
Figura 19: Característica macroscópica do polímero MGAE incorporado com fluoresceína antes (esquerda) e depois (direita) da transição gel-sol .....	52
Figura 20 - Imagens de fluorescência do MGAO (esquerda) e do MGAE (direita), ambos em concentração 0,01% (m/m) .....	53
Figura 21: Curvas DSC obtidas demonstrando o marcador puro, o sistema de liberação e incorporação com 0,1% e 1% de fluoresceína e nanopartículas de prata. ....	54
Figura 22: Ilustração do ensaio reológico de fluxo .....	55
Figura 23 - Curvas de reologia de fluxo, indicando na imagem quais as curvas de ida e volta. ...	56
Figura 24 - Ensaio de reologia oscilatória.....	57
Figura 25 - Ensaio de reologia oscilatória em função da temperatura.....	59

## **Lista de Abreviações:**

AgNP: Nanopartícula de prata

CMC: Concentração micelar crítica

DLS: Espalhamento de Luz Dinâmico (Dynamic Light Scattering)

DSC: Calorimetria Exploratória Diferencial (Differential Scanning Calorimetry)

G': Módulo de armazenamento

G'': Módulo de perda

MGAE: Supra-anfifílico entre meglumina e ácido esteárico

MGAO: Supra-anfifílico entre meglumina e ácido oleico

MLP: Microscopia de Luz Polarizada

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio (Reactive oxygen Species)

SAXS: Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (small-angle x-ray spectroscopy)

## Resumo

A interface entre nanomateriais e a pele compreende uma série de interações não-covalentes dinâmicas entre as superfícies do sistema nanoestruturado e biológica. A modulação de respostas biológicas, tais como permeação e retenção de fármacos na pele, é dependente dessas interações. O estrato córneo é uma interface biológica complexa e considerado a principal barreira limitante a absorção percutânea de fármacos, dificultando a terapia localizada. O modo que o sistema de liberação interage com essa barreira culminará na sua eficácia ou não. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias que sejam capazes de modular a interação do sistema de liberação com o estrato córneo visando-se o controle da permeação do fármaco em camadas específicas da pele.

O objetivo foi avaliar a viabilidade da modulação da permeação de fármacos e partículas nanoestruturadas através da pele por meio do uso de diferentes géis líquido-cristalinos. Estes materiais são produzidos pela simples manipulação de forças não-covalentes entre fases oleosa e hidrofílica dirigidas pelos princípios da Química Supramolecular e a Nanoarquitetônica.

Particularmente, este trabalho contempla o estudo da aplicação de géis líquido-cristalinos liotrópicos para permeação e liberação de fármacos/partículas nanoestruturadas no estrato córneo produzidos a partir de adutos supra-anfifílicos derivados de ácidos graxos análogos de cadeia longa (componente hidrofóbico) e meglumina (componente hidrofílico). Além de solubilização eficaz e liberação controlada de fármacos e partículas nanoestruturadas, a formulação proposta visa oferecer vantagens únicas pois os ácidos graxos precursores possuem distintas funções no processo de interação com a pele: ácido esteárico, atuando como um agente oclusivo e favorecendo a concentração em camadas superficiais da pele, e o ácido oleico como um promotor de permeação. A resposta de permeação cutânea será avaliada utilizando-se fluoresceína como marcadora e modelo orgânico, ao passo que nanopartículas de prata como modelos de nanoestruturas.

As formulações foram feitas utilizando diagrama binário de água e tensoativo. A microscopia de luz polarizada demonstra que ambos supra-anfifílicos em água são capazes de se organizar em arranjo líquido-cristalino de mesofase hexagonal. Os estudos de DSC mostram diferenças no comportamento estrutural dos análogos, o MGAE mostrou possuir transição vítrea e transição gel-sol, que são comportamentos típicos de polímeros. O MGAO, por sua vez, não apresentou nenhum tipo de transição. A percentual de água na formulação demonstrou que a

formulação tem um máximo de água ligada e, para o sistema MGAE, a quantidade de água afeta as interações supramoleculares do arranjo polímero. O estudo de bioadesão mostrou que as formulações tem um máximo de bioadesividade em função do percentual de água na formulação. Deste estudo preliminar foi escolhido as formulações com 50% de água e 50% de supra-anfifílico para prosseguir com os testes de incorporação. A síntese da AgNP foi dada por duas metodologias: um padrão pela literatura e uma utilizando meglumina como redutora, porém a MEG reduz muito rapidamente a prata para prata coloidal, levando a agregação. A incorporação de Fluoresceína se deu em duas concentrações 0,1% e 1%. Os estudos de Microscopia e DSC não mostram alterações das formulações quando incorporadas na concentração de 0,1% e com AgNP, entretanto, com 1% a microscopia demonstrou as lamelas da matriz mais compactas e nas curvas de DSC mostrou uma redução total do percentual de água livre. Os estudos de reologia de fluxo mostram que os géis tem comportamento plástico e tixotrópico, enquanto que a reologia oscilatória mostram que os géis se mantem íntegros na aplicação de uma força e, adicionalmente, esse estudo realizado com aquecimento mostrou a transição gel-sol do MGAE faz o modulo de armazenamento prevalecer, tendo assim uma desestruturação do gel em temperatura elevada.

## **Abstract**

The interface between nanomaterials and skin comprises a series of dynamic non-covalent interactions between the surfaces of nanostructured and biological system. The modulation of biological responses, such as permeation and retention of drugs in the skin, is dependent on these interactions. The stratum corneum is a complex biological interface and it is considered the main barrier limiting the percutaneous absorption of drugs, being the principal difficult for localized therapy. The way the drug delivery system interacts with this barrier will culminate in its effectiveness or not. Therefore, it is necessary to develop new strategies that are capable of modulating the interaction of the drug delivery system with the stratum corneum aiming at controlling the permeation of the drug in specific layers of the skin.

In this project, our objective is to evaluate the feasibility of modulating the permeation of drugs and nanostructured particles through the skin through the use of different liquid-crystalline gels. Liquids-crystal systems are functional supramolecular arrays which exhibit an intermediate ordering state between the order of a crystalline state and the disordered state of the isotropic liquid. These materials are produced by the manipulation of non-covalent forces between oily and hydrophilic phases driven by the principles of Supramolecular Chemistry and Nanoarquitetronics.

Particularly, this work contemplates the study of the application of liotropic liquid-crystalline gels for permeation and controlled release of drugs / nanostructured particles in the stratum corneum produced from supra-amphiphilic adducts derived from long-chain analogous fatty acids (hydrophobic phase) and meglumine (Hydrophilic phase), whose synthesis has been studied in our research group. In addition to effective solubilization and controlled release of drugs and nanostructured particles, the formulation proposed in this work aims to offer unique advantages because the fatty acids precursors have different functions in the process of interaction with the skin: stearic acid, acting an occlusive agent and favoring the concentration in Surface layers of the skin, and oleic acid as a permeation promoter. The cutaneous permeation response will be evaluated using fluorescein as a drug model and silver nanoparticles as nanostructures models.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Pele: uma barreira complexa à permeação de fármacos e nanoestruturas

A pele é uma barreira física cuja função principal é isolar patógenos externos do tecido do hospedeiro, e quando há falhas nesse processo resulta no processo infeccioso. O objetivo final da epiderme é a produção de um revestimento relativamente impermeável e coeso, o estrato córneo (OYAFUSO et al., 2015). A administração de compostos na pele é extremamente atrativa, não apenas pela possibilidade do seu direcionamento para doenças cutâneas (administração tópica), localizando o tratamento e evitando efeito primeira passagem; aumentando a biodisponibilidade e oferecendo uma via de administração segura ao paciente. Entretanto, o processo de permeação cutânea é dificultado justamente devido à função barreira deste tecido, exercida principalmente pelo estrato córneo. Dessa forma, diversas técnicas químicas e físicas são exploradas e combinadas de modo a vencer a função barreira do estrato córneo. Estas estratégias têm como finalidade o controle da permeação de níveis de fármacos adequados ao tratamento tópico/transdérmico (VOGT et al., 2016).

Duas camadas de tecido compõe a pele: a epiderme e a derme. Dependendo do local de ação do fármaco é importante direcioná-lo e retê-lo na camada específica ou, no caso de transdérmicos, alcançar o nível sistêmico. O estrato córneo forma a porção mais externa da epiderme e é composto por um arranjo coeso de lipídeos que formam uma barreira ao transporte de moléculas e sistemas coloidais (GUY et al., 2000). Algumas estratégias utilizam promotores químicos de permeação cutânea, como o ácido oleico e tensoativos, para promover momentânea desorganização dessa barreira para penetração do sistema. O processo de permeação é influenciado pela espessura do estrato córneo e a vascularização da região. Em condições patológicas esse processo pode estar alterado. Quadros como feridas, em que a integridade do tecido está comprometida, ou inflamações, onde ocorre edemas; pode levar a alteração nos níveis de absorção de ativo (GONZALEZ et al., 2016).

Apesar do grande conhecimento acumulado sobre a estrutura e características físico-químicas da pele, ainda há uma grande dificuldade de se entender melhor o processo de permeação e de como modulá-lo (GUPTA et al., 2019). Sistemas biológicos apresentam uma arquitetura e hierarquia complexa com ocorrência de eventos químicos e físicos de caráter dinâmico (HASSAN et al., 2018). Nesse sentido, é necessário utilizar de novas ferramentas que auxiliam no *design* racional de novos sistemas de liberação que tenham sua eficácia e segurança melhorada.

## 1.2 Nano-bio interface: influência da interface sistema de liberação/pele na permeação cutânea

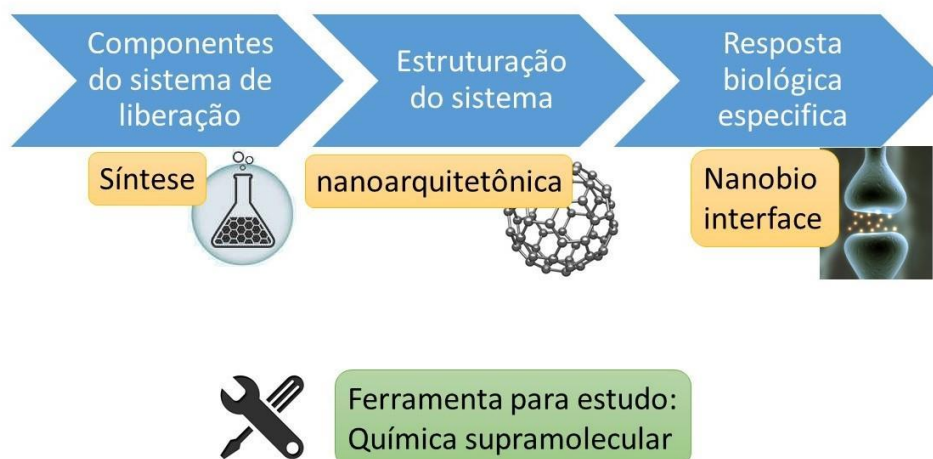
A nano-bio interface compreende as dinâmicas físico-químicas, interações cinéticas e trocas termodinâmicas entre superfícies de nanomateriais e as superfícies de componentes biológicos (por exemplo, proteínas, membranas, fosfolipídios, DNA, fluidos biológicos) (WEBBER et al., 2016). Para esse campo evoluir, devemos entender as forças dinâmicas e componentes moleculares que moldam estas interações. O entendimento de tais interações e o conhecimento de como manipulá-las por meio do controle das propriedades do sistema, possibilitará uma maior compreensão sobre a nano-bio interface (relação entre propriedades do sistema de liberação e resposta biológica desejada) (LEHN, 2007).

O conhecimento dos tipos de arranjos hierárquicos e interações moleculares é de fundamental importância para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos que mimetizem o sistema biológico, possibilitando a criação de novas estratégias visando-se a adaptabilidade com o sítio alvo. O grau de associação molecular entre fármaco e sistema de liberação está diretamente relacionado com a força e direcionalidade das ligações não-covalentes (WEBBER et al., 2016).

O resultado final da resposta biológica é a consequência da ativa interação da superfície do sistema de liberação com o estrato córneo. Para isso, espera-se que controlando as propriedades do sistema e tendo um conhecimento profundo sobre sua dinâmica, seja possível entender mais a fundo fenômenos de interface (NEL et al., 2009).

A Figura 1 ilustra como é feito o *design* racional. Os materiais escolhidos possuem uma função específica dentro da resposta biológica que se almeja obter. Como as moléculas possuem características estruturais e físico-químicas diferentes, o seu processo de *self-assembly* pode ocorrer de forma diferente, impactando as respostas finais (AONO; ARIGA, 2016).

Figura 1 - Ilustração de como se dá o design racional para o sistema de liberação



Fonte: Autor

### 1.3 Química Supramolecular e Nanoarquitetônica como bases para o *design* racional de sistemas de liberação tópico/transdérmico

A Química Supramolecular – também conhecida como a química além da molécula – é um campo que estuda as interações não-covalentes não somente de compostos isolados, mas como de sistemas, que se organizam como um todo. As interações não-covalentes entre moléculas dão origem a processos de reconhecimento e auto-estruturação (*self-assembly*) moleculares (LEHN, 1993). A maioria das interações não-covalentes são relativamente fracas e têm a capacidade de se romper e formar novamente com facilidade, assim sendo, muitos sistemas supramoleculares estão sob controle termodinâmico. Tradicionalmente, a Química Supramolecular tem focado predominantemente pela via do equilíbrio químico. No entanto, mais recentemente, os processos de *self-assembly* também têm sido avaliados pelo ponto de vista da cinética, logo, resultado do processo da organização pode ser orientado pela via de síntese e manipulando variáveis de síntese é possível ter sistemas com diferentes propriedades (HAINO, 2012). Dentro deste novo campo se desenvolve uma área que enfoca no *design* racional destas interações: a nanoarquitetônica (ARIGA et al., 2016).

A nanoarquitetônica refere-se a tecnologia que permite organizar unidades estruturais em nanoescala, que são normalmente um grupo de átomos ou moléculas numa configuração pretendida. Além disso, ela é classificada em dois tópicos: "nano criação" e "nano organização". "nano Criação" é a síntese de um novo material que não existe na Natureza, como os supra anfífilicos utilizados nesse trabalho. A "nano organização" permite a conexão entre a tecnologia e sua aplicabilidade, por exemplo, géis líquido-

cristalinos como carreadores de fármacos. A aplicação desta técnica visa entender e usar as funções finais para quais os materiais são delineados. As tecnologias para atingir esse objetivo envolvem a manipulação de átomos e moléculas individuais através de interações físicas, reações químicas, campos aplicados ou *self-assembly* (AONO; ARIGA, 2016; ARIGA et al., 2015).

Vale salientar que o conhecimento da Química Supramolecular vem sendo utilizado pelo grupo na construção de arranjos funcionais, na finalidade de modular as interações com meio biológico (WEBBER et al., 2016). Neste projeto, o enfoque está na permeação cutânea e dinamicidade das forças supramoleculares na interface pele/ sistema de liberação.

Por que usar a Química Supramolecular e Nanoarquitetônica como bases para o *design* racional de sistemas de liberação tópico/transdérmico? A resposta é que em conjunto essas duas áreas de pesquisa oferecem um *framework* básico para o controle de propriedades dos sistemas de liberação. Enquanto a Química Supramolecular fundamenta os princípios que governam as forças não-covalentes responsáveis pela estruturação do sistema, a Nanoarquitetônica organiza este conhecimento em torno do conceito de (multi)funcionalidade (TAMMELIN et al., 2015). Assim, o *design* racional foca-se na produção de estruturas com propriedades controladas por meio da manipulação de interações supramoleculares. Estas propriedades são importantes para que o sistema exerça as suas funções pretendidas na nano-bio interface e, conseqüentemente, promovam a resposta biológica almejada (NEL et al., 2009).

#### **1.4 Supra-anfifílicos baseados em meglumina como estratégia na permeação de fármacos e sistemas nanoparticulados**

Os estudos em sistemas supramoleculares tiveram início com um problema que surgiu na indústria. Um fármaco estava precipitando na linha de produção de injetáveis, e foi descoberto que era devido a complexação do fármaco, que possui um grupamento carboxílico, com a meglumina, um excipiente utilizado no veículo. Esse trabalho deu origem a tese de mestrado do Douglas Lopes Cassimiro e se verificou que havia a formação de um polímero supramolecular entre Meglumina-fármaco (CASSIMIRO et al., 2012). Continuando os estudos em sistemas supramoleculares, no doutorado dele foi estudado a formação de uma molécula anfifílica cuja parte polar era composta pela meglumina e a cauda por ácidos graxos, o ácido esteárico e oleico (CASSIMIRO et al., 2018).

Nesta tese foi explorado os ácidos graxos análogos - esteárico (saturado, 18 carbonos) e oleico (1 insaturação, 18 carbonos) - foram utilizados no desenvolvimento de moléculas supra-anfifílicas que se auto-organizam, na presença de água, em géis líquidos-cristalinos de mesofases lamelar ou hexagonal.

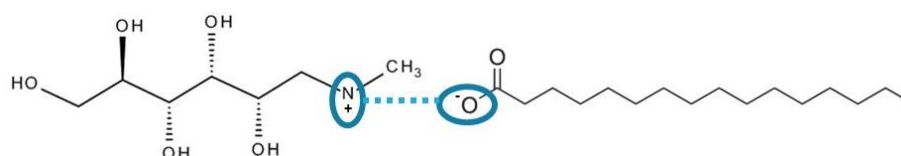
Cristais líquidos são materiais únicos por combinar a ordem molecular de sólidos e propriedades dinâmicas do estado líquido. Devido à sua natureza dinâmica – com propriedades físicas anisotrópicas e comportamento reológico de líquidos – muitos estudos demonstram sua aplicação como materiais estímulos-responsivos, que os tornam promissores e aplicáveis (MCLAUGHLIN; ABBOTT; GUYMON, 2018).

Sistemas líquidos-cristalinos vêm demonstrando bons resultados na literatura como um sistema liberação controlada; são capazes de comportar tanto fármacos hidrofílicos quanto lipofílicos e apresentam elevada estabilidade físico-química. Esse projeto visa estudar, além de propriedades físico-químicas específicas do sistema, a vetorização do tratamento através de estudos da modulação da permeação (CARVALHO et al., 2013).

Os ácidos graxos são capazes de formar adutos com a meglumina supra-anfifílica. Estes sistemas serão os objetos de estudo do projeto de pesquisa. O aduto formado pelo ácido esteárico e ácido oleico serão denominados por MGAE e MGAO, respectivamente. O intuito agora é se aproximar da resposta biológica em função dos componentes da formulação. A Figura 2 ilustra a estrutura do supra-anfifílico

O ácido esteárico é conhecido como um agente oclusivo ao passo que o oleico como promotor de permeação (GUPTA et al., 2019). Espera-se que tais características sejam mantidas quando o sistema o gel é formado, carregando as características intrínsecas dos *building-blocks* ao sistema de liberação. Espera-se que estas características sejam conservadas no sistema de liberação.

Figura 2 - Ilustração molecular do supra-anfifílico



Fonte: Autor

Nesta proposta de pesquisa será trabalhado 2 agentes: um inorgânico (nanopartículas de prata) e outro orgânico (fluoresceína). A fluoresceína foi utilizada como marcador fluorescente. A escolha da fluoresceína pondera-se na similaridade estrutural com o anti-inflamatórios não-esteroidais (estrutura planar, logP e massa molecular). Este

marcador fluorescente é facilmente quantificado por microscopia de fluorescência e espectrofotometria e permite uma avaliação precisa do potencial do sistema na liberação de fármacos (SJÖBACK; NYGREN; KUBISTA, 1995).

Além disso, a incorporação de nanopartículas de prata como modelo de agente inorgânico. Os géis foram utilizados como estratégia para atuarem como agentes de retenção/permeação cutânea. Embora dentro do escopo deste projeto não contemple ensaios antimicrobianos, vale mencionar que estas partículas são comumente empregadas como agentes microbicida, demonstrando um amplo espectro de ação, mesmo em bactérias multirresistentes (TAK et al., 2015).

## **2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA**

### **2.1 Pele e permeação: promissora via não-invasiva**

A pele, como mencionado, não é somente uma barreira a patógenos e a agressões externas, mas também é uma via atrativa para administração de fármacos pois apresenta grande superfície e fácil acessibilidade (VOGT et al., 2016).

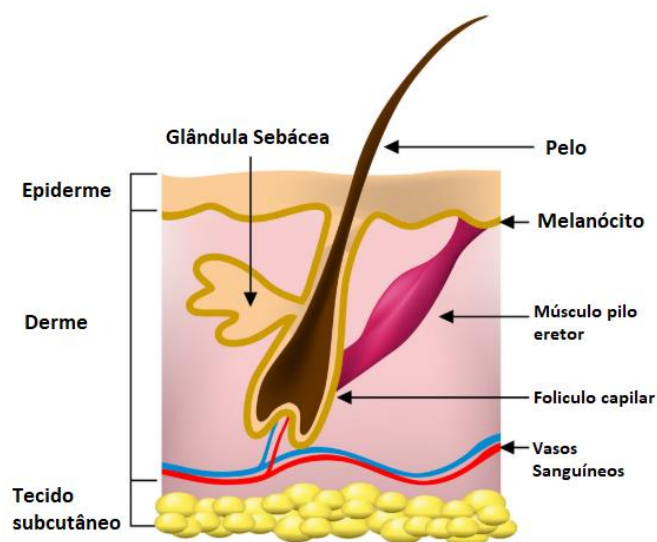
Sua vantagem em relação as demais vias de administração tradicionais são: comparado a via oral, evita passagem pelo trato gastrointestinal e, conseqüentemente, os pH extremos do estomago e intestino, ação de enzimas, e metabolização pré-sistêmica; em comparação a via intravenosa, caso haja efeito colaterais há fácil remoção e não é invasiva; ou comparado as mucosas, não há depuração dos fluidos-biológicos. Porém, mediante a tantas vantagens, a forma farmacêutica aplicada a pele deve ser minuciosamente delineada para sua efetiva ação através do estrato córneo (KIM et al., 2018).

O estrato córneo tem aproximadamente 15-20  $\mu\text{m}$  de espessura e sua composição celular é feita conócitos, rico em queratina e, através do processo de descamação, mantém renovação constante das camadas inferiores. As junções intercelulares são preenchidas por uma matriz lipídica. Por isso, somente moléculas pequenas ou relativamente lipossolúveis conseguem realizar a permeação transcutânea. Logo abaixo ao estrato córneo se encontra a epiderme, derme e o tecido subcutâneo, que podem ser o local de ação ou barreira adicionais a passagem do fármaco (JIA et al., 2018; SUNDER, 2019).

A epiderme é um epitélio escamoso estratificado, composto por queratinócitos suprabasais e basais diferenciados. Os queratinócitos na camada basal do estrato proliferam através da mitose e as células-filhas deslocam-se para cima (parte externa), alterando a forma e sua composição à medida que passam por múltiplos estágios de diferenciação celular para eventualmente se tornar anucleadas, ou seja, se tornar parte do estrato córneo (MOORE et al., 2018). Durante esse processo, os queratinócitos se tornarão altamente organizados, formando junções celulares (desmosomos) entre si e secretando proteínas de queratina e lipídios que contribuem para a

formação de uma matriz extracelular e proporcionam resistência mecânica à pele. Os queratinócitos do estrato córneo são eventualmente eliminados da superfície, levando a descamação. A epiderme não contém vasos sanguíneos e as células das camadas mais profundas são nutridas pela difusão dos capilares sanguíneos que se estendem para as camadas superiores da derme (TAKEO; LEE; ITO, 2015). A Figura 3 retrata a estrutura da pele.

Figura 3 - Estrutura da pele



Fonte: Autor (adaptado de: [https://www.123rf.com/photo\\_38581477\\_stock-vector-skin-structure.html](https://www.123rf.com/photo_38581477_stock-vector-skin-structure.html))

Para transposição do estrato córneo é utilizadas metodologias ativas e passivas no intuito de aumentar a permeação de moléculas. A transposição por metodologias ativas utiliza fontes de energia externa, como: iontoforese, sonoforese, microagulhas e eletroporação. Apesar de mostrar boa resposta, técnicas ativas exigem equipamento e mão-de-obra especializada para sua aplicação, o que encarece e dificulta acesso a tais terapias (CHIN et al., 2019; GUY et al., 2000; VOGT et al., 2016).

A transposição por metodologia passiva, por sua vez, utiliza promotores químicos de permeação e líquidos iônicos, se baseia na desorganização momentânea do estrato córneo para aumento da permeabilidade cutânea (GUPTA et al., 2019). Mais de 350 substâncias demonstram atuar como promotores de permeação via diferentes mecanismos, essas moléculas incluem: ácidos graxos e álcoois graxos, álcoois e glicóis, terpenos, sulfóxidos, laurocapram, pirrolidonas, tensoativos, ureia, entre outros. Estudos tem tentado relacionar a identidade química de molécula com seu mecanismo de ação (LUNDBORG et al., 2018).

Vários mecanismos de ação têm sido propostos para os promotores químicos de permeação, tais como: i) alteração da solubilidade do fármaco no sistema de liberação, ii) alteração da permeabilidade do estrato córneo, iii) a perturbação da organização lipídica da barreira cutânea (GUPTA et al., 2019; LUNDBORG et al., 2018; MAIONE-SILVA et al., 2019).

Destaca-se também que o folículo capilar pode atuar como uma via facilitadora para a permeação. A formulação pode ter acesso direto à derme utilizando o folículo piloso como uma via facilitadora, permeando diretamente pelo folículo (LADEMANN et al., 2015).

Apesar de haver modelos matemáticos com algoritmos complexos que simulem a efetividade de promotores de permeação, este processo ainda é complexo pois envolve múltiplas variáveis como: espessura do estrato córneo, concentração de fármaco na matriz, reologia da formulação, lipofilia do fármaco, dentre outros fatores que estão além da própria formulação de permeação (LUNDBORG et al., 2018).

Hoje, o meio mais utilizado para se avaliar a permeabilidade da pele são por ensaios *in vitro* / *ex vivo*. A permeabilidade é comumente avaliada usando células de difusão, como as células de Franz, consistindo de uma pele excisada (humana ou animal) separando o sistema de liberação (doador) e uma célula com solução receptora (OYAFUSO et al., 2015). Porém existem limitações, os experimentos com células de difusão são no entanto caros e demorados, e existem países, como europeus, que proíbem o uso de pele animal para testes farmacêuticos (SEO; KIM; KIM, 2017a).

Para interpretação dos dados de permeabilidade deve-se estar atento se o sistema doador não pode atuar imprevisivelmente, alterando a permeabilidade da pele, levando a viés de erro. Um efeito que perturba a estrutura da barreira cutânea é exposição prolongada à água e aos co-solventes. Isso pode explicar a grande variabilidade na permeabilidade da pele, relatada na literatura para um mesmo composto em diversas condições. Portanto, esse experimento deve ser planejado e analisado minuciosamente (SIMON et al., 2016; UCHIDA et al., 2015).

A permeação também pode ser alterada devido a condições fisiológicas e patológicas. Como exemplo de condição patológica temos os quadros de inflamação. Durante o processo inflamatório há o recrutamento de macrófagos para local da inflamação e edema. Esse processo ocorre graças a vasodilatação local e aumento da expressão de fatores de crescimento vascular, isso leva a maior irrigação sanguínea do local lesado (BOATENG et al., 2008; GONZALEZ et al., 2016). Logo, a permeação de fármacos pode se dar de modo diferenciado de uma pele saudável. Quanto a condição fisiológica podemos citar o envelhecimento, processo natural o qual a pele tem perda de elastinas e menor integridade estrutural, isso leva a uma pele menos elástica e que perde mais umidade. Também há menos fatores de crescimento, que reduz a circulação local. Todos esses fatores podem se relacionar com permeação mais ou menos efetiva (MAIONE-SILVA et al., 2019; ZOUBOULIS et al., 2019).

A permeabilidade também se relaciona com fatores biológicos relacionados intrinsecamente ao tecido como: espessura – quão mais espessa for a camada tecidual, maior será o caminho que o fármaco terá de permear e isso dificulta sua passagem (MARWAH et al., 2016); tipo de tecido – mucosas e epitélios tem morfologias celulares distintas o que pode facilitar ou dificultar permeação do fármaco; o quão sanguineamente irrigado é o tecido e quanto maior a circulação sanguínea pode ser útil para uma terapia com foco sistêmico (HONARI, 2017);

integridade do tecido – que em caso de feridas, o tecido lesado está exposto e inflamado, e o edema formado pode alterar características de permeabilidade de membrana (KIM et al., 2018); e até mesmo ao próprio fenótipo do indivíduo – mostram que homens e mulheres tem diferenças no epitélio (DRAELOS, 2018).

Além das classes de agentes de permeação, existem moléculas que promovem a ação oposta, os agentes oclusivos. Os agentes oclusivos tem como principal função reter moléculas em níveis mais superficiais do estrato córneo. Estudos demonstram que moléculas com elevado tamanho de cadeia, como ácidos graxos saturados com mais de 14 carbonos, ou compostos ionizados tendem a ter baixa permeabilidade. Isso é importante para algumas terapias tópicas, onde o foco é a superfície cutânea e não se deseja níveis sistêmicos de fármacos (COOPER, 1984; LESMES et al., 2009).

Na área de sistemas de liberação sempre há novas formulações sendo propostas como uma forma de melhorar a terapia. Dentre alguns sistemas de liberação, podemos chamar destaques para alguns que estão em voga na literatura:

Lipossomas é uma vesícula esférica que tem pelo menos uma bicamada lipídica. Têm sido bastante explorados dentro da área farmacêutica por possuir um núcleo polar e uma camada apolar, que permite associar fármacos de diferentes polaridades. Além disso, é possível realizar modificações em sua superfície (funcionalização), como por exemplo com anticorpos, para melhorar a vetorização. Os lipossomas são compostos, na maioria das vezes, por fosfolipídios, ou múltiplos lipídios. Devido a ser um sistema biomimético, que simula uma membrana biológica, os estudos na literatura mostram uma boa biocompatibilidade e, devido a seu tamanho nanométrico, facilidade em permear por membranas biológicas. Também demonstra uma liberação controlada, aumentando a eficácia da terapia (KAPOOR et al., 2018; MEZEI, 2017).

As microemulsões são misturas translúcidas líquidas e isotrópicas termodinamicamente estáveis entre óleo, água e tensoativo, e frequentemente em combinação com um co-tensoativo. Em contraste com as emulsões comuns, as microemulsões não requerem as condições de alto cisalhamento geralmente usadas na formação de emulsões comuns, explicado pela entropia favorecida na formação do sistema. Assim como os lipossomas, também tem sua vantagem devido ao tamanho e presença de uma fase polar e apolar e demonstram bons resultados em aplicações tópicas (KALE; DEORE, 2017; YUTANI et al., 2016).

Cristais-líquidos (CLs) é um estado da matéria que tem propriedades intermediárias entre os líquidos e sólidos. Por exemplo, um cristal líquido pode fluir como um líquido, mas suas moléculas podem ser orientadas de maneira cristalina. Existem muitos tipos diferentes de fases de cristal líquido, que podem ser distinguidas por suas diferentes propriedades ópticas. O que determina suas propriedades e classificação é diretamente relacionadas a orientação das lamelas em diferentes direções. As lamelas possuem um arranjo ordenado, derivado de um arranjo hierárquico das micelas. Cristais-líquidos, em especiais os liotrópicos têm sido exploradas para terapias tópicas por apresentar liberação sustentada (CARVALHO et al., 2013; OTTE et al., 2017).

Nanopartículas poliméricas são consideradas um sistema coloidal, sendo uma dispersão nanoparticulada com diâmetros variando de 1–1000 nm. São sistemas usualmente formado por interações eletrostáticas entre cadeias poliméricas catiônicas e aniônicas. Estes sistemas não são usualmente aplicados a pele, devido a carga de superfície da nanopartícula, ela tem uma baixa permeabilidade. Exceto no caso do câncer de pele, pela característica aniônica do tumor interagir bem com nanopartículas catiônicas (AMOABEDINY et al., 2018; MOHAMMED et al., 2017).

Filmes podem ser referidos como uma camada fina e flexível de polímero com ou sem um plastificante. Eles ganharam destaque na literatura pela sua fácil aplicabilidade e ação localizada. Eles são especialmente visados em sistemas dérmicos pela sua maleabilidade em se adaptar a região aplicada e atuar como uma proteção física, favorecendo processo de reparo celular. Também deve-se destacar os filmes à base de biopolímeros, como a celulose bacteriana, que vem trazendo inovações a área medicinal e mostrando maior efetividade frente aos filmes convencionais (KARKI et al., 2016; MANDAL; CHAKRABARTY, 2018; PICHETH et al., 2017).

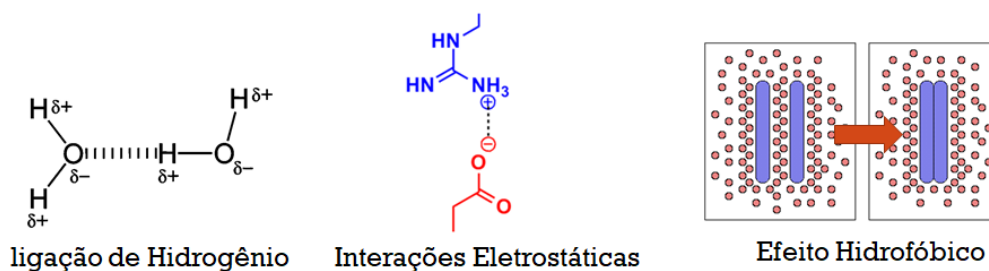
Por fim, nanopartículas magnéticas, são responsivas a orientação magnética, possibilitando assim uma vetorização do fármaco em sinergia a uma força externa (campo magnético) e, em alguns casos, ser utilizada como imageamento (ARRUEBO et al., 2007; DOBSON, 2006).

## **2.2 Química Supramolecular e a construção de novos sistemas de liberação.**

A Química Supramolecular é a área da Química que se baseia nos conceitos das ligações não-covalentes para entendimento e síntese de estruturas químicas. As ligações não-covalente são de caráter fraco e incluem ligação de hidrogênio, coordenação de metal, forças hidrofóbicas, forças de van der Waals, interações pi-pi e efeitos eletrostáticos. Devido a fragilidade dessa ligação, qualquer alteração no equilíbrio termodinâmico do sistema pode levar quebra/formação/alteração dela e alterar todo o arranjo (MATTIA; OTTO, 2015).

O estudo de interações não-covalentes é crucial para entender muitos processos biológicos que dependem dessas forças para estruturar e funcionar (OGI et al., 2014). Adicionalmente, ela proporcionou um grande avanço na área de síntese de materiais, tanto para sistemas mimetizando superfícies biológicas quanto para polímeros, que dependem das interações não-covalentes para uma determinada conformação/ arranjo (LIU; WANG; ZHANG, 2012). A Figura 4 ilustra algumas dessas ligações.

Figura 4 - Exemplificação de ligações supramoleculares.



Fonte: Autor

Dentre os importantes conceitos que a Química Supramolecular pode avançar incluem *self-assembly* molecular, dobramento molecular, reconhecimento molecular, interação entre molécula hospede-hospedeira, nanoarquitetônica e a Química covalente dinâmica (LEHN, 2007).

A primeira ligação não-covalente postulada foi proposta por Johannes Diderik van der Waals em 1873. Em 1894 Hermann Emil Fischer, com sua proposta de interação da enzima com substrato pelo modelo “chave-fechadura” ganhou o nobel. A partir de então, esse campo de conhecimento começou a evoluir e ganhar mais força e reconhecimento. Com a progressão do conhecimento, Latimer e Rodebush em 1920 propuseram a ligação de hidrogênio (CLARK; LIGHTFOOT, 2016).

Graças a esse conhecimento foi possível propor a estrutura tridimensional das proteínas, e outros processos biológicos, incluindo a elucidação fita de DNA em dupla hélice por Wattson e Cricket.

E o conhecimento se expandiu, após alguns anos, a área de síntese de materiais, até a importante descoberta de Charles J. Pedersen em 1960 sintetizando um composto cíclico por ligações supramoleculares. Até finalmente em 1987 que Jean-Marie Lehn ganham o Nobel em Química com sua proposta de síntese de compostos em que moléculas atuam especificamente em sítios por meio de ligações supramoleculares, ou seja, ter controle sobre a arquitetura do sistema unicamente por delineamento das forças não-covalente (LEHN, 1988). Esse avanço foi tão importante que Lehn é considerado como “pai” da Química Supramolecular.

A partir de então, o desenvolvimento foi expandindo em diversas áreas e alavancando a nanotecnologia, possibilitando desenvolvimento de micelas, emulsões, compostos de coordenação, entre outros. No campo da biologia, também houve avanços significativos como os estudos de computação que preveem a interação de fármaco e receptor, desenvolvimento de membranas biomiméticas, projeção da estrutura de proteínas, dentre outras (WEBBER et al., 2016).

No escopo de *design* e controle das forças supramoleculares, deve-se entender melhor a termodinâmica deste sistema. Como a energia da ligação supramolecular é fraca, o sistema não requer energia de ativação para sua formação. Por isso, a estrutura supramolecular é frágil e pode ser facilmente afetada por fatores externos como temperatura e meio de solvatação. A Alta temperatura não favorece os arranjos supramoleculares, com o aumento da vibração molecular se há o rompimento das ligações supramoleculares, exemplo claro disso são as transições de estado e de fase que correm nos materiais. O meio, por sua vez, também desempenha papel fundamental. Solventes próticos ou apróticos podem alterar totalmente a conformação de uma molécula pelas interações e ionizações. Além disso, a adição de sais e outras moléculas também podem afetar o equilíbrio do meio, levando a novos arranjos (ČERNÝ; HOBZA, 2007; HAINO, 2019; MATTIA; OTTO, 2015).

Dentre os conceitos que a Química Supramolecular desenvolveu, um dos mais importantes foi a concepção do processo de *self-assembly* (auto-organização). O *self-assembly* é um processo espontâneo nas quais as moléculas se organizam na conformação entropicamente mais favorável. Isso leva a formação de grandes estruturas, tais como micelas, membranas, cristais-líquidos, entre outros. Esse arranjo pode ser intermolecular ou intramolecular, como efeito orto em moléculas orgânicas (FONG et al., 2016; RAI; PRADIP, 2017).

Uma área que tem ganhado enfoque dentro da Química Supramolecular é a nanoarquitetônica, que se baseia no delineamento de *building blocks* para criação de arranjos funcionais. Os *building-blocks* têm características estruturais e funcionais específicas e são utilizados como unidades para construir arranjos hierárquicos funcionais maiores (AONO; ARIGA, 2016).

### **2.3 Supra-anfifílicos X tensoativos convencionais**

Os tensoativos são compostos que possuem um caráter anfifílico e são definidos pela capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido. Além disso, tendem a formar agregados (micelas) em baixas concentrações em água. Os tensoativos possuem propriedades que os tornam adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, formação de espuma, molhabilidade, solubilização e dispersão de fase (RAI; PRADIP, 2017).

A grande maioria desses compostos são derivados de petróleo e tem uma taxa lenta de biodegradação que, combinada com seu uso extensivo, os torna persistentes no

ambiente aquático, prolongando seus efeitos tóxicos, como alquilbenzeno sulfonado, um dos os principais constituintes do detergente comercial (PALMER; HATLEY, 2018).

A preocupação ambiental tem impulsionado uma busca crescente por tensoativos de origem naturais, como produtos de sistemas metabólicos vegetais e microbianos, ou obtidos sinteticamente por meio de reagentes naturais. Parte do interesse está na grande oferta de matéria-prima renovável utilizada na sua elaboração. Outras características atraentes derivam de sua rápida biodegradação e baixa toxicidade em animais e humanos (OTZEN, 2017)

Moléculas anfifílicas apresentam parte poli-hidroxilada, geralmente derivada de açúcares. A cadeia carbônica é derivada de compostos graxos como ácidos, ésteres, álcoois e triacilgliceróis obtidos de óleos e gorduras (MILLER; AKSENENKO; FAINERMAN, 2017; OTZEN, 2017).

Em concentrações muito baixas, o tensoativo tende a ficar na interface do sistema, com a cabeça hidrofílica voltada para dentro do solvente aquoso e a cauda voltada para fora da solução. Quando se aumenta a concentração, por já haver muito tensoativo na interface ocorre o agrupamento e empacotamento no meio solvente e há estruturação das micelas ou vesículas, que seria um agregado com as cabeças hidrofílicas ficam voltadas para o meio aquoso enquanto que as caudas formam um núcleo hidrofóbico (se o solvente fosse apolar ocorreria formação de micelas invertidas, que é um núcleo polar com a cauda apolar voltada para o meio). Conforme se aumenta ainda mais a concentração de tensoativo na solução há uma alteração no empacotamento das micelas que levará a formação dos cristais líquidos (AMOABEDINY et al., 2018; OTZEN, 2017)

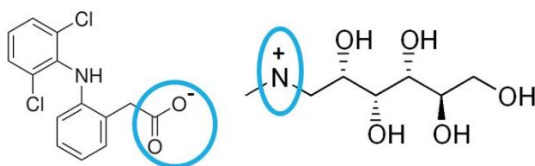
Para sintetizar novas moléculas, geralmente é empregado um método de síntese covalente, que requer um volume elevado de solventes orgânicos e várias etapas de purificação. Para superar esse problema, utilizamos um novo caminho de síntese: a Química Supramolecular (LEHN, 2007).

A Química Supramolecular propõe o uso de ligações não-covalente para delineamento de novas estruturas. A síntese supramolecular reduz as etapas tomadas para obter um novo composto e permite trabalhar com um grande número de moléculas.

Uma propriedade interessante da meglumina, um açúcar natural, é se ligar a ácidos orgânicos por interação eletrostática formando adutos supramoleculares que promovem o aumento da solubilidade desses ácidos em meio aquoso. De posse desse conhecimento, vamos utilizá-lo como precursor de uma nova classe de compostos: supra-anfifílico, um

aduto formado por interações eletrostáticas de meglumina e um ácido carboxílico (CASSIMIRO et al., 2012). A esquematização está representada na Figura 5.

Figura 5 - Ilustração da ligação supramolecular entre grupamento carboxila e meglumina



Fonte: Autor

A formação de um aduto supramolecular, por outro lado, envolve uma reação ácido-base entre um ácido graxo e meglumina sem a formação de subprodutos. Este método, para além de reduzir a necessidade de passos de purificação, tornando-o bastante simples, rápido e barato (FERREIRA et al., 2016).

## 2.4 Fluoresceína e Nanopartículas de prata: Aplicações

As nanopartículas de prata (AgNP) têm ganhado cada vez mais espaço na literatura como uma das partículas metálicas mais exploradas. Isso se deve a sua grande versatilidade que pode ser aplicada tanto na área biomédica, que atrai uma gama explorações no campo terapêutico, quanto em áreas tecnológicas como: meio ambiente, sanitizantes, catalisadores, cosmética, dentre outros (PRABHU; POULOSE, 2012).

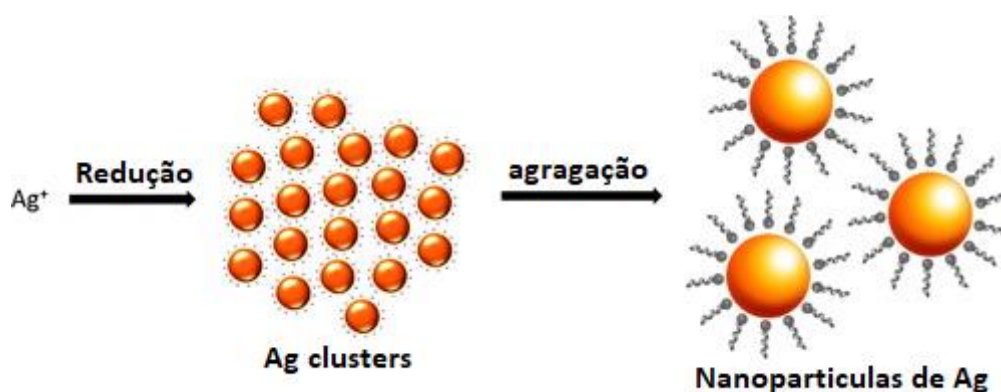
Nas últimas décadas, a medicina tem explorado nanopartículas de metais nobres como uma nova abordagem terapêutica, em especial a prata. Do ponto de vista tecnológico, ela chama a atenção pelo baixo custo, reprodutibilidade e facilidade em obtenção (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013). Há aplicações em diversas áreas, chamando atenção a atividade antimicrobiana intrínseca e pode ser explorada nos campos físico-químicos como um material com propriedades eletrônicas, magnéticas, catalíticas e ópticas. Além disso, as nanopartículas de prata podem ter diversos tamanhos, formas e revestimentos diferentes; tendo cada um propriedades específicas (TAK et al., 2015).

A síntese de nanopartículas de prata é explorada por diversas vias. Os métodos mais comuns para a síntese são pela nucleação de partículas dentro de uma solução. Essa nucleação ocorre quando um complexo de íons de prata, geralmente  $\text{AgNO}_3$  ou  $\text{AgClO}_4$ , é reduzido a prata coloidal ( $\text{Ag}^0$ ) na presença de um agente redutor. Quando a concentração de íons metálicos dissolvidos aumenta o suficiente, eles se aglomeram para formar uma superfície estável – a nanopartícula. Esta superfície recém-formada é

energeticamente desfavorável quando o *cluster* é pequeno. Por isso, o *cluster* cresce até certo ponto, conhecido como raio crítico, torna-se energeticamente favorável. Este núcleo permanece então em solução e cresce à medida que mais átomos de prata se difundem pela solução e se ligam à superfície. Quando a concentração dissolvida de prata atômica diminui o suficiente, para-se essa agregação de átomos ao cluster (BASTÚS et al., 2014; PRABHU; POULOSE, 2012).

Este processo de crescimento pode ser estabilizado por outras moléculas que se liguem a sua superfície. Os agentes estabilizadores diminuem e, eventualmente, impede o crescimento da partícula, podendo assim controlar seu processo de formação. Com isso é possível obter partículas de tamanhos, formas e revestimentos específicos, levando a propriedades de superfície particulares. Os revestimentos de AgNP mais comuns são citrato trissódico e polivinilpirrolidona (PVP) (WEI et al., 2015). A Figura 6 ilustra como se dá a formação da partícula de prata.

Figura 6 - Esquematização de como se dá síntese da prata.



Fonte: Autor Adaptado de (ROSTAMI; MEHDINIA; JABBARI, 2017)

Há diversas metodologias propostas para síntese de AgNP. Diversos agentes redutores e métodos físicos de redução são propostos, tais como: açúcares redutores, redução por citrato, redução via borohidreto de sódio, a reação do espelho de prata, o processo de poliál e crescimento mediado pela luz. Cada metodologia, ou uma combinação sinérgica entre mais de um método, oferecerá diferentes graus de controle sobre a distribuição de tamanho, coberturas e arranjos geométricos das nanopartículas (TRAN; LE, 2013).

Dentre essas diversas vias de síntese, as vias por açúcares redutores e citrato são muito exploradas na literatura. A via do citrato usualmente utiliza, para redução, como sal de partida o nitrato de prata ou perclorato de prata para prata coloidal utilizando citrato. A síntese costuma ocorrer em temperaturas elevadas (aproximadamente  $100^{\circ}C$ ) para maior

monodispersividade. O citrato atua tanto como agente redutor quanto como revestimento para as AgNP. Esta via é comumente utilizada pela boa uniformidade de tamanho e forma (BASTÚS et al., 2014). O método por açúcares envolve a utilização de um monossacarídeo para atuar como agente redutor, devido a seu grupamento carboxila. A síntese depende da concentração de açúcar redutor no meio (MESHRAM et al., 2013). Neste projeto foi explorado a meglumina como agente redutora, que pode atuar devido a seu grupamento amina secundária.

No escopo da aplicabilidade, a área medicinal e biotecnológica são as mais tem desenvolvido produtos e sido pesquisadas. Isso se deve ao tamanho reduzidos das AgNP e suas características físico-química – como formato, revestimento e responsividade a estímulos externos – terem sido exploradas como novas terapias (BURDUŞEL et al., 2018; WEI et al., 2015).

Na área da Medicina Humana, as AgNP são exploradas no combate ao câncer. As AgNP têm mostrado que pode atuar como agente anticancerígeno e no imageamento. No caso de um sistema carreador, é possível fazer uma adequada vetorização devido a sua responsividade a luz ultravioleta (que gera excitação da partícula e eventual rompimento da AgNP) e ao campo magnético. Já ela como um agente terapêutico, é capaz de internalizar-se nas células cancerígenas e pela via de liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) levar a morte celular. Além disso ela evita a bomba de efluxo, mecanismo de resistência comum do câncer (DURÁN; NAKAZATO; SEABRA, 2016).

As nanopartículas de prata são amplamente exploradas como um agente antimicrobiano. Elas mostram um amplo espectro de ação, tanto em bactérias gram-positivas quanto gram-negativas quanto em fungos. Além disso, também mostra eficácia em bactérias resistentes a amplo-espectro e a biofilmes bacterianos, que são formas de resistência bacterianas. Isso foi um avanço para medicina, pois permite uma nova terapia a um custo de produção baixo. O mecanismo de ação, apesar de não elucidado totalmente por que atua por mais de uma via, sugere a geração de radicais livres intracelular levando ao estresse oxidativo (via ROS) e a ligação a proteínas plasmáticas e de membrana que culmina na destruição celular. Estudos demonstram a ação em espécies resistentes por evitar a bomba de efluxo (DURÁN; NAKAZATO; SEABRA, 2016; PRABHU; POULOSE, 2012).

Esta ação ampla em bactérias levou ao interesse de sua aplicação em novas tecnológicas, como sanitizantes. O uso em sanitizantes é explorado e justificado pela ação em biofilmes e bactérias resistentes a amplo-espectro. É comum em materiais

hospitalares, como cateteres e sondas, haver colonização de bactérias e serem de difícil remoção, que sanitizantes comuns não conseguem remover. Soluções com AgNP tem mostrado eficácia nestes casos. Também tem sido desenvolvido novos materiais com AgNP incorporadas a eles, cuja intenção é dificultar a colonização de biofilmes. Sua aplicação tecnológica estende-se a matérias e produtos cotidianos como: revestimentos de embalagens alimentícias, desinfetantes, desodorantes, sabões, detergentes, dentre outros (TRAN; LE, 2013).

Porém, mediante a tantas vantagens, também se há uma preocupação com o uso abusivo e o descarte inapropriado em meio ambiente das AgNP, em especial nos rios. Esse descarte leva a uma destruição do ambiente microbiano aquático e a exposição de espécies naturais a prata. Ainda se necessita de dados mais profundos sobre a toxicidade ambiental, mas deve-se chamar atenção a geração de radicais livres em organismo vivos e desequilíbrio da fauna (YU; YIN; LIU, 2013).

No âmbito de sua toxicidade humana, os estudos da literatura apontam que há uma relação dose-dependente. As células, como já mencionado, são afetadas pela geração estresse oxidativo e ocorre um maior tropismo a células reprodutoras. Porém, os estudos mostrados sofram realizados em modelos in-vitro, logo se necessita de mais dados sobre essa exposição do organismo (ASHARANI et al., 2008).

A fluoresceína é uma molécula orgânica (formula estrutural na Figura 7), comumente usada como marcador e como corante. Seu pó é de cor alaranjada/avermelhada e possui solubilidade em água e etanol. Tem um máximo de absorção a 494 nm e máximo de emissão de 512 nm (em água). Sua coloração em água, em pH 6, é esverdeada. Mesmo em concentrações de nanogramas é facilmente detectado por espectroscopia de fluorescência (ACERBI et al., 2014).

Figura 7 - Fluoresceína. A esquerda sua estrutura molecular, no centro em solução aquosa sob luz ultravioleta e à direita seu espectro de absorção e emissão



Fonte: Autor

Este marcador é um fluoróforo comumente utilizado em microscopias e como marcadora biológica e em corantes. A fluoresceína possibilitou um grande avanço a

imunologia, graças a conjugação dela às proteínas e anticorpos, possibilitou o avanço de biomarcadores e, conseqüente, de diagnósticos (DEAN; QIN; PALMER, 2012).

Esta molécula também tem sua aplicação na área medicinal. Ela é uma ferramenta de diagnóstico no campo da oftalmologia. Um colírio contendo fluoresceína é utilizado no diagnóstico de abrasões da córnea, úlceras da córnea e infecções corneais. Uma solução intravenosa de fluoresceína também é utilizada para angiografias no diagnóstico de doenças vasculares (PATEL et al., 2013).

Já há estudos na literatura que utilizam ela como um marcador de permeação por barreiras biológicas, estudos que visam barreiras biológicas como: útero (PARR; PARR, 1986), córnea (SRINIVAS et al., 2018), retina (PATEL et al., 2013), barreira hematoencefálica (HAWKINS; EGLETON, 2006), dentre outros.

Além da quantificação por métodos analíticos, um estudo interessante viabilizado pela escolha de um marcador é um corte histológico no tecido e a visualização no microscópio de fluorescência. É possível a rastreabilidade do marcador e observar seu tropismo (DEAN; QIN; PALMER, 2012; HAWKINS; EGLETON, 2006).

A fluoresceína tem sua absorção e emissão molar dependente do pH, estudos em literatura já relatam essa dependência. Por isso é importante tamponar a solução do sistema para que não haja erro analítico (MARTIN; LINDQVIST, 1975). Ela foi escolhida frente a outras moléculas justamente pelo foco do trabalho estar em observar a permeação cutânea e não a eficácia como um fármaco.

### **3 OBJETIVOS E PRINCIPAIS RESULTADOS ESPERADOS**

O objetivo é a síntese de supra-anfifílicos entre meglumina e dois ácidos graxos – ácido oleico e esteárico – e entender como as diferenças entre as cadeias afetam a estruturação do sistema de liberação. Avaliou-se como géis supramoleculares produzidos a partir de *building blocks* com propriedades biofísicoquímicas diferentes (agente oclusivo x agente promotor de permeação) se comportam físico-quimicamente pelo estudo de um agente inorgânico (nanopartícula de prata) e um agente orgânico (fluoresceína).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Sistema de Liberação em estudo**

O sistema conta com 4 *building blocks*, ou seja, componentes com funções específicas na formulação (Tabela 1).

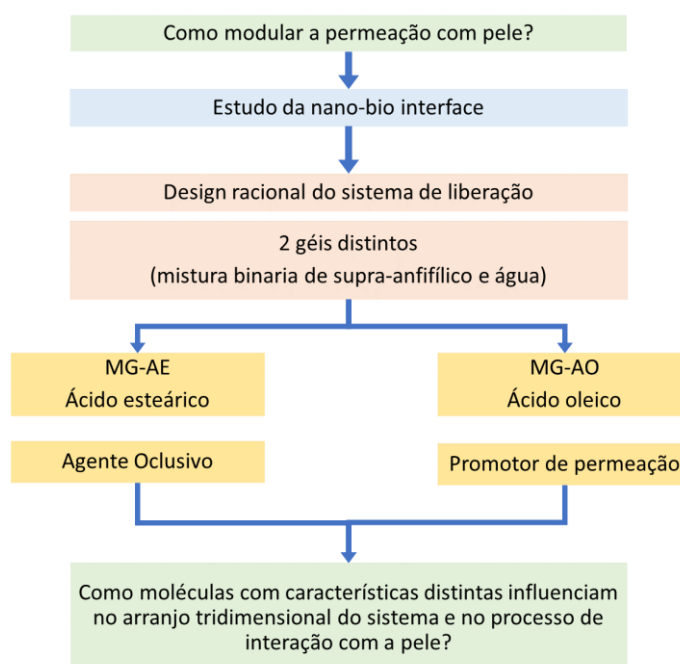
Tabela 1 - Componentes trabalhados e suas respectivas funções

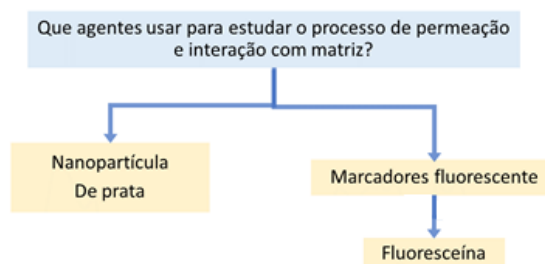
<b>Componentes</b>	<b>Função</b>
<b>MGAE</b>	Supra-anfifílico que se espera ter a ação oclusiva, mantendo elevados níveis de fármaco retido na superfície do estrato córneo (Aungst, 1989).
<b>MGAO</b>	Supra-anfifílico cuja ação está relacionada como a promoção da permeação cutânea e atingir níveis mais profundos da epiderme (GUPTA et al., 2019)
<b>Fluoresceína</b>	Molécula fluorescente que simulará o fármaco e será avaliado permeação através da pele, assim como interação com sistema de liberação;
<b>Nanopartícula de prata</b>	Sistema nanoparticulado no qual espera-se, permeabilidade e ação bactericida.

## 4.2 Design do Estudo

Para esquematização do tema proposto nesse trabalho a Figura 8 ilustra a sequência do estudo.

Figura 8 - Esquematização do estudo





Fonte: Autor

### 4.3 Planejamento e síntese dos supra-anfifílicos

A síntese supramolecular foi empregada para a produção de todos os materiais que desenvolvidos neste projeto. Os procedimentos sintéticos foram conduzidos variando-se a identidade do ácido graxo precursor. A estequiometria MEG/ácido graxo será de 1:1. O processo de síntese consiste no gotejamento controlado de uma solução metanólica de MEG sobre uma solução de ácido graxo em acetato de etila. A mistura reacional é mantida sob agitação em temperatura de 70 °C por alguns minutos e ao final é disposta em Placas de Petri e secas em capela.

### 4.4 Microscopia de luz polarizada

Para obtenção das formulações, foram feitas misturas binárias entre água e supra-anfifílico. As formulações foram colocadas sobre lâmina de vidro, cobertas com lamínula e analisadas em microscópio sob luz polarizada. Foi avaliado a homogeneidade dos sistemas, verificando-se a presença de área de anisotropia, indicativa da presença de cristais líquidos. O intuito foi analisar a formação e o tipo de mesofases, já que se trata de sistemas liotrópicos.

### 4.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise por DSC foi realizada num equipamento Mettler DSC 1 (Mettler Toledo, Gieben, Suíça). O instrumento foi calibrado com Índio e zinco. A análise foi realizada sob uma atmosfera de nitrogênio (50 mL min<sup>-1</sup>). Um cadinho de alumínio (40 µL) foi usado para portar amostra e como referência. As curvas DSC foram registadas à razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>. A faixa de análise foi de -80 °C a 130 °C. Os dados calorimétricos se mostram importantes pois podem demonstrar como os agentes influenciam no comportamento termodinâmico da matriz (CHADHA; BHANDARI, 2014).

## 4.6 Estudos de bioadesão

A força bioadesão pode ser mensurada entre diversas superfícies biológicas, no caso foi utilizada a pele de orelha de porco para simular o estrato córneo humano. As amostras foram avaliadas por TA-XT plus texture analyser (Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra) em Hold Until Time (HUT) mode. Orelhas de porcos frescas foram obtidas a partir de porcos saudáveis e manipuladas para o ensaio tal como descrito por Dick e Scott (1992). As orelhas foram lavadas com água ( $25 \pm 0,5$  ° C), a pele intacta foi removida a partir de cartilagem com auxílio de um bisturi e uma camada de 400 µm de espessura de estrato córneo e epiderme foram removidas do tecido gordo com um dermatômêtro. As peles foram congeladas em -20 ° C e não armazenadas por mais de 4 semanas (Urban et al., 2013).

## 4.7 Conclusões preliminares e escolha do sistema para incorporação.

A partir dos dados coletados, foram elegidas duas formulações para prosseguir os estudos de incorporação das moléculas orgânicas e inorgânicas.

## 4.8 Síntese e caracterização das nanopartículas de prata.

### 4.8.1 Síntese

A síntese em meio aquoso foram feitas utilizando duas vias: a) Utilizando ácido tânico como controle (BASTÚS et al., 2014), e b) Utilizando meglumina como agente redutor. A síntese por Bastús consiste em um meio aquoso contendo citrato e ácido tânico, em manto de aquecimento e sistema de refluxo. Quando o balão começa a suar é adicionado o nitrato de prata, após isso, é centrifugado e retirado o sobrenadante. A síntese com meglumina também foi utilizado um sistema de aquecimento em refluxo, se testou por 2 vias: uma com a meglumina e ácido graxo na solução aquosa, e depois adicionado o nitrato de prata e outra com a solução aquosa com o nitrato de prata e titulando meglumina sobre a solução – ambas vias mostraram agregação. A caracterização destes sistemas também foi contemplada.

As análises foram realizadas em Analisador de partículas ZetaSizer Nano-ZS, Malvern Instruments. O diâmetro médio e o índice de polidispersidade das nanopartículas foram determinados através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) (LIANG et al., 2019). As análises de potencial zeta foi efetuada baseada no efeito de Doppler, ou seja, na alteração da frequência sofrida pela luz dispersa por uma partícula em movimento e determinado o potencial de superfície. Para a realização das medidas do potencial zeta, as amostras foram diluídas em água purificada (LIU; WANG; ZHANG, 2012)

#### **4.9 Incorporação e Característica macroscópica do sistema.**

Foram incorporado fluoresceína em duas concentrações 0,1% e 1%, ao passo que a AgNP foi incorporada na concentração de 10mM. Foi realizado uma análise visual de cada formulação.

#### **4.10 Microscopia de luz polarizada – com e sem Marcador/ NP**

A microscopia foi realizada como descrito no item 4.4. O intuito da análise é observar diferença da estruturação antes e depois da incorporação dos agentes orgânico e inorgânico.

#### **4.11 Microscopia de luz polarizada - Hot stage**

A microscopia foi realizada sob taxa de aquecimento constante de 1 °C.min<sup>-1</sup> e o resfriamento não teve taxa de resfriamento controlada. As imagens foram registradas em câmera do próprio microscópio,

#### **4.12 Microscopia de fluorescência**

A microscopia de fluorescência foi realizada em microscopia com luz na região do ultravioleta. Como a fluoresceína tem ótima sensibilidade, não foi possível realizar na concentração de 1% e 0,1% pois extrapolava o que era possível visualizar. Foi utilizado a concentração 0,01% para análise da estrutura.

#### **4.13 Análises reológicas**

Como o intuito é a aplicação tópica do sistema, a aplicação de uma força para realizar a espalhabilidade na aplicação pode levar a alterações importantes na matriz, podendo favorecer o processo de liberação dos agentes. Para isso, a reologia foi utilizada como ferramenta para obtenção do comportamento visco-elástico e entendimento de parâmetros estruturais e físico-químico perante a uma força orientada.

##### **4.13.1 Análise reológica contínua**

Foram obtidos reogramas dos sistemas selecionados empregando reômetro no modo fluency (flow), e de acordo com a consistência de cada formulação, utilizou-se geometria placa/placa, às temperaturas de 25 e 37 °C. A taxa de cisalhamento a ser utilizar para a curva ascendente será de 0 a 100 s<sup>-1</sup> e para a curva descendente, de 100 a 0 s<sup>-1</sup>

durante 120 segundos cada (DE KRETZER; BOGER; SCALES, 2003; FARJAMI; MADADLOU, 2019).

#### 4.13.2 Análise reológica oscilatória

A análise oscilatória foi empregada com reômetro utilizando geometria cone/placa, conforme a consistência de cada formulação, sendo realizadas em temperaturas de 5, 25 e 37 °C. Para a realização do teste de varredura de tensão, utilizou-se o reômetro no modo amplitude *sweep*, podendo assim determinar a região viscoelástica. A faixa de tensão de cisalhamento de 0 a 50 Pa e frequência de 1 rad/s. Posteriormente, com a determinação da tensão de 10 Pa da região viscoelástica, utilizando o reômetro no modo *frequency sweep* para a realização do teste de varredura de frequência, para a determinação do módulo elástico ( $G'$ ) e módulo viscoso ( $G''$ ). A faixa de frequência será de 0 a 10 Hz, à tensão de 10 Pa (DE KRETZER; BOGER; SCALES, 2003; FARJAMI; MADADLOU, 2019).

#### 4.14 Planejamento de experimentos, análise e interpretação dos dados

Os resultados foram analisados em triplicata e comparados estatisticamente utilizando análise de variância. Para comparações individuais foi realizado o teste *post-hoc* de Tukey's. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  foram usados como critério de significância.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Planejamento e síntese dos supra-anfifílicos.

O trabalho se iniciou, como citado na introdução, com o delineamento racional dos materiais, para que as propriedades desejadas sejam transpostas para o sistema de liberação final. As unidades constituintes do supra-anfifílico, os *building-blocks*, foram pensados em função de sua resposta biológica – a permeação (RUMELHART, 2017).

A interação entre ácidos orgânicos e aminas é bem conhecida e descrita em literatura. Há formação do par iônico unido por interação eletrostática. A partir desse conhecimento se delineou os adutos de meglumina com ácidos graxos (CASSIMIRO et al., 2012). A síntese inicialmente foi estudada variando parâmetros para maior entendimento do sistema:

- Fatores intrínsecos à molécula;
- Fatores intrínsecos ao meio;
- Parâmetros do processo de síntese (como temperatura, agitação, estequiometria).

A proporção estequiométrica entre os reagentes (Meglumina - ácido graxo) mostrou, em estudos do grupo, que o aumento da proporção de meglumina afeta consideravelmente a estruturação do sistema líquido-cristalino.

O fator intrínseco à molécula está relacionado ao tipo de molécula usada para formação do supra-anfifílico e, que por ora, se variou a cadeia de ácido graxo para se analisar o comportamento do sistema. As diferenças são mostradas e explicadas no decorrer dos testes.

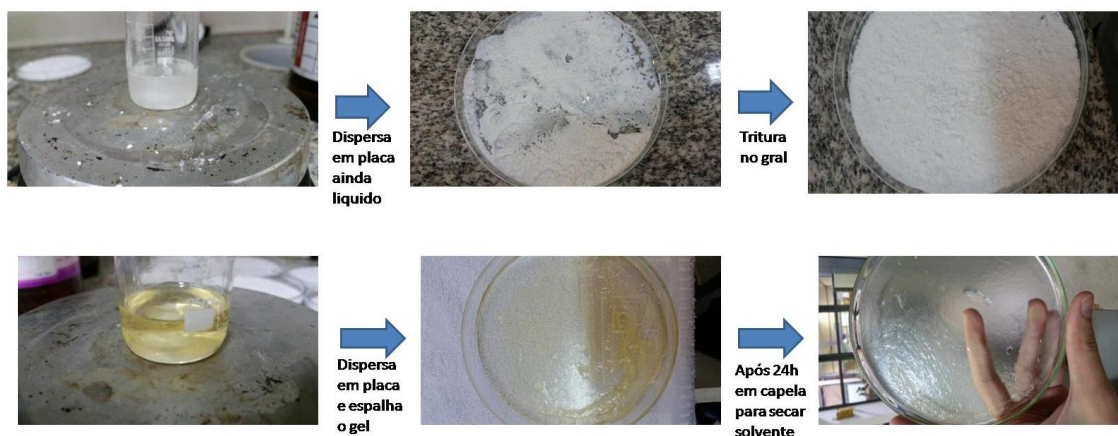
O meio reacional pode interferir na síntese, como alguns sistemas da literatura mostram (AMOABEDINY et al., 2018). Optou-se por utilizar solventes orgânicos para solubilizar bem a meglumina, que foi solubilizada em metanol, e os ácidos graxos, solubilizados em acetato, para se garantir cinética da síntese, que as moléculas estarão solvatadas. A Figura 9 e 10 mostram como se procedeu a síntese descrita na metodologia.

Figura 9 - Esquematização da síntese do supra-anfifílico



Fonte: Autor

Figura 10 - Ilustração de como é dada a síntese dos supra-anfifílicos



Fonte: Autor

Os materiais finais obtidos foram um pó branco para o ácido esteárico-meglumina (MGAE) e um gel maleável para o ácido oleico-meglumina (MGAO). Destaca-se a diferença macroscópica já existente entre os materiais, ocasionado provavelmente pela torção na cadeia do ácido oleico. Foi realizado uma curva termogravimétrica (TG) como controle e se observou que não houve resíduos de solvente orgânico na síntese.

## 5.2 Obtenção dos géis líquido-cristalinos

Os sistemas foram obtidos em várias proporções de água/ supra-anfifílico, de 10% até 90% (m/m), para se observar como o excesso ou escassez de água influencia na estrutura

supramolecular dos cristais-líquidos e como isso afeta suas propriedades físico-químicas. A mistura foi feita por agitação manual. O nome de cada formulação foi dado em função da porcentagem de supra-anfifílico no sistema: MGAE 1 sendo 10% supra-anfifílico e 90% água; MGAE 2 sendo 20% de supra-anfifílico e 80% água; assim por diante, e está demonstrado na Tabela 2.

As diferentes proporções já demonstraram diferenças macroscópicas, ao passo que o MGAE 2 já é um gel maleável, sendo somente a MGAE 1 líquida; o sistema com ácido oleico somente apresenta essa propriedade a partir da formulação 4. Isso demonstra que a torção na cadeia altera as propriedades de fluxo do sistema de liberação, a torção leva a predominância do comportamento líquido.

O sistema MGAE possui uma característica peculiar: transição gel-sol, o que não ocorre no sistema MGAO por isso se estudou a microscopia de luz polarizada em diferentes situações: o sistema no seu preparo e o sistema aquecido e em seguida resfriado. A finalidade é ver a termoreversibilidade dos géis. A transição de fase está também explorada nos estudos de DSC (ARAFA; EL-KASED; ELMAZAR, 2018).

A Figura 11 mostra as imagens obtidas pela MLP. A amostra 1 do sistema MGAE e a amostra 1 e 2 do sistema MGAO apresentaram campo escuro. As demais amostras apresentaram a formação de estrias, indicando a formação de um sistema de mesofase hexagonal, que é a organização do sistema em cilindros (MAKAI et al., 2003).

O sistema MGAE possui um elevado grau de estruturação, em uma concentração de supra-anfifílico menor que o MGAO, ele é capaz de se organizar em uma estrutura em cristal-líquido. Isso é devido a sua maior lipofilicidade, pois a cadeia saturada possui maior entropia no meio aquoso, o que favorece as cadeias se organizarem lado-a-lado para reduzir a energia livre do meio, estruturando-se em uma micela, e conseqüente um cristal-líquido, em menor concentração. (LIANG et al., 2019).

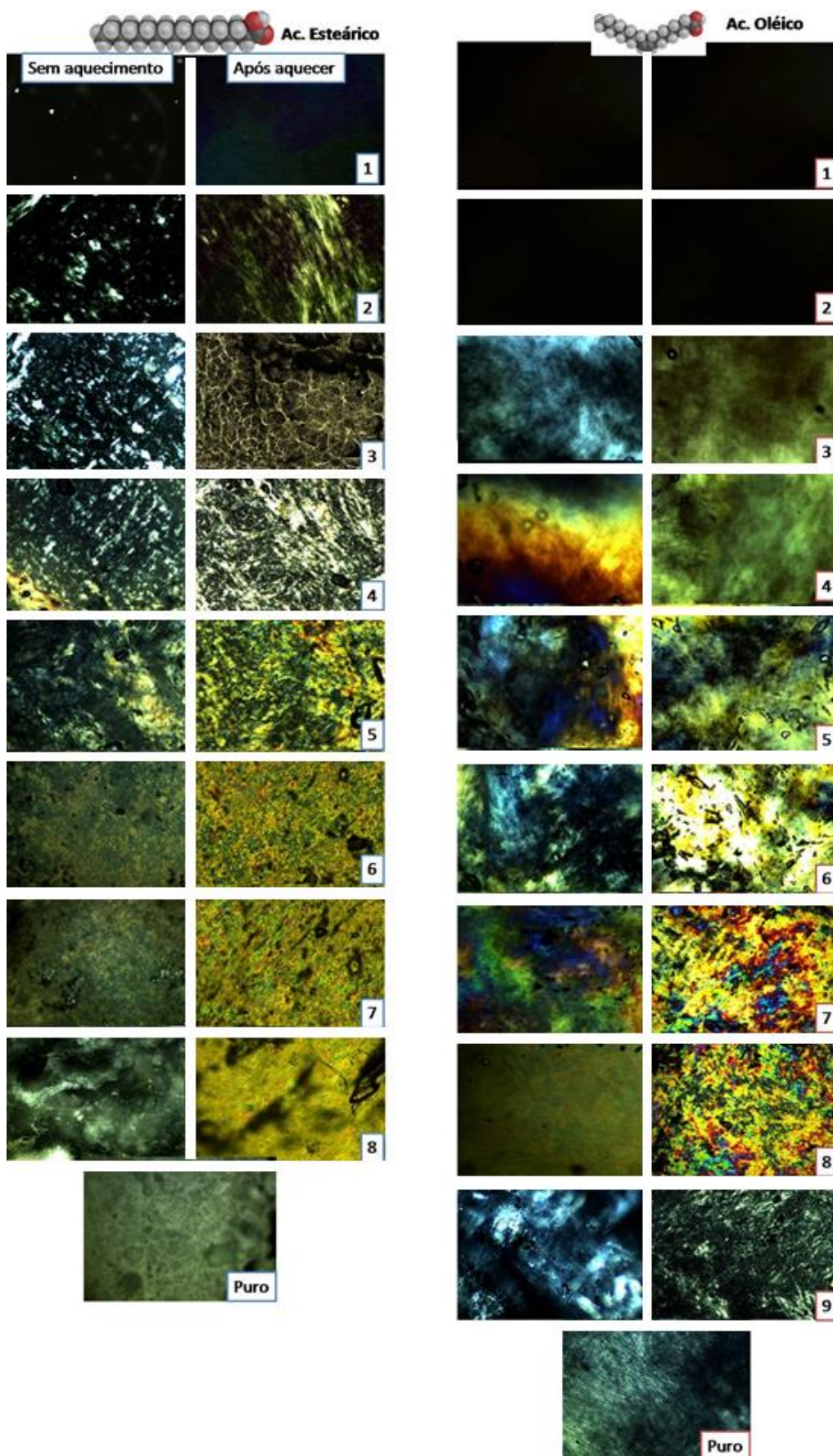
Quanto as mudanças em relação a temperatura, pode-se observar a termoreversibilidade do sistema MGAE, enquanto que o sistema MGAO não apresenta mudanças em sua estrutura. Isso tem uma importância muito grande do ponto de vista da farmacotécnico. Pode-se trabalhar o sistema MGAE em uma temperatura alta, seja para incorporar uma molécula num sistema com menor organização; ou para liberação após desestruturação, que pode alterar as taxas de liberação do fármaco (CHILKOTI et al., 2002; SAHOO et al., 2013).

Tabela 2 - Proporção de água e supra-anfifílico nas formulações

Formulação	Porcentagem de água	Porcentagem de supra-anfifílico
<b>MGAE e MGAO 1</b>	10%	90%
<b>MGAE e MGAO 2</b>	20%	80%
<b>MGAE e MGAO 3</b>	30%	70%
<b>MGAE e MGAO 4</b>	40%	60%

<b>MGAE e MGAO 5</b>	50%	50%
<b>MGAE e MGAO 6</b>	60%	40%
<b>MGAE e MGAO 7</b>	70%	30%
<b>MGAE e MGAO 8</b>	80%	20%
<b>MGAE e MGAO 9</b>	90%	10%

Figura 11 - Microscopia de luz polarizada demonstrando as mesofases obtidas



Fonte: Autor

### 5.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise térmica tem como objetivo o estudo de uma propriedade em função da temperatura. O DSC é o estudo do fluxo de calor de uma amostra em função da temperatura, através de aquecimentos, resfriamentos ou isotermas. Com o fornecimento de calor para a amostra, isso favorece o acontecimento de eventos endo ou exotérmicos, elucidando as transições que ocorrem no material (CHADHA; BHANDARI, 2014).

O trabalho trata do estudo das estruturações dos géis e o DSC faz um papel-chave para entendimento desses sistemas, mas para isso precisamos definir quais os tipos de água que se pode estar presente e que serão estudadas. Quando se trata dos tipos de água no sistema há 3 tipos: água livre, água adsorvida (interfacial) e água ligante (PING et al., 2001; TALIK; HUBICKA, 2018).

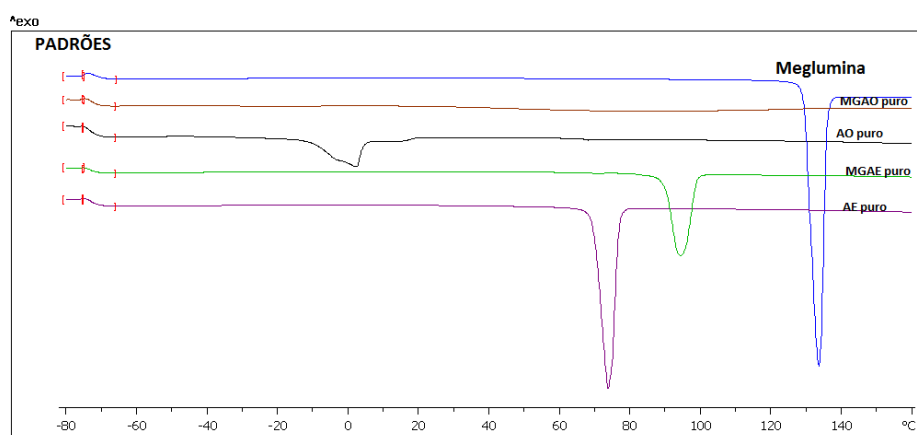
- A água livre é a água dispersante na substancia coloidal. É a água mais facilmente retirada e se apresenta menos ligada ao sistema, sendo importante para parte hidrofílica do sistema de liberação, pois ela está disponível para fazer interações e solvatar moléculas (PING et al., 2001; TALIK; HUBICKA, 2018).

- A água interfacial fica parcialmente presa a superfície de macromoléculas coloidais, ocorre adsorção da molécula por ligações de hidrogênio e forças de van der waals. Ela é retirável do sistema, porém mais dificilmente que a água livre (PING et al., 2001; TALIK; HUBICKA, 2018)

- A água ligada é presa na estrutura do sistema, tendo uma orientação bem definida e é a que está ligada intimamente a parte polar do sistema. É importante destacar que essa água não apresenta eventos no DSC, por estar tão ligada ao sistema ela não é congelável (PING et al., 2001; TALIK; HUBICKA, 2018). Portanto, os eventos analisados serão referentes a água livre ou interfacial e pela diferença entálpica deste evento com o total esperado para o sistema é possível se determinar sua quantia.

Foi iniciado inicialmente uma curva com os materiais puros, para se observar a fusão de cada um, demonstrado na Figura 12. Pode-se notar que houve a formação do aduto supramolecular pelo deslocamento da fusão do material no ácido esteárico e a ausência de eventos no ácido oleico (CASSIMIRO et al., 2012)

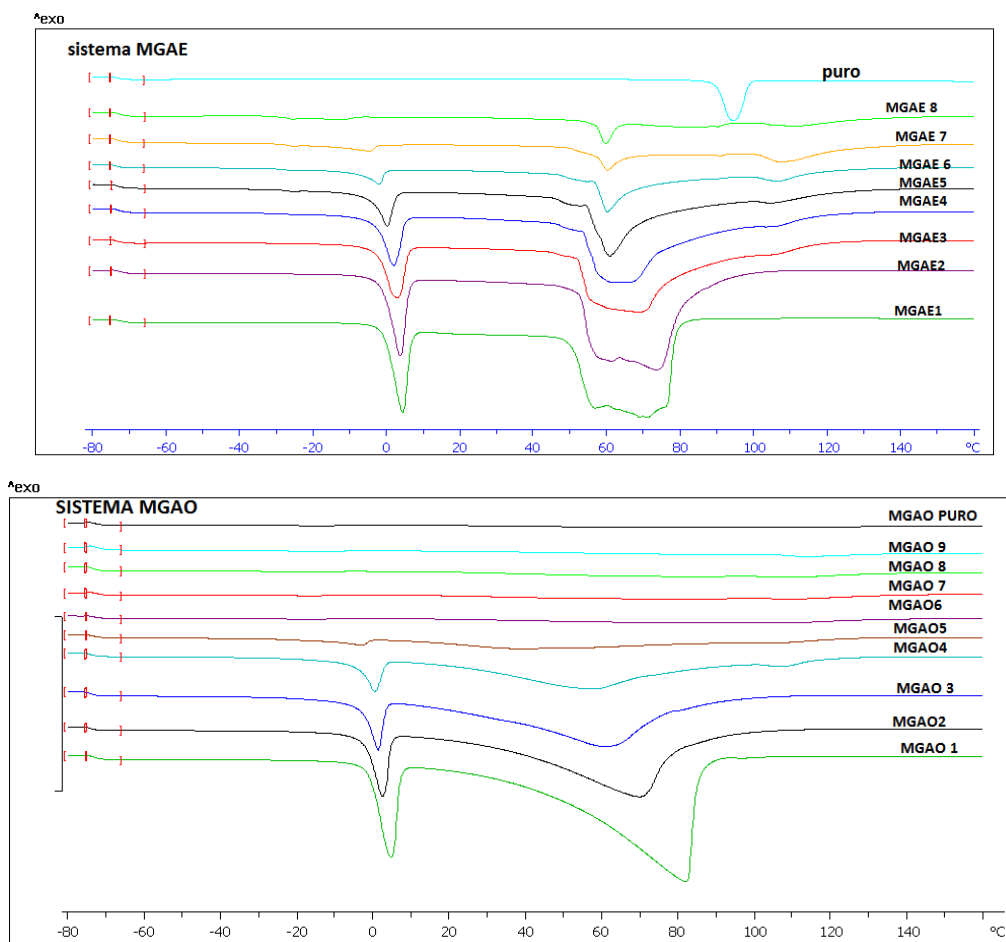
Figura 12 - Curva DSC para os precursores e os supra-anfifílicos



Fonte: Autor

As curvas dos sistemas 1 a 9 foram obtidas e estão demonstradas na Figura 13. As informações quantitativas de interesse estão na Tabela 3: para o sistema MGAE são analisadas a quantidade de água e a temperatura de transição gel-sol e vítrea, para o sistema MGAO é analisado a quantidade de água somente.

Figura 13 - Curvas DSC para os géis obtidos. MGAE demonstrando transição vítrea, fusão da água e transição gel-sol ao passo que o MGAO só demonstra fusão da água.



Fonte: Autor

A tabela 2 mostra transições que serão analisadas.

Tabela 3 - Dados quantitativos obtidos por DSC

Sistema	Temp. de transição vítrea	T onset da fusão da água (°C)	Entalpia/ quantia de água (J.g <sup>-1</sup> )	Quantia de água livre	Temp. de transição gel-sol
MGAE 1	-24,41	-0,78	206,505	61,64 %	41,48
MGAE 2	-25,63	-1,31	173,384	51,76 %	43,88
MGAE 3	-27,38	-2,44	132,86	39,66 %	49,02
MGAE 4	-27,02	-2,78	83,184	24,83 %	50,21
MGAE 5	-27,78	-4,25	43,605	13,02 %	50,88
MGAE 6	-27,94	-7,63	17,96	5,36 %	52,11
MGAE 7	-28,52	-17,28	12,234	3,65 %	56,47
MGAE 8	-28,38	-25,71	4,732	1,41 %	56,62

Sistema	T onset da fusão da água (°C)	Entalpia/ quantia de água (J.g <sup>-1</sup> )	Quantia de água livre	Quantia de água ligada
MGAO 1	-1,11	237,951	71,03 %	28,97 %
MGAO 2	-2,12	128,84	38,46 %	61,54 %
MGAO 3	-2,73	78,05	23,30 %	76,70 %
MGAO 4	-3,78	56,616	16,90 %	83,10 %
MGAO 5	-13,55	16,75	5,00 %	95,00 %
MGAO 6	-29,77	12,78	3,81 %	96,19 %
MGAO 7	-29,06	11,094	3,31 %	96,69 %
MGAO 8	-36,63	5,004	1,49 %	98,51 %
MGAO 9	-31,85	2,063	0,62 %	99,38 %

Pode-se observar no sistema MGAE puro não apresenta transição vítrea. Isso se deve que somente na presença de água o sistema é capaz de realizar a transição de estado vítreo para borrachoso. Essa mudança se deve a um afrouxamento das cadeias do polímero, com a água que permite um movimento de deslizamento entre as cadeias de supra-anfifílico e como resultado observa-se a transição vítrea. Quanto mais diluído o sistema maior a temperatura da transição (mais próxima de zero graus), sugerindo que a presença de água facilita a transição, ou seja, o deslocamento entre as cadeias (NEMILOV, 2018).

O pico analisado para cálculo da quantia de água livre do sistema foi o de fusão. O pico de congelamento, quando a água absorve calor para formar o retículo cristalino (evento endotérmico), podendo ocorrer isso das moléculas vizinhas, ocasionando uma entalpia de um valor menor que ocorrido de fato. Por isso opta-se por utilizar a fusão. Além disso, a transição vítrea é somente visível no aquecimento. A fórmula demonstra como foi realizado o cálculo (NEMILOV, 2018; TOURNIER, 2012).

$$\% \text{ água livre} = \frac{\% \text{ água na formulação} * \text{ entalpia de fusão normalizada}}{\text{ entalpia normalizada da água pura}}$$

A temperatura de transição gel-sol aumenta com a diminuição de água do sistema, indicando que o sistema mais disperso tem o afrouxamento das ligações, que atuam como uma

rede integralizada para manter o sistema polimérico unido no estado gel, para a solução coloidal, que é o estado sol. Quanto maior a quantia de água no sistema, mais fracas se dão as forças supramoleculares que mantem o sistema coeso no estado gel, o estado mais rígido, por isso se tem um deslocamento para temperaturas menores (TOURNIER, 2012).

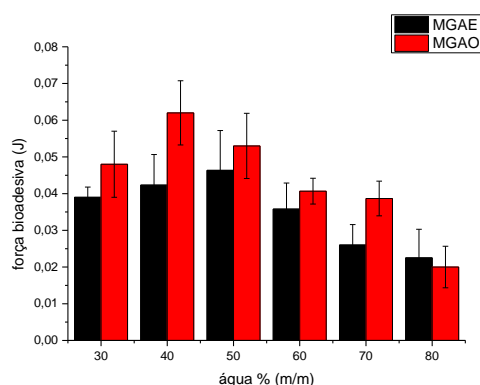
Para o cálculo de quantia de água no sistema se adotou a água com um  $\Delta H_f = 335$  mJ/mg (medido em laboratório). Os sistemas de 6 a 8 apresentaram a água intimamente ligada a ao supra-anfifílico, sendo, portanto, interfacial e ligada (DANDURAND et al., 2015).

No sistema MGAO como não ocorre transição vítrea nem gel-sol, isso se deve as características intrínsecas do sistema. Enquanto que o MGAE se comporta como um polímero, o MGAO é um gel (JEONG; KIM; BAE, 2012).

## 5.4 Bioadesão

As curvas DSC para os sistemas visaram estudar o tipo de água ligada e como esse tipo de água pode influenciar na bioadesividade com o estrato córneo. A Figura 14 ilustra os valores medidos. As amostras 1 e 2 não apresentaram valores de bioadesão significativos, por isso foram descartadas.

Figura 14 - Força bioadesiva dos géis



Fonte: Autor

A força de bioadesão é a força de destaque da amostra, enquanto que o trabalho de bioadesão é a área sobre a curva. Priorizou-se por usar a trabalho, pois ela é a quantidade de força em uma unidade normalizada em função do tempo necessário para se destacar a sonda da amostra. O trabalho de bioadesão sofre algumas interferências, como por exemplo, se a amostra for muito pegajosa e ao invés de um pico bem definido irá aparecer um alargado (OSHIRO JUNIOR et al., 2015). Pode-se notar uma correlação entre o percentual de água ligada – obtida no estudo de DSC - e a bioadesão, quanto maior a quantia de água ligada, maior é a capacidade bioadesiva da formulação. Espera-se fazer futuramente um estudo estatístico de correlação para validar essa hipótese.

## 5.5 Conclusões preliminares e escolha do sistema para incorporação.

Com base nos estudos demonstrados até agora, optou-se por prosseguir o estudo com as formulações MGAE 5 e MGAO 5. Elas apresentam alta bioadesão e a estrutura homologa. A mesma concentração de supra-anfifílico permitirá a própria comparação entre os sistemas de liberação e espera o entendimento das propriedades físico-químicas destacadas na interação com o marcador e nanopartícula.

## 5.6 Síntese das nanoparticulas de prata (AgNP)

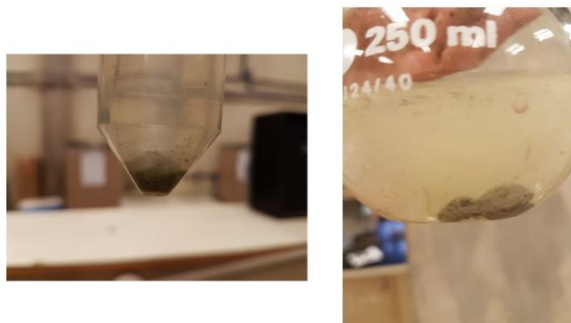
A síntese foi desenvolvida por 2 metodologias: um padrão, já descrita na literatura, que será usada como grupo controle, e outra que está sendo desenvolvida por uma via inovadora, utilizando a meglumina como agente redutor.

A síntese padrão foi segundo a metodologia de Bastús (BASTÚS et al., 2014). Em um balão om 100 mL de água destilada, foi adicionado citrato de sódio (5mM) e ácido tânico (0,025mM), o sistema foi colocado em uma manta de aquecimento e acoplado a um condensador em refluxo, quando o balão começou a suar, foi adicionado a prata (424,6 mg para uma concentração final de 25mM). A solução foi retirada do aquecimento logo em seguida. Para purificação, foi realizada a centrifugação e retirado o sobrenadante. As partículas foram redispersadas em água deionizada, a análise do tamanho foi realizada em DLS (dynamic light scattering) e se verificou um tamanho de 12,4 nm.

Além dessa metodologia, a que envolve a meglumina como agente redutor está sendo trabalhada, foi testada algumas concentrações de meglumina em meio aquoso e logo em seguida adicionado o nitrato de prata (como na metodologia acima). Porém o resultado é insatisfatório, a meglumina reduz muito rapidamente a prata, o que leva a um fenômeno de nucleação e crescimento muito rápido da partida, obtendo assim uma macropartícula (TAK et al., 2015).

Para tentar contornar este problema com a meglumina reduzindo rápido demais, foi testado com titulometria de uma solução de meglumina sobre uma solução de nitrato de prata e o resultado aparenta estar melhor, houve diminuição da agregação, porém espera-se obter uma partícula na faixa de 10-20 nm como a descrita na literatura. A literatura aponta também que polímeros em solução ajudam a controlar o crescimento das partículas, por isso também está sendo testado com os supra-anfifílicos no meio, porém até agora não se obteve resultado satisfatório. Como a meglumina é um agente redutor muito forte, essa nucleação acontece de forma muito abrupta, levando a um crescimento exacerbado da partícula. A Figura 15 ilustra o precitado obtido pelo método da literatura e o nucleado testado pela redução com meglumina.

Figura 15 - Ilustração do obtido das sínteses de nanopartícula de prata, a esquerda o grupo controle (precipitado por centrifugação) e a direita com meglumina como redutora



Fonte: Autor

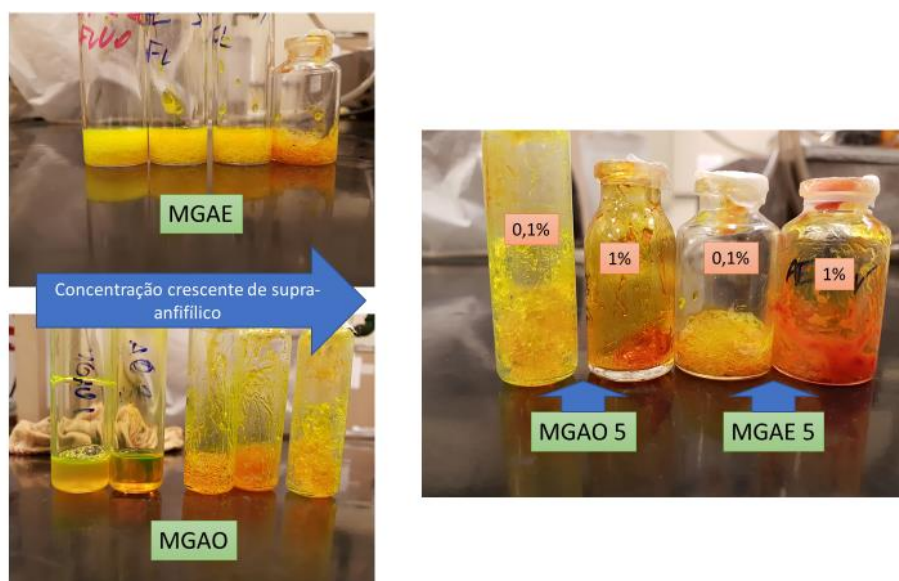
### 5.7 Incorporação e Característica macroscópica do sistema.

O teste de incorporação foi feito em diversas concentrações para se observar como a fluoresceína, que é um marcador solúvel em água, responderia a diversas concentrações do sistema. Adicionalmente, foi testada uma concentração maior de marcador para se observar como o sistema respondia, visto que a taxa de liberação de fármaco é alterada pela concentração do mesmo em uma forma farmacêutica.

A quantidade de 0,1% (m/m) foi delineada esperando-se observar o marcador em uma concentração baixa na matriz (AL-LAWATI; BINKHATHLAN; LAVASANIFAR, 2019). Além disso, a técnica de fluorescência, na qual se propõe utilizar como método analítico, é uma técnica extremamente sensível, capaz de detectar nanogramas de composto, por isso se precisa trabalhar numa faixa menor para não ocorrer extrapolação do máximo de quantificado, ou seja, se manter na faixa de trabalho linear na curva de calibração (RIBANI et al., 2004). Pode-se notar uma diferença acentuada de cor de 0,1% para 1%, isso será explorado tanto na MLP quanto no DSC, e que revelou uma alteração estrutural importante do sistema.

Para a incorporação das nanopartículas, foi estudado os artigos da literatura para ver quais as concentrações inibitórias mínimas (MIC) para nanopartículas de prata de tamanho na faixa de 10-20 nm (o tamanho afeta a MIC). Foi visto em 10 mM é capaz de inibir cepas de *E. Coli* e *Staphylococcus Aureus*, bactérias da microbiota e responsável por diversas doenças como em feridas. Logo se estipulou 50 mM de prata para o sistema de liberação, a prata incorporada está dispersa na fase aquosa antes de ser incorporado o supra-anfifílico ao sistema (BURDUŞEL et al., 2018; TAK et al., 2015). A mistura foi feita por espatulação. A Figura 16 mostra os sistemas obtidos com fluoresceína.

Figura 16 - Ilustração de cada formulação contendo o marcador. A esquerda, o sistema MGAE das formulações 2 a 5 e no MGAO de 1 a 5, todas com 0,1% de fluoresceína; à direita, em 0,1% e 1% de fluoresceína.

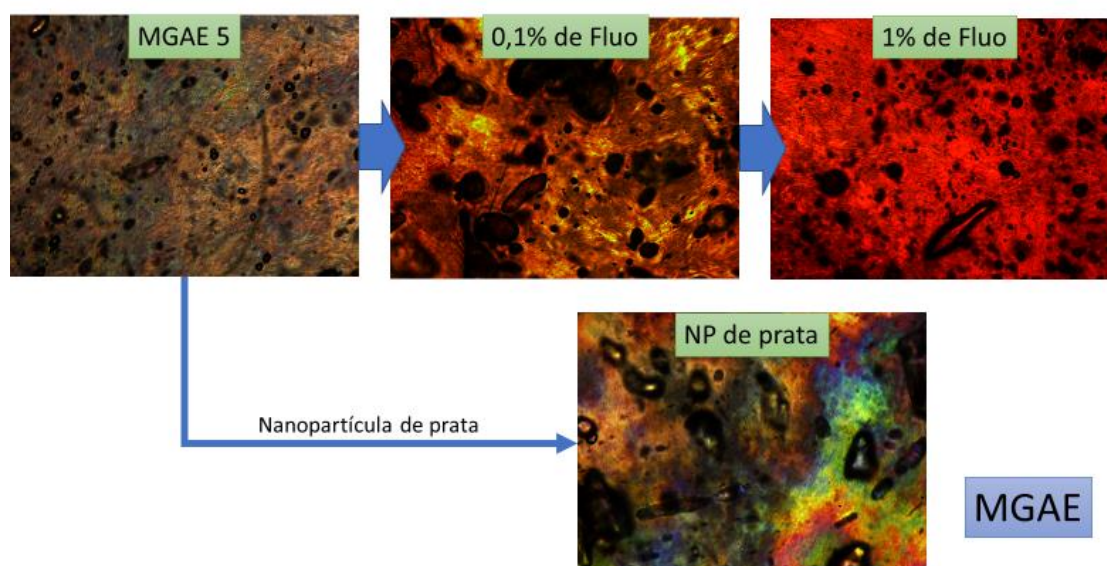


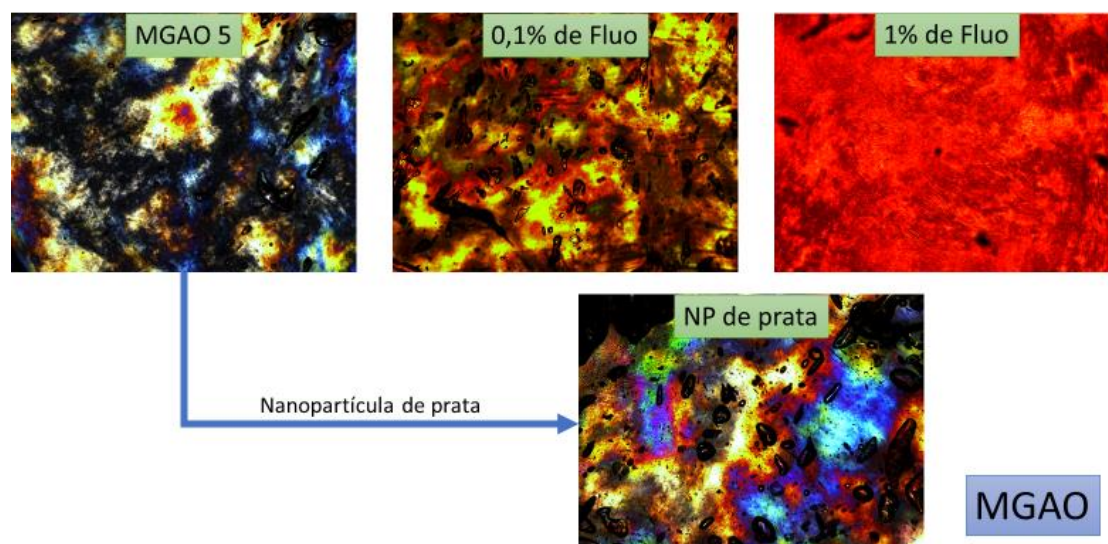
Fonte: Autor

### 5.8 Microscopia de luz polarizada – com e sem Marcador/ NP

O marcador foi incorporado em 2 concentração: 0,1% e 1% (m/m) no sistema. Observou-se ambos mantiveram a mesofase hexagonal e que o marcador está totalmente disperso no sistema, pois não há visualização de cristais de marcador. A Figura 17 demonstra as imagens obtidas pela microscopia.

Figura 17 - Imagens da microscopia de luz polarizada do sistema sem incorporar ativos, com a nanopartícula de prata e com a fluoresceína nas concentrações de 0,1% e 1%





Fonte: Autor

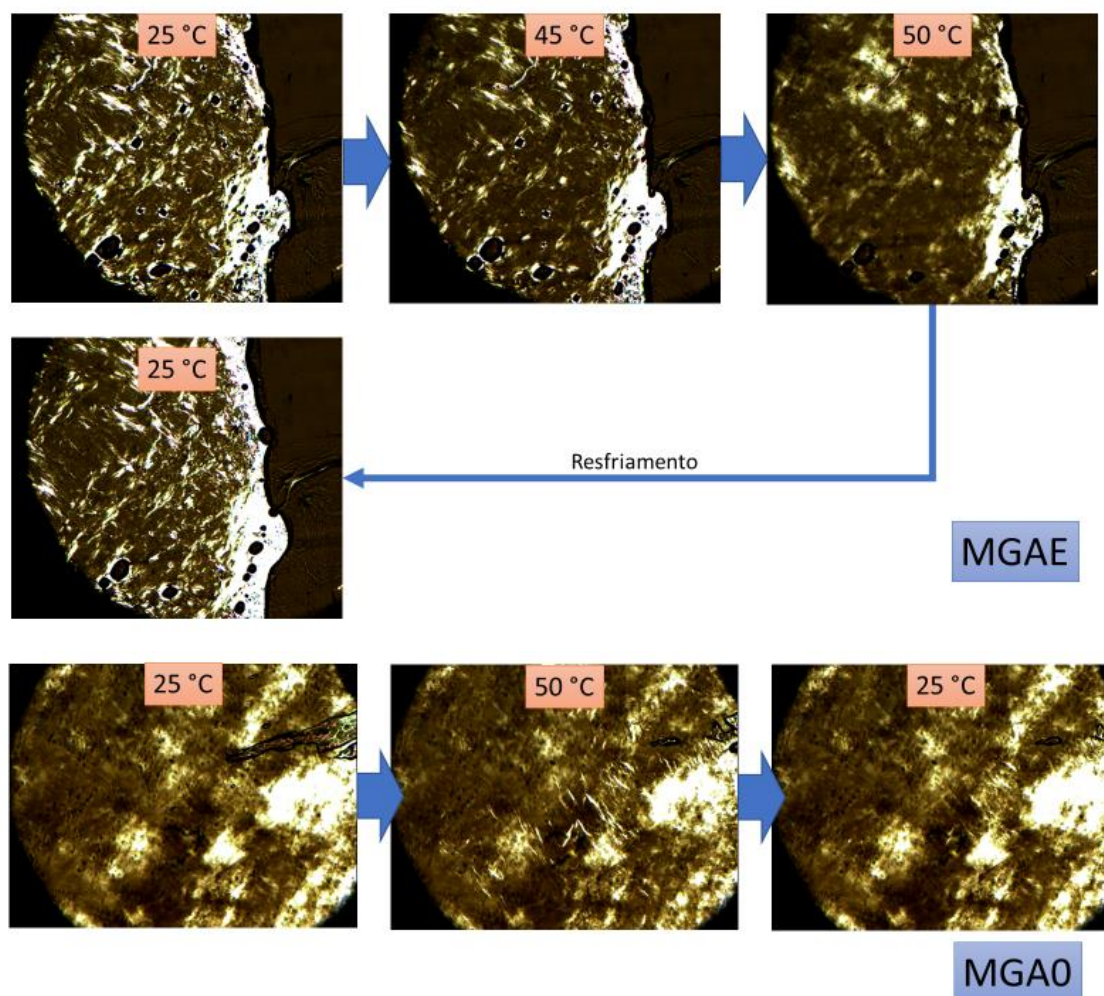
A diferença visualizada foi que as estrias de ambos os sistemas aparentaram estar mais condensadas, como se tivesse ocorrido um maior empacotamento devido a maior concentração de fluoresceína no sistema de liberação. Essa diferença será melhor explorada e explicada com as curvas DSC.

A adição das AgNP ao sistema não causou nenhuma alteração estrutural a ele. As AgNP têm caráter hidrofílico, logo espera-se uma maior afinidade pela porção hidrofílica do sistema. Além disso, o tamanho nanométrico e a baixa concentração no sistema contribuem para poucas mudanças estruturais. Como visto no marcador, a contração é dependente de mudanças estruturais importante, no caso da AgNP é mais do que suficiente a concentração atual (KIM et al., 2015).

## 5.9 Microscopia de luz polarizada - Hot stage

Ambos sistemas de liberação apresentam mesofases hexagonais, porém o sistema MGAE tem a particularidade da transição-sol. Para uma análise mais minuciosa desse fenômeno foi utilizado o hot stage, que consiste no aquecimento acoplado ao microscópio de luz polarizada e possibilita visualizar e analisar o que acontece com a organização do cristal-liquido especificamente após a transição de fase (Diogo e Moura Ramos, 2014). A amostra foi aquecida de 25 °C a 50°C em taxa constante de 1 °C.min<sup>-1</sup> e resfriado sem controlar a taxa de resfriamento. A Figura 18 ilustra as imagens obtidas pela microscopia

Figura 18 - Imagens de microscopia de luz polarizada acoplada a hot stage, ilustrando a transição de fase do MGAE e o gel MGAO

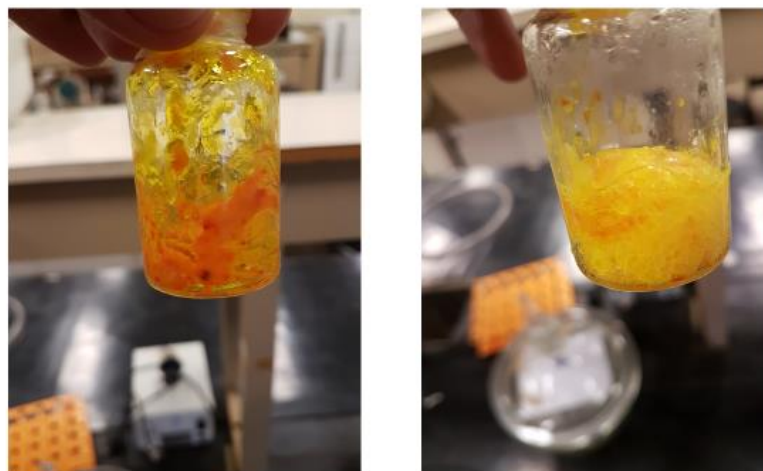


Fonte: Autor

Como pode-se observar na Figura 18, o sistema à temperatura de 25°C se apresenta com estrias bem definidas, caracterizando a mesofase hexagonal. Em 45°C as estrias começam a se desfazer e aos poucos começam a aparecer cruces de malta, essa transição lentamente até 50°C. O resfriamento não é possível ser feito a taxa controlada. Observou-se que o sistema volta a reestruturar em mesofase hexagonal, as estrias aparecem do mesmo modo como antes do aquecimento. A estruturação do MGAE é dependente da temperatura, isso é importante pois pode se pensar em diversas aplicabilidades em função disso, como liberação em função da transição. O sistema MGAO não apresentou nenhuma alteração (JEONG; KIM; BAE, 2012; OWENS et al., 2016).

A microscopia demonstra o comportamento do gel termoreversível do smartgel. Esse comportamento termoresponsivo será explorado na liberação e permeação. Os testes serão feitos em temperaturas anterior e posterior a transição gel-sol para verificar se há mudança nas taxas de liberação (GIULBUDAGIAN et al., 2016; NEGRINI; MEZZENGA, 2011). A Figura 19 ilustra macroscopicamente esse sistema incorporado, notando a mudança de cor quando o material se liquefaz, essa diferença ainda será explorada.

Figura 19: Característica macroscópica do polímero MGAE incorporado com fluoresceína antes (esquerda) e depois (direita) da transição gel-sol



Fonte: Autor

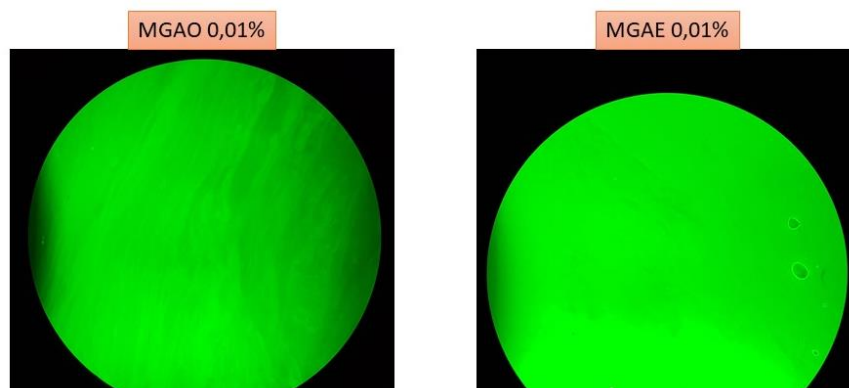
### 5.10 Microscopia de fluorescência

Tendo em vista todo potencial do marcador fluorescente, foi realizado a microscopia de fluorescência para analisar como a fluoresceína se dispõe na matriz, se ela tem uma maior afinidade pelos bolsões lipofílicos ou pelos bolsões hidrofílicos (MAIONE-SILVA et al., 2019; RABINOW, 2004).

Foi realizado este teste em 3 concentrações: 1%; 0,1% e 0,01%. As duas concentrações mais altas não foram passíveis de uma boa visualização, isso ocorre devido a altíssima sensibilidade da fluoresceína, que em presença da excitação emite muita luz, ofuscando o visualizador. Na concentração de 0,01% é possível ver as estrias do sistema, sugerindo que a fluoresceína permanece nas partes hidrofílica. Isso é estipulado pelo marcador, ou seja, a cor verde, estar intensa fora das lamelas, que são a porção lipofílica do sistema. (YAN et al., 2017). A figura 20 mostra a imagem obtida.

Além disso, a microscopia será usada numa etapa posterior do trabalho, após a permeação se pretende fazer um corte histológico na pele e fazer uma leitura de fluorescência, para se observar como a passagem do marcador está se dando pela pele (CANCEL; TARBELL; BEN-JEBRIA, 2004).

Figura 20 - Imagens de fluorescência do MGAO (esquerda) e do MGAE (direita), ambos em concentração 0,01% (m/m)



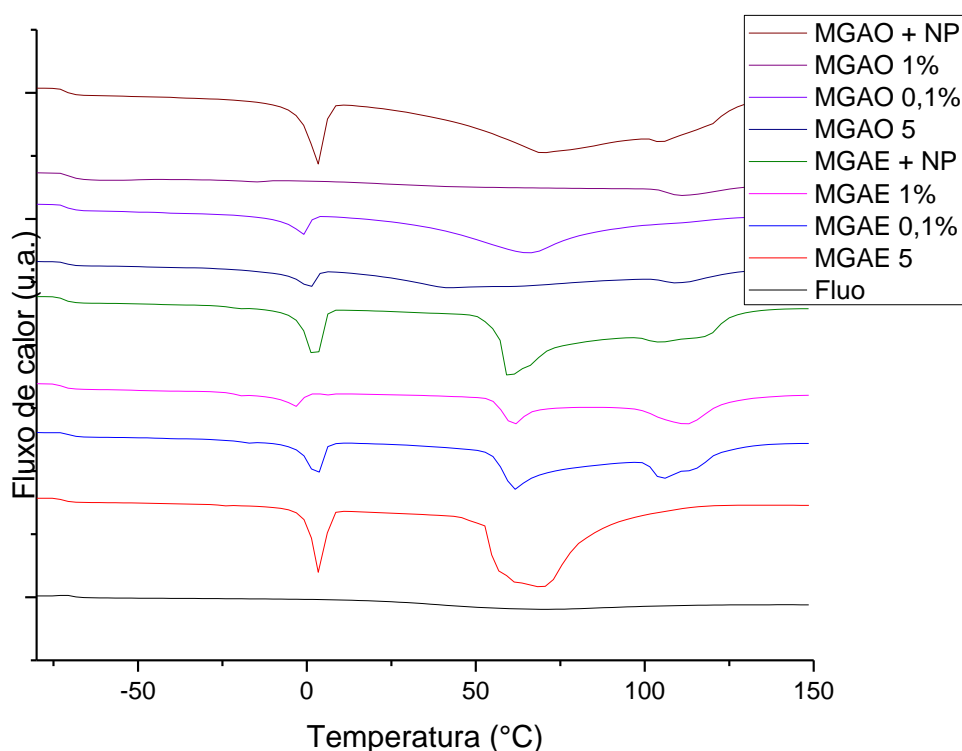
Fonte: Autor

### 5.11 Calorimetria exploratória diferencial - DSC

O sistema MGAE tem duas transições de fundamental importância a ser analisada: a transição vítrea e a transição gel-sol. A transição vítrea compreende o gel ir do estado rígido para um estado onde as ligações supramoleculares estão mais relaxadas (estados borrachoso), sendo este um comportamento típico de materiais poliméricos. A transição gel-sol é uma transição de fase do material do estado gel para o estado sol, um estado menos organizado e com maior fluidez (ARAFÁ; EL-KASED; ELMAZAR, 2018; SAHOO et al., 2013; TOURNIER, 2012).

No sistema MGAO como não ocorre nenhum tipo de transição de fase, isso se deve as características intrínsecas do sistema. Enquanto que o MGAE é um sistema com características poliméricas, o MGAO apresenta um comportamento típico de um gel. A Figura 21 ilustra as curvas obtidas nos experimentos.

Figura 21: Curvas DSC obtidas demonstrando o marcador puro, o sistema de liberação e incorporação com 0,1% e 1% de fluoresceína e nanopartículas de prata.



Fonte: Autor

A incorporação de marcador na concentração de 1% demonstrou um resultado peculiar. O evento de congelamento e fusão da água não apareceu. Isso leva a crer que a fluoresceína em uma maior concentração leva a estruturar totalmente a água no sistema. Este fenômeno é observado em ambos sistemas, pois uma fração muito pequena de água que chega a fundir. Isso também pode ser visto na microscopia pelo arranjo mais denso das lamelas. A concentração de marcador alterou as propriedades físico-química do sistema, levando a um novo arranjo supramolecular onde a água está totalmente ordenada e presa ao gel (KIM et al., 2015).

A incorporação das nanopartículas de prata teve pouca influência no sistema de liberação. Pode-se notar que tanto a quantidade de água livre de ambos sistemas e nem as transições de fase tiveram alteração expressiva na temperatura em qual ocorrem. Isso sugere que o gel consegue comportar tais moléculas sem demais alterações estruturais, fator que pode ser atribuído a hidrofília, tamanho e concentração das partículas, que levam ela a ter tropismo pela fase aquosa do sistema, permitindo-as comportar-se na fase aquosa sem alterações estruturais no cristal-líquido (MATTIA; OTTO, 2015).

## 5.12 Reologia

### 5.12.1 Análise reológica contínua

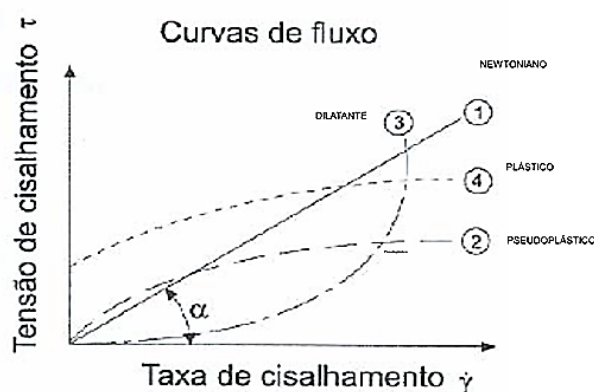
A reologia é a técnica de escolha quando se busca valores quantitativos para descrever a resistência ao fluxo (viscosidade). Essa técnica é amplamente utilizada para sistemas de liberação, em especial sistemas de uso tópico, pois fornece parâmetros importantes de estruturação e características físico-químicas do mesmo. Tais parâmetros podem ajudar a prever e o melhor entendimento da liberação e permeação de fármacos (ZHANG et al., 2008).

Para os sistemas foi utilizado um dispositivo de placas paralelas com diâmetro igual a 20 mm e espaçamento entre as placas de 1000  $\mu\text{m}$  foi utilizado. A temperatura foi mantida constante, a  $25 \pm 0,5$  °C com o auxílio de um dispositivo “Peltier”. Todas as amostras foram mantidas em repouso por 3 minutos antes de iniciar as medidas. As propriedades reológicas destes sistemas foram avaliadas por ensaios de escoamento e solicitações oscilatórias (CHAN et al., 2017).

Para a caracterização de géis supramoleculares dois experimentos reológicos comuns são geralmente realizados: (1) a resposta linear do módulo ( $G'$  e  $G''$ ) a uma pequena amplitude fixa de “stress”, variando a frequência e (2) o comportamento não linear do módulo a uma frequência fixa, variando-se a tensão de cisalhamento. Nas medidas reológicas se obtém os parâmetros do módulo de armazenamento ( $G'$ ) e módulo de perda ( $G''$ ) em uma faixa de frequência ampla (incluindo baixas frequências) dentro da região viscoelástica linear. A força mecânica do gel é relacionada às magnitudes absolutas dos módulos e à razão  $G'/G''$  (DE KRETZER; BOGER; SCALES, 2003; FAN; LIU; WANG, 2016).

A relação entre a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento prediz o comportamento de fluxo de amostra. A viscosidade pode aumentar, diminuir ou se manter constante durante a aplicação de força e pode haver uma força inicial para amostra começar a fluir. Tais parâmetros são importantes para aplicação, como o espalhamento da amostra, e para liberação, que tende a sair de uma matriz que está menos organizada (KIM; MASON, 2017; ZHANG et al., 2008). A Figura 22 ilustra os tipos de comportamentos que podem ser observados a partir de uma reologia de fluxo.

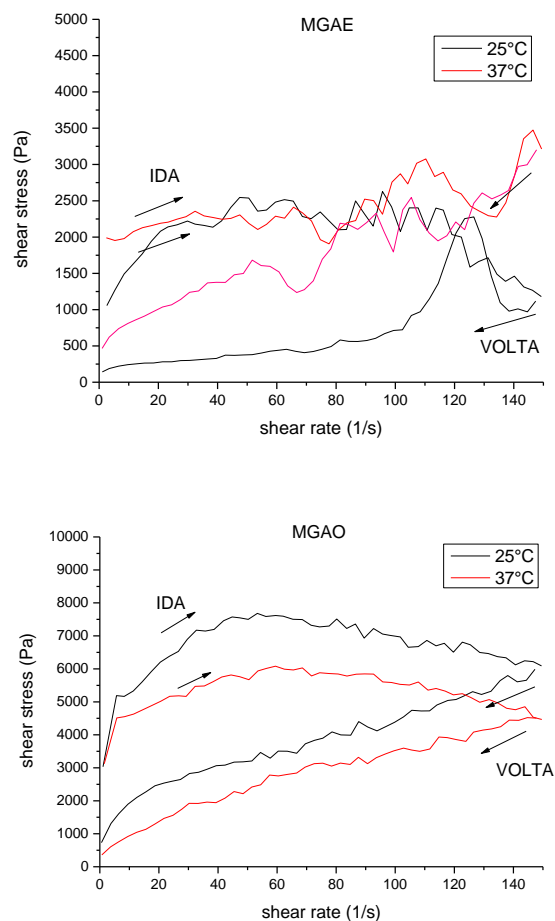
Figura 22: Ilustração do ensaio reológico de fluxo.



Fonte: Adaptado de Viana (s.n.t).

O ensaio de fluxo foi feito em 2 temperaturas, 25°C, que simula a temperatura ambiente e 37°C que simula a temperatura corporal. Estipulou-se essas 2 temperaturas pensando na aplicação biológica e se o sistema não poderia ter alguma variação que pudesse ser interessante. A Figura 23 ilustra os resultados obtidos por reologia.

Figura 23 - Curvas de reologia de fluxo, indicando na imagem quais as curvas de ida e volta.



Fonte: Autor

No sistema MGAO, pode-se observar que em ambas as temperaturas exibe o comportamento plástico e tixotropia. É necessária uma força inicial para ocorrer o escoamento, e em seguida a viscosidade cai exponencialmente. Na curva de volta, que é o relaxamento, pode-se notar que ela ocorre abaixo da ida, caracterizando como um material tixotrópico, pois demora um tempo finito para alcançar uma viscosidade de equilíbrio quando ocorre uma mudança instantânea no ritmo do cisalhamento (CARVALHO et al., 2013; KIM; MASON, 2017).

O MGAE também é material plástico e tixotrópico e o mesmo dito ao MGAO vale a ele. Porém, nota-se que ele necessita de menos tensão para o cisalhamento, isso sugere que o sistema MGAO é mais ordenado pois demora mais a ruptura do sistema (LUCERO et al., 2016).

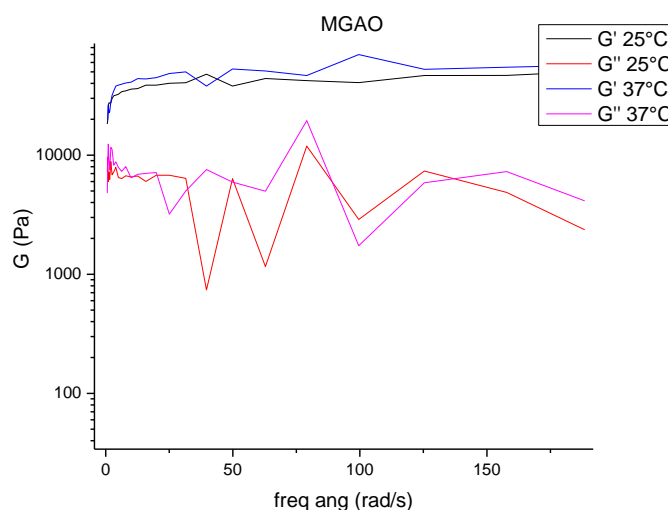
### 5.12.2 Análise reológica oscilatória

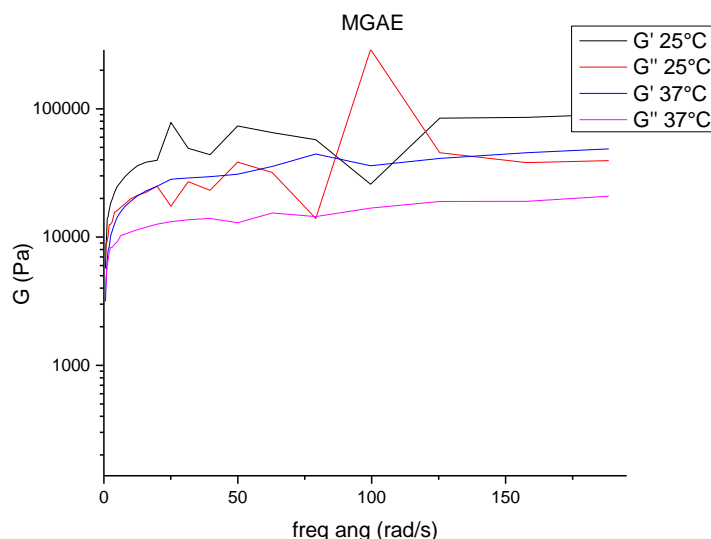
Nas medidas de reologia oscilatória, uma torção sinoidal é aplicada a uma amostra e a resposta mecânica é então medida em função da frequência oscilatória ou em função da temperatura. Em um sólido puro a maior resposta torcional é observada quanto maior for a força aplicada por unidade de área. Assim, nestes sistemas a energia aplicada é usada para garantir a recuperação instantânea do próprio sistema ao final do “stress” (força por unidade de área – Pa) aplicado. Ao contrário, em um líquido Newtoniano a energia aplicada não é armazenada, mas sim dissipada como calor no processo de escoamento. Os materiais viscoelásticos possuem características intermediárias aos sólidos e líquidos (HELGESON, 2016).

Na análise oscilatória, o modulo de armazenamento ou elástico é representado por  $G'$ , um modulo  $G'$  elevado refere-se a um sistema altamente estruturado e com predominância do comportamento elástico (tendência a sólido hookeano). A componente  $G''$  se refere ao modulo de perda, que é a energia dissipada ao aplicar uma tensão (refere-se a tendência da amostra em se comportar como um fluido newtoniano).

As preparações semi-sólidas, como no caso de géis e emulsões, tem um caráter intermediário, assim os valores obtidos de  $G'$  e  $G''$  podem ser utilizados para se prever o comportamento dos sistemas de liberação (BARNES; GENTLE, 2011). A Figura 24 mostra as curvas obtidas para ambos sistemas.

Figura 24 - Ensaio de reologia oscilatória





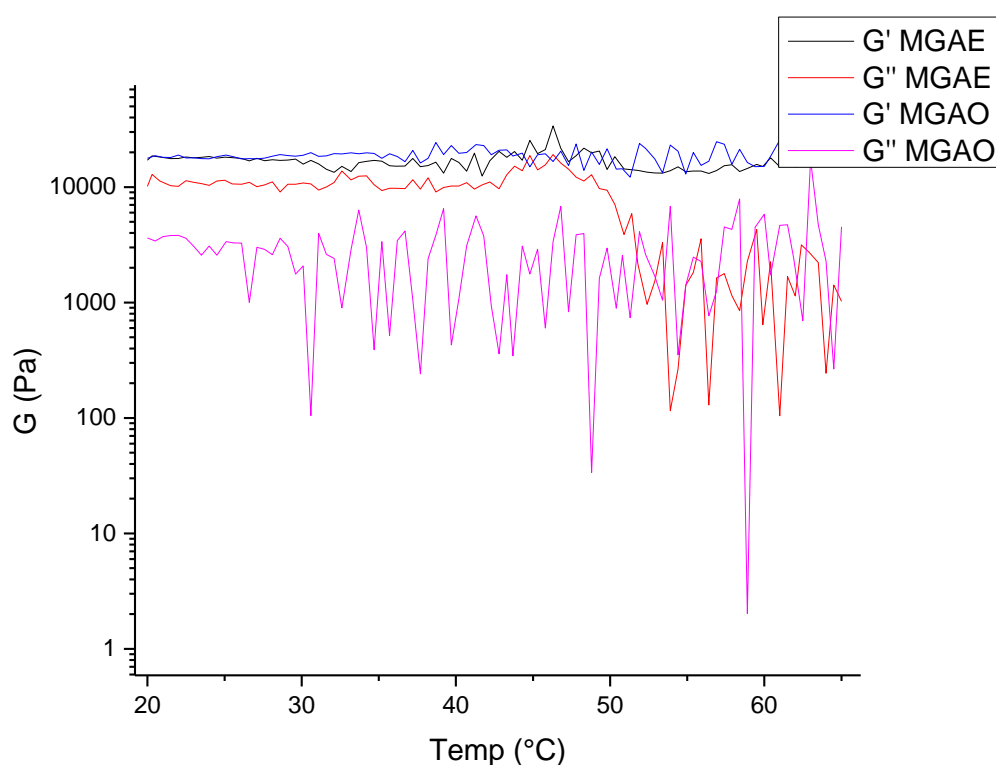
Fonte: Autor

A varredura de frequência demonstra que em ambos os materiais há características mais elásticas do que viscosas, devido aos valores de  $G''$  serem inferiores aos de  $G'$ . Isso é algo desejável a aplicações de uso tópico, em especial na pele, pois facilitaria a aplicação e espalhamento da formulação. Além disso, corrobora com o comportamento típico de um gel ( $G' > G''$ ) e para indicar que é um sistema altamente estruturado (BARNES; GENTLE, 2011; DE KRETZER; BOGER; SCALES, 2003).

Outro fator é a relação  $G'/G''$  aumenta proporcionalmente à frequência, o que também indica estruturação do sistema. Ocorre uma tendência na estruturação maior do sistema com o aumento da frequência, é possível que ao aplicar uma força sobre o material, como por exemplo, o ato de espalhamento de uma formulação na pele, compense esse efeito da diluição, garantindo que a formulação permaneça então no local de ação e evite ser rapidamente escoada (CHAN et al., 2017; FAN; LIU; WANG, 2016).

Além disso, foi realizada um ensaio em função da temperatura, justamente para monitorar a transição gel-sol do sistema MGAE e o comportamento do MGAO. A Figura 25 mostra as curvas obtidas

Figura 25 - Ensaio de reologia oscilatória em função da temperatura.



Fonte: Autor

É possível observar que o MGAE tem a transição gel-sol em aproximadamente 48°C, o que condiz com os resultados obtidos de microscopia hot stage e DSC, ao passo que o MGAO não muda seu comportamento em função da temperatura. Nota-se que a componente  $G''$  cai expressivamente, devido a transição ao estado sol, nesse momento o “gap” entre os 2 módulos se torna grande e ocorre a desestruturação do sistema de liberação. Em ambas as curvas o módulo predominante foi o  $G'$ , sugerindo o comportamento de armazenamento, ou seja, o comportamento elástico do sistema é dominante (CARVALHO et al., 2013; KIM; MASON, 2017).

## 6 Conclusões:

Os resultados mostram que o tipo de ácido graxo utilizado como precursor afeta diretamente estrutura supramolecular e as características físico-químicas do sistema de liberação. Observou-se que ambos materiais são capazes de se estruturar em um cristal-líquido em meio aquoso de mesofase hexagonal, além disso, o sistema MGAE forma estrias numa concentração menor que o MGAO, mostrando que saturação favorece a organização das lamelas. O estudo de DSC mostrou que os análogos tem comportamento bem distinto, ao passo que o MGAE tem o comportamento de um polímero – por ocorrer transição vítrea e transição gel-sol – o sistema MGAO não apresenta nenhum evento além da fusão da água. Isso demonstra como a torção na cadeia do ácido insaturado altera as propriedades químicas. A transição de fase ocorre por rompimento de ligações de hidrogênio, como ela não ocorre isso sugere que a torção dificultando

arranjo lado-a-lado das cadeias do tensoativo. Também foi analisado o percentual de água ligada em cada formulação. Além disso, no DSC foi observado que a concentração de água afeta as transições de fase, quanto mais água, menor é a temperatura de transição, indicando maior facilidade de romper as ligações de hidrogênio. O estudo de bioadesão mostrou que as amostras são altamente bioadesivas (comparado com valores de literatura) e que o máximo de bioadesão ocorre na formulação nas formulações MGAO 4 e MGAE 5 e que pode estar relacionado com o percentual de água ligada. A partir desses estudos, foram propostas as formulações para MGAO 5 e MGAE 5 para continuação dos estudos de incorporações dos agentes orgânicos e inorgânicos.

No escopo de síntese das nanopartículas de prata, a síntese segundo metodologia da literatura se mostrou reprodutível. A síntese que proposta utilizando meglumina como agente redutor mostrou agragação, isso ocorre pela meglumina reduzir muito rápido e fortemente a prata para prata coloidal.

A incorporação da fluoresceína se deu em 2 concentrações: 0,1% e 1%. A incorporação de prata foi em 10 mM. Os estudos de microscopia de luz polarizada não mostram alterações na matriz na concentração de 0,1% de fluoresceína e com a AgNP, porém em 1% de marcador as estrias aparentam estar bem mais próximas umas das outras. No estudo de DSC, a concentração 0,1% de fluoresceína e a AgNP também não fizeram nenhuma modificação na matriz, demonstrado pela quantia de água livre que não foi alterado na incorporação de ambos. Porém, na concentração de 1% a fluoresceína mostrou uma elevada estruturação da água na formulação, reduzindo o percentual de água livre. Isso sugere que a fluoresceína em alta concentração faz a água pertencer a estrutura do material, fazendo assim uma nova estrutura, que tem pouca água de solvatação (água livre).

O resultado é promissor no sentido de propor um avanço aos sistemas de liberação de fármacos, entendendo como um arranjo hierárquico, característico de sistemas nanoestruturados e liquido-cristalinos, afetam nas propriedades físico-químicas e sua consequente resposta com o organismo.

## 7 REFERÊNCIAS

ACERBI, F. et al. Fluorescein-guided surgery for malignant gliomas: a review. **Neurosurgical review**, v. 37, n. 4, p. 547–557, 2014.

AL-LAWATI, H.; BINKHATHLAN, Z.; LAVASANIFAR, A. Nanomedicine for the effective and safe delivery of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review of preclinical research. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 2019.

AMOABEDINY, G. et al. Overview of preparation methods of polymeric and lipid-based (niosome, solid lipid, liposome) nanoparticles: A comprehensive review. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 67, n. 6, p. 383–400, 13 abr. 2018.

AONO, M.; ARIGA, K. The Way to Nanoarchitectonics and the Way of Nanoarchitectonics. **Advanced Materials**, v. 28, n. 6, p. 989–992, 1 fev. 2016.

ARAFI, M. G.; EL-KASED, R. F.; ELMAZAR, M. M. Thermoresponsive gels containing gold nanoparticles as smart antibacterial and wound healing agents. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 13674, 2018.

ARIGA, K. et al. Nanoarchitectonics: a new materials horizon for nanotechnology. **Materials Horizons**, v. 2, n. 4, p. 406–413, 22 jun. 2015.

ARIGA, K. et al. Nanoarchitectonics for Dynamic Functional Materials from Atomic-/Molecular-Level Manipulation to Macroscopic Action. **Advanced Materials**, v. 28, n. 6, p. 1251–1286, 1 fev. 2016.

ARRUEBO, M. et al. Magnetic nanoparticles for drug delivery. **Nano Today**, v. 2, n. 3, p. 22–32, 1 jun. 2007.

ASHARANI, P. V et al. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. **Nanotechnology**, v. 19, n. 25, p. 255102, 25 jun. 2008.

BARNES, G.; GENTLE, I. **Interfacial science: an introduction**. [s.l.] Oxford university press, 2011.

BASTÚS, N. G. et al. Synthesis of highly monodisperse citrate-stabilized silver nanoparticles of up to 200 nm: kinetic control and catalytic properties. **Chemistry of Materials**, v. 26, n. 9, p. 2836–2846, 2014.

BOATENG, J. S. et al. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892–2923, 1 ago. 2008.

BURDUŞEL, A.-C. et al. Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. **Nanomaterials**, v. 8, n. 9, p. 681, 31 ago. 2018.

CANCEL, L. M.; TARBELL, J. M.; BEN-JEBRIA, A. Fluorescein permeability and electrical resistance of human skin during low frequency ultrasound application. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 56, n. 9, p. 1109–1118, 2004.

CARVALHO, F. C. et al. Nasal administration of liquid crystal precursor mucoadhesive vehicle as an alternative antiretroviral therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 1, p. 219–227, 1 maio 2013.

CASSIMIRO, D. L. et al. Structural aspects, thermal behavior, and stability of a self-assembled supramolecular polymer derived from flunixin–meglumine supramolecular adducts. **Thermochimica Acta**, v. 529, p. 59–67, 10 fev. 2012.

CASSIMIRO, D. L. et al. On the influence of fatty acid chain unsaturation on supramolecular gelation of aminocarbohydrate-based supra-amphiphiles. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 134, n. 3, p. 1599–1609, 14 dez. 2018.

ČERNÝ, J.; HOBZA, P. Non-covalent interactions in biomacromolecules. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 9, n. 39, p. 5291–5303, 2007.

CHADHA, R.; BHANDARI, S. Drug–excipient compatibility screening—Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 82–97, jan. 2014.

CHAN, S. Y. et al. Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. **Carbohydrate Polymers**, v. 161, p. 118–139, 1 abr. 2017.

CHILKOTI, A. et al. Targeted drug delivery by thermally responsive polymers. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54, n. 5, p. 613–630, 2002.

CHIN, J. S. et al. Drug therapies and delivery mechanisms to treat perturbed skin wound healing. **Advanced drug delivery reviews**, 2019.

CLARK, L.; LIGHTFOOT, P. All in a spin. **Nature Chemistry**, v. 8, p. 402, 22 abr. 2016.

COOPER, E. R. Increased skin permeability for lipophilic molecules. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, n. 8, p. 1153–1156, 1984.

DANDURAND, J. et al. Water structure and elastin-like peptide aggregation. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, n. 1, p. 419–426, 2015.

DE KRETZER, R. G.; BOGER, D. V.; SCALES, P. J. Compressive rheology: an overview. **Rheology Reviews**, p. 125–166, 2003.

DEAN, K. M.; QIN, Y.; PALMER, A. E. Visualizing metal ions in cells: an overview of analytical techniques, approaches, and probes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 9, p. 1406–1415, 2012.

DOBSON, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. **Drug Development Research**, v. 67, n. 1, p. 55–60, 1 jan. 2006.

DRAELOS, Z. D. Cosmeceuticals for Male Skin. **Dermatologic Clinics**, v. 36, n. 1, p. 17–20, 1 jan. 2018.

DURÁN, N.; NAKAZATO, G.; SEABRA, A. B. Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 15, p. 6555–6570, 11 ago. 2016.

FAN, J.; LIU, F.; WANG, Z. Shear rheology and in-vitro release kinetic study of apigenin from lyotropic liquid crystal. **International journal of pharmaceutics**, v. 497, n. 1–2, p. 248–254, 2016.

FARJAMI, T.; MADADLOU, A. An overview on preparation of emulsion-filled gels and emulsion particulate gels. **Trends in Food Science & Technology**, 2019.

FERREIRA, L. M. B. et al. Structural and Thermal Behavior of Meglumine-Based Supra-Amphiphiles in Bulk and Assembled in Water. **Langmuir**, v. 32, n. 45, p. 11878–11887, 15 nov. 2016.

FONG, W.-K. et al. Responsive self-assembled nanostructured lipid systems for drug delivery and diagnostics. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 484, p. 320–339, dez. 2016.

GIULBUDAGIAN, M. et al. Correlation between the chemical composition of thermoresponsive nanogels and their interaction with the skin barrier. **Journal of Controlled Release**, v. 243, p. 323–332, 2016.

GONZALEZ, A. C. DE O. et al. Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, n. 5, p. 614–620, out. 2016.

GUPTA, R. et al. Effect of Chemical Permeation Enhancers on Skin Permeability: In silico screening using Molecular Dynamics simulations. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1456, 2019.

GUY, R. H. et al. Iontophoresis: electrorepulsion and electroosmosis. **Journal of controlled release**, v. 64, n. 1–3, p. 129–132, 2000.

HAINO, T. Molecular-recognition-directed formation of supramolecular polymers. **Polymer Journal**, v. 45, p. 363, 1 ago. 2012.

HAINO, T. Designer supramolecular polymers with specific molecular recognitions. **Polymer Journal**, v. 51, n. 3, p. 303–318, 2019.

HASSAN, B. et al. Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1095–1107, 1 abr. 2018.

HAWKINS, B. T.; EGLETON, R. D. Fluorescence imaging of blood–brain barrier disruption. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 151, n. 2, p. 262–267, 15 mar. 2006.

HELGESON, M. E. Colloidal behavior of nanoemulsions: Interactions, structure, and rheology. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 25, p. 39–50, 2016.

HONARI, G. Skin Structure and Function. In: **Sensitive Skin Syndrome, Second Edition**. [s.l.] CRC Press, 2017. p. 26–32.

JEONG, B.; KIM, S. W.; BAE, Y. H. Thermosensitive sol–gel reversible hydrogels. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 154–162, 1 dez. 2012.

JIA, Y. et al. The mechanism of skin lipids influencing skin status. **Journal of Dermatological Science**, v. 89, n. 2, p. 112–119, 1 fev. 2018.

KALE, S. N.; DEORE, S. L. Emulsion micro emulsion and nano emulsion: a review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 8, n. 1, p. 39, 2017.

KAPOOR, M. S. et al. Stable Liposome in Cosmetic Platforms for Transdermal Folic acid delivery for fortification and treatment of micronutrient deficiencies. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 16122, 2018.

KARKI, S. et al. Thin films as an emerging platform for drug delivery. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 5, p. 559–574, out. 2016.

KIM, D.-H. et al. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery: a review. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 45, n. 1, p. 1–11, 2015.

KIM, H. S. et al. Advanced drug delivery systems and artificial skin grafts for skin wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 31 dez. 2018.

KIM, H. S.; MASON, T. G. Advances and challenges in the rheology of concentrated emulsions and nanoemulsions. **Advances in colloid and interface science**, v. 247, p. 397–412, 2017.

LADEMANN, J. et al. Hair follicles as a target structure for nanoparticles. **Journal of Innovative Optical Health Sciences**, v. 8, n. 04, p. 1530004, 2015.

LEHN, J.-M. Supramolecular chemistry. **Science**, v. 260, n. 5115, p. 1762–1764, 1993.

LEHN, J.-M. From supramolecular chemistry towards constitutional dynamic chemistry and adaptive chemistry. **Chem. Soc. Rev.**, v. 36, n. 2, p. 151–160, 30 jan. 2007.

LEHN, J. Supramolecular chemistry—scope and perspectives molecules, supermolecules, and molecular devices (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 27, n. 1, p. 89–112, 1988.

LESMES, U. et al. Effects of long chain fatty acid unsaturation on the structure and controlled release properties of amylose complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 667–675, 2009.

LIANG, Y. et al. Synthesis and physicochemical properties of ester-bonded gemini pyrrolidinium surfactants and a comparison with single-tailed amphiphiles. **Journal of Molecular Liquids**, v. 280, p. 319–326, 15 abr. 2019.

LIU, Y.; WANG, Z.; ZHANG, X. Characterization of supramolecular polymers. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 18, p. 5922, 20 ago. 2012.

LUCERO, M. J. et al. Novel aqueous chitosan-based dispersions as efficient drug delivery systems for topical use. Rheological, textural and release studies. **Carbohydrate polymers**, v. 151, p. 692–699, 2016.

LUNDBORG, M. et al. Predicting drug permeability through skin using molecular dynamics simulation. **Journal of Controlled Release**, v. 283, p. 269–279, ago. 2018.

MAIONE-SILVA, L. et al. Ascorbic acid encapsulated into negatively charged liposomes exhibits increased skin permeation, retention and enhances collagen synthesis by fibroblasts. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 522, 2019.

MAKAI, M. et al. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. **International journal of pharmaceutics**, v. 256, n. 1–2, p. 95–107, 2003.

MANDAL, A.; CHAKRABARTY, D. Studies on mechanical, thermal, and barrier properties of carboxymethyl cellulose film highly filled with nanocellulose. **Journal of Thermoplastic Composite Materials**, p. 089270571877286, 23 maio 2018.

MARTIEL, I. et al. Oil and drug control the release rate from lyotropic liquid crystals. **Journal of controlled release**, v. 204, p. 78–84, 2015.

MARTIN, M. M.; LINDQVIST, L. The pH dependence of fluorescein fluorescence. **Journal of Luminescence**, v. 10, n. 6, p. 381–390, 1 jul. 1975.

MARWAH, H. et al. Permeation enhancer strategies in transdermal drug delivery. **Drug delivery**, v. 23, n. 2, p. 564–578, 2016.

MATTIA, E.; OTTO, S. Supramolecular systems chemistry. **Nature Nanotechnology**, v. 10, p. 111, 5 fev. 2015.

MCLAUGHLIN, J. R.; ABBOTT, N. L.; GUYMON, C. A. Responsive superabsorbent hydrogels via photopolymerization in lyotropic liquid crystal templates. **Polymer**, v. 142, p. 119–126, 25 abr. 2018.

MESHARAM, S. M. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using white sugar. **IET nanobiotechnology**, v. 7, n. 1, p. 28–32, 2013.

MEZEI, M. Liposomes and the skin. In: **Liposomes in drug delivery**. [s.l.] Routledge, 2017. p. 125–135.

MILLER, R.; AKSENEKO, E. V.; FAINERMAN, V. B. Dynamic interfacial tension of surfactant solutions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 247, p. 115–129, 1 set. 2017.

MITTAL, A. K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 2, p. 346–356, 2013.

MOHAMMED, M. et al. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, p. 53, 20 nov. 2017.

MOORE, T. C. et al. Molecular dynamics simulations of stratum corneum lipid mixtures: A multiscale perspective. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 498, n. 2, p. 313–318, 2018.

NEGRINI, R.; MEZZENGA, R. pH-responsive lyotropic liquid crystals for controlled drug delivery. **Langmuir**, v. 27, n. 9, p. 5296–5303, 2011.

NEL, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. **Nature materials**, v. 8, n. 7, p. 543, 2009.

NEMILOV, S. V. **Thermodynamic and kinetic aspects of the vitreous state**. [s.l.] CRC Press, 2018.

OGI, S. et al. Living supramolecular polymerization realized through a biomimetic approach. **Nature Chemistry**, v. 6, p. 188, 2 fev. 2014.

OSHIRO JUNIOR, J. A. et al. Development of cutaneous bioadhesive ureasil-polyether hybrid films. **International Journal of Polymer Science**, v. 2015, 2015.

OTTE, A. et al. The in vivo transformation and pharmacokinetic properties of a liquid crystalline drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 532, n. 1, p. 345–351, 30 out. 2017.

OTZEN, D. E. Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins: Same but different? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1859, n. 4, p. 639–649, 1 abr. 2017.

OWENS, G. J. et al. Sol–gel based materials for biomedical applications. **Progress in Materials Science**, v. 77, p. 1–79, 1 abr. 2016.

OYAFUSO, M. H. et al. Design and characterization of silicone and surfactant based systems for topical drug delivery. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 817–826, 2015.

PALMER, M.; HATLEY, H. The role of surfactants in wastewater treatment: Impact, removal and future techniques: A critical review. **Water Research**, v. 147, p. 60–72, 15 dez. 2018.

PARR, M. B.; PARR, E. L. Permeability of the Primary Decidual Zone in the Rat Uterus: Studies Using Fluorescein-labeled Proteins and Dextran<sup>1</sup>. **Biology of Reproduction**, v. 34, n. 2, p. 393–403, 1 mar. 1986.

PATEL, A. et al. Ocular drug delivery systems: an overview. **World journal of pharmacology**, v. 2, n. 2, p. 47, 2013.

PICHETH, G. F. et al. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review.

- International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 97–106, 1 nov. 2017.
- PING, Z. H. et al. States of water in different hydrophilic polymers—DSC and FTIR studies. **Polymer**, v. 42, n. 20, p. 8461–8467, 2001.
- PRABHU, S.; POULOSE, E. K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. **International Nano Letters**, v. 2, n. 1, p. 32, 29 dez. 2012.
- RABINOW, B. E. Nanosuspensions in drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 785, 1 set. 2004.
- RAI, B.; PRADIP. Modeling self-assembly of surfactants at interfaces. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 15, p. 84–94, 1 fev. 2017.
- RIBANI, M. et al. **VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS** *Quim. Nova*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://www.scielo.br/pdf/%0D/qn/v27n5/a17v27n5.pdf](http://www.scielo.br/pdf/qn/v27n5/a17v27n5.pdf)>. Acesso em: 11 jun. 2019.
- ROSTAMI, S.; MEHDINIA, A.; JABBARI, A. Seed-mediated grown silver nanoparticles as a colorimetric sensor for detection of ascorbic acid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 180, p. 204–210, 5 jun. 2017.
- RUMELHART, D. E. Schemata: The building blocks. **Theoretical issues in reading comprehension: Perspectives from cognitive psychology, linguistics, artificial intelligence and education**, v. 11, n. 1, p. 33–58, 2017.
- SAHOO, B. et al. Thermal and pH responsive polymer-tethered multifunctional magnetic nanoparticles for targeted delivery of anticancer drug. **ACS applied materials & interfaces**, v. 5, n. 9, p. 3884–3893, 2013.
- SEO, J.-E.; KIM, S.; KIM, B.-H. In vitro skin absorption tests of three types of parabens using a Franz diffusion cell. **Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology**, v. 27, n. 3, p. 320–325, 20 maio 2017a.
- SEO, J. E.; KIM, S.; KIM, B. H. In vitro skin absorption tests of three types of parabens using a Franz diffusion cell. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 27, n. 3, p. 320–325, 2017b.
- SIMON, A. et al. Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation. **International journal of pharmaceuticals**, v. 512, n. 1, p. 234–241, 2016.
- SJÖBACK, R.; NYGREN, J.; KUBISTA, M. Absorption and fluorescence properties of fluorescein. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 51, n. 6, p. L7–L21, 1995.
- SRINIVAS, S. P. et al. Corneal epithelial permeability to fluorescein in humans by a multi-drop method. **PLoS one**, v. 13, n. 6, p. e0198831, 2018.
- SUNDER, S. Relevant Topical Skin Care Products for Prevention and Treatment of Aging Skin. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, 22 maio 2019.
- TAK, Y. K. et al. Shape-Dependent Skin Penetration of Silver Nanoparticles: Does It Really Matter? **OPEN**. **Nature Publishing Group**, 2015.
- TAKEO, M.; LEE, W.; ITO, M. Wound healing and skin regeneration. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 1, p. a023267, 5 jan. 2015.

TALIK, P.; HUBICKA, U. The DSC approach to study non-freezing water contents of hydrated hydroxypropylcellulose (HPC). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 132, n. 1, p. 445–451, 2018.

TAMMELIN, T. et al. Correlation between cellulose thin film supramolecular structures and interactions with water. **Soft Matter**, v. 11, n. 21, p. 4273–4282, 20 maio 2015.

TOURNIER, R. F. Thermodynamic and kinetic origins of the vitreous transition. **Intermetallics**, v. 30, p. 104–110, 2012.

TRAN, Q. H.; LE, A.-T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 4, n. 3, p. 33001, 2013.

UCHIDA, T. et al. Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M™. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, p. 113–118, 2015.

VOGT, A. et al. Nanocarriers for drug delivery into and through the skin—do existing technologies match clinical challenges? **Journal of Controlled Release**, v. 242, p. 3–15, 2016.

WEBBER, M. J. et al. Supramolecular biomaterials. **Nature materials**, v. 15 Webber, n. 1, p. 13, 2016.

WEI, L. et al. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. **Drug discovery today**, v. 20, n. 5, p. 595–601, 2015.

YAN, F. et al. Fluorescein applications as fluorescent probes for the detection of analytes. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 97, p. 15–35, 2017.

YU, S.; YIN, Y.; LIU, J. Silver nanoparticles in the environment. **Environ. Sci.: Processes Impacts**, v. 15, n. 1, p. 78–92, 19 dez. 2013.

YUTANI, R. et al. Prominent efficiency in skin delivery of resveratrol by novel sucrose oleate microemulsion. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 46–55, 2016.

ZHANG, J. et al. Lyotropic liquid crystalline phases formed in ternary mixtures of 1-cetyl-3-methylimidazolium bromide/p-xylene/water: A SAXS, POM, and rheology study. **Journal of colloid and interface science**, v. 321, n. 1, p. 159–165, 2008.

ZOUBOULIS, C. C. et al. Esthetic aspects of skin aging, prevention, and local treatment. **Clinics in Dermatology**, abr. 2019.