

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE - UNICENTRO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

ROSANA LETÍCIA DA ROSA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
CONTENDO SILÍCIO**

**PONTA GROSSA
2018**

ROSANA LETÍCIA DA ROSA

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS
CONTENDO SILÍCIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Josiane de Fátima Padilha de Paula.

**PONTA GROSSA
2018**

Ficha Catalográfica

Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

R788	Rosa, Rosana Leticia da Desenvolvimento e avaliação de nanopartículas poliméricas contendo silício / Rosana Leticia da Rosa. Ponta Grossa, 2018. 74 f.; il. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa. Orientadora: Profa. Dra. Josiane de Fátima Padilha de Paula 1. Silicium P®. 2. Envelhecimento cutâneo. 3. Colágeno. 4. Permeabilidade. I. Paula, Josiane de Fátima Padilha de. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa- Mestrado em Ciências Farmacêuticas. III. T. CDD: 646.726
------	---

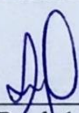
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS
APLICADAS À FARMÁCIA, NÚMERO DA ATA 01/2018, DA MESTRANDA ROSANA
LETÍCIA DA ROSA REALIZADO NO DIA 05 DE FEVEREIRO DE 2018, NA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

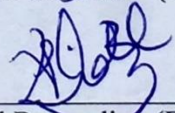
Aos cinco dias de fevereiro de dois mil e dezoito, às 9h00min no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Bloco M, sala 115, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência da Professora Doutora Josiane de Fátima Padilha de Paula, reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda Rosana Letícia da Rosa na linha de pesquisa: Desenvolvimento e Controle de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, constituído pelos demais Doutores (membros titulares): Patrícia Mathias Döll Boscardin (UEPG/PR) e Vanessa Jasinski (Faculdades Ponta Grossa). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e a candidata das normas que regem a defesa de dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título do trabalho foi: "DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO SILÍCIO." Encerrado a defesa, a banca pronunciou-se APROVADA a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. A aluna deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

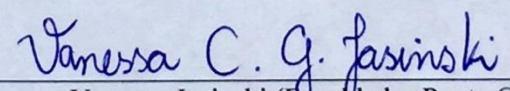
Observações (se necessário): CORRIGIR O TÍTULO DO TRABALHO

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____


Josiane de Fátima Padilha de Paula - (Defar - UEPG) - Presidente


Patrícia Mathias Döll Boscardin - (Defar - UEPG) - Titular


Vanessa Jasinski (Faculdades Ponta Grossa)

Ponta Grossa, 05 de fevereiro de 2018.

“Dedico esse trabalho aos meus pais,
os quais foram e são minha base.

AGRADECIMENTOS

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.” Charles Chaplin

Durante esses dois anos só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Houveram momentos de alegria, onde me permitiram acreditar na beleza da vida, e os momentos difíceis, serviram para meu crescimento pessoal. Muitas pessoas passaram por minha vida e só tenho a agradecer a cada uma delas, as quais foram imprescindíveis para a realização e conclusão desse trabalho.

Agradeço a Deus, que olhou por mim tantas vezes, durante o mestrado. Obrigada meu Deus por sempre estar ao meu lado, que mesmo nos dias que pensei em desistir me deu forças para continuar e alcançar esse meu sonho. Obrigada por colocar as pessoas certas no meu caminho, que sempre estiveram dispostas a me ajudar

Aos meus pais Elisabete da Rosa e Francisco da Rosa, que desde sempre estiveram ao meu lado, me ensinando o caminho certo, pela amizade e por me aturarem nos meus dias de mau humor e nervosismo, vocês foram o alicerce para eu chegar onde cheguei.

Ao meu irmão e minha cunhada por me aguentarem chorando e falando que não iria dar certo. Pelo apoio de sempre.

A minha vó e meus tios que sempre estiveram ao meu lado, dando uma palavra de apoio e pelas orações constantes, pedindo sempre a Deus e a Nossa Senhora Aparecida para que tudo desse certo.

Ao meu namorado Matheus pela paciência, por toda a ajuda, por passar finais de semana e feriados comigo na UEPG, mesmo querendo estar em casa assistindo ao futebol.

A minha querida orientadora Prof^a Dr^a Josiane de Fátima Padilha de Paula por todas as oportunidades que me deu durante esses anos, tanto no período de graduação como no mestrado, por ter me mostrado o caminho certo a seguir. Sempre estive me

apoando em tudo. Também pela amizade e cumplicidade, você mais do que ninguém sabe o quanto foi sofrido até chegar a conclusão desse trabalho. Por ter paciência e atender minhas ligações e responder minhas mensagens na madrugada, “Jô, Jô, Jô responde”.

A minha professora e amiga de sempre Prof^a Dr^a Patrícia Mathias Döll Boscardin, sem você eu não estaria aqui concluindo o mestrado, pois foi você quem me despertou esse amor por ministrar aulas. Sempre me deu muitas oportunidades e eu não poderia deixar nenhuma delas escapar. Agradeço pelos conselhos, pelas palavras de incentivo, essas muitas vezes fizeram com que eu me animasse novamente e não desistisse desse trabalho. Agradeço pela valiosa contribuição nesse e em todos os outros trabalhos que desenvolvi e também por participar como banca da qualificação e de defesa desta dissertação.

As técnicas do laboratório Mirian, Elizabete, Júlia e Luciane por sempre estarem dispostas a me ajudar em tudo que eu precisava no laboratório. Pelas risadas e pelos conselhos.

A minha amiga Bárbara por toda ajuda no trabalho, por sempre estar disposta a me ensinar. Pelas inúmeras contribuições durante o decorrer do trabalho. Pelas risadas no laboratório, que não foram poucas.

A minha amiga de mestrado Vanessa, você sabe o quanto foi sofrido concluir esse trabalho. Agradeço por todo o ensinamento, pelas ajudas e pelo companheirismo e cumplicidade durante esses dois anos.

Ao meu grande amigo Junior, que durante esses 7 anos sempre esteve presente me dando apoio. Pelos ensinamentos e por sempre estar animado e sorridente mesmo nas horas difíceis, falando que no final tudo dá certo, e deu.

Aos funcionários do LABMU que realizaram alguns testes desse trabalho.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos os que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento do presente trabalho, meu muito obrigada.

“O mundo está nas mãos daqueles que têm a coragem
de sonhar e de correr o risco de viver seus sonhos.”
Paulo Coelho

RESUMO

ROSA, Rosana Letícia da. Desenvolvimento e Avaliação de Nanopartículas Poliméricas de Silício. 2018. 74 f. Dissertação em Ciências Farmacêuticas- Farmácia. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2018.

A pele é um importante componente da beleza exterior, é o foco de muitos procedimentos cirúrgicos e não-cirúrgicos. Podem ocorrer alterações cutâneas associadas ao envelhecimento intrínseco ou extrínseco, como rugas, flacidez e alterações na pigmentação, isso faz com que as pessoas busquem por procedimentos cosméticos para melhorar a aparência da sua pele. Estudos demonstram a importância do silício orgânico na produção de colágeno tipo I. O presente trabalho objetivou estudar o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas de Silicium P[®]. As nanopartículas foram obtidas pela técnica de nanoprecipitação. Essas apresentaram diâmetro médio de 208,1 nm, índice de polidispersão de 0,225, potencial zeta de -31,5 e pH 5,61. Foi desenvolvido e validado um método analítico por espectroscopia de UV-VIS com a finalidade de permitir uma determinação confiável da eficiência de encapsulação e da permeação cutânea do fármaco. Esse método apresentou seletividade, linearidade, precisão e limites de detecção e quantificação satisfatórios. A eficiência de encapsulação foi de 96,9% $\pm$ 0,008. Também foi realizado o teste para avaliar a permeabilidade cutânea das nanopartículas poliméricas de Silicium P[®], onde em 48 horas a permeabilidade foi de 80,53%. Foi realizada a avaliação antimicrobiana das nanopartículas poliméricas. Nenhuma nanopartícula apresentou atividade antimicrobiana frente às cepas testadas, já o Silicium P[®] apresentou concentração inibitória mínima em 2,5 mg.mL⁻¹. As nanopartículas poliméricas de Silicium P[®], podem futuramente serem inseridas em cremes ou géis para uso tópico para produção de colágeno.

Palavras-chave: Silicium P[®]; Envelhecimento cutâneo; Colágeno; Permeabilidade.

ABSTRACT

ROSA, Rosana Letícia da. Development and Evalution of Polymeric Silicone Nanoparticle. 2018. 74 f. Dissertação em Ciências Farmacêuticas- Farmácia. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2018.

Skin is an important component of outer beauty, it is the focus of many surgical and non-surgical procedures. Skin changes associated with intrinsic or extrinsic aging, such as wrinkles, sagging and pigmentation changes, can cause people to look for cosmetic procedures to improve the appearance of their skin. Studies demonstrate the importance of organic silicon in the production of type I collagen. The present work aimed to study the development of Silicium P[®] polymer nanoparticles. The nanoparticles were obtained by the nanoprecipitation technique. These presented mean diameter of 208.1 nm, polydispersity index of 0.225, zeta potential of -31.5 and pH 5.61. An analytical method was developed and validated by UV-VIS spectroscopy in order to allow a reliable determination of the encapsulation efficiency and cutaneous permeation of the drug. This method presented selectivity, linearity, precision and limits of detection and quantification satisfactory. The encapsulation efficiency was 96.9% $\pm$ 0.008. The test was also carried out to evaluate the cutaneous permeability of Silicium P[®] polymer nanoparticles, where in 48 hours the permeability was 80.53%. Antimicrobial evaluation of polymer nanoparticles was performed. No nanoparticle showed antimicrobial activity against the strains tested, whereas Silicium P[®] showed minimal inhibitory concentration in 2.5 mg.mL⁻¹. Silicium P[®] polymer nanoparticles may be further inserted into creams or gels for topical use for the production of collagen.

Keywords: Silicium P[®]; Skin aging; Collagen; Permeability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema de penetração de substâncias pela via cutânea	20
Figura 2- Características da pele jovem, da pele envelhecida intrinsecamente e extrinsecamente	23
Figura 3- Envelhecimento cronológico da pele e a perda de seus constituintes. Decréscimo da quantidade de Si com o envelhecimento	25
Figura 4- Ligações do Silício orgânico com as estruturas da derme	26
Figura 5- Estrutura química do Silicium P®	27
Figura 6- Representação esquemática da organização de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.....	29
Figura 7- Célula de difusão vertical proposta por Franz, 1975	32
Figura 8- Desenvolvimento das nanopartículas.....	38
Figura 9- Diâmetro médio (DM) e Índice de Polidispersão (IPD) das formulações NP-1, NP-2, NP-3 e NP-4, respectivamente.....	46
Figura 10- Potencial Zeta (PZ) da solução de nanopartículas NP-1, NP-2, NP-3 e NP-4, respectivamente.....	47
Figura 11- Solução de nanopartículas de Silicium P®	48
Figura 12- NP-4, obtidas pela técnica de nanoprecipitação de um polímero pré-formado.	49
Figura 13- NP-4, obtidas pela técnica de nanoprecipitação de um polímero pré-formado	49
Figura 14- tamanho das nanoapartículas obtidas por nanoprecipitação de um polímero pré-formado. Imagem obtida no microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo (FEG). Tamanhos: 128,5; 146,07; 114,66; 114,68; 157,15; 120,04 nm	50
Figura 15- Espectros FTIR do polímero PCL, Silicium P®, NP-5 e NP-4, respectivamente.	51
Figura 16- Difratoograma de Raio X da PCL, NP-5 e NP-4, respectivamente	53
Figura 17- Scan da amostra de Silicium P®.....	57
Figura 18- Representação gráfica da curva analítica padrão para determinação do Silicium P® obtida por espectrofotometria UV-Vis (222 nm), em metanol	58
Figura 19- Espectro de absorção do UV-VIS das NP- 5.....	60
Figura 20- Espectro de absorção do UV-Vis das NP- 4	61

Figura 21- Porcentagem de permeação cutânea das NP-4 em pele humana.....	63
Figura 22- Microplaca após a coloração com TCC 3%.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição das nanocápsulas poliméricas contendo Silicium P®.....	39
Tabela 2- Diâmetro médio (DM), Índice de Polidispersão (IPD), Potencial Zeta (PZ) e pH das soluções NP-1, NP-2, NP-3, NP-4 e NP-5.	45
Tabela 3- Estudo de estabilidade do diâmetro médio (DM) ,nanômetros, da solução de nanopartículas armazenada em geladeira, ambiente protegido da luz e estufa à 37°C (NP-4).	55
Tabela 4- Estudo de estabilidade do índice de polidispersão (IPD) da solução de nanopartículas armazenadas em geladeira, ambiente e estufa à 37°C (NP-4).	55
Tabela 5- Estudo de estabilidade do potencial zeta (PZ) da solução de nanopartículas armazenadas em geladeira, ambiente protegido da luz e estufa à 37°C (NP-4).	56
Tabela 6- Estudo de estabilidade do pH da solução de nanopartículas armazenadas em geladeira, ambiente protegido da luz e estufa à 37°C (NP-4).....	56
Tabela 7- Valores experimentais obtidos de Repetibilidade e Precisão intermediária para validação do método de quantificação	59
Tabela 8- Porcentagem de permeação das NP-4 em pele Humana.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATG Análise	Termogravimétrica
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CMI	Concentração Inibitória Mínima
CV	Coeficiente de Variação
DCM	Diclorometano
DP	Desvio Padrão
E.E	Eficiência de Encapsulação
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IPD	Índice de Polidispersão
IVTF	Espectroscopia Infravermelho com Transformada de Furrier
KBr	Brometo de Potássio
kV	Kilovolts
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
nm	Nanômetro
NP-1	Solução de Nanopartículas 1
NP-2	Solução de Nanopartículas 2
NP-3	Solução de Nanopartículas 3
NP-4	Solução de Nanopartículas 4

NP-5	Solução de Nanopartículas inertes
NPs	Nanopartículas
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
PZ	Potencial Zeta
r	Coeficiente de Correlação
S	<i>Slope</i>
Si	Silício
Tf	Temperatura de Fusão
TM	Tamanho Médio
TTC	Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio
UV	Radiação Ultravioleta
UV-VIS	Espectrofotometria na Região do Ultravioleta-Visível
VDC	<i>Vertical Diffusion Cell</i>

LISTA DE SIMBOLOS

Å	ångström
θ	Teta
λ	Comprimento de Onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1	Pele.....	19
2.2	Silício orgânico	23
2.3	Nanotecnologia Farmacêutica	27
2.4	Polímeros Biodegradáveis	30
2.5	Poli(ε-caprolactona)	30
2.6	Permeação <i>in vitro</i> de produtos transdérmicos	31
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo Geral	34
3.2	Objetivos específicos	34
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1	Equipamentos.....	35
4.2	Reagentes e solventes	36
4.3	Procedimentos experimentais	37
4.3.1	Delineamento experimental	37
4.3.2	Método para obtenção de nanopartículas de Silício orgânico	38
4.4	Caracterização físico-química das suspensões de nanopartículas de Silícium P®	39
4.4.1	Determinação do pH	39
4.4.2	Determinação do potencial Zeta e diâmetro médio	39
4.4.3	Análise por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FEG).....	40
4.4.4	Análise por difração de raios X.....	40
4.4.5	Avaliação por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF).....	40
4.4.6	Análise estatística do estudo de estabilidade das suspensões de nanopartículas.....	40
4.4.7	Desenvolvimento e validação do método analítico para a quantificação do Silícium P® presente nas suspensões de nanopartículas	41

4.4.8	Determinação da eficiência de encapsulação do Silicium P® nas suspensões de nanopartículas	42
4.4.9	Estudo da permeação cutânea das nanopartículas contendo Silicium P®	42
4.4.10	Atividade antimicrobiana	43
4.4.11	Padronização das suspensões bacterianas	43
4.4.12	Determinação da concentração Inibitória Mínima (CMI).....	43
4.4.13	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Obtenção e caracterização das nanopartículas de Silicium P®.....	45
5.2	Análises morfológicas e de superfície	48
5.3	Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR).....	50
5.4	Difração de Raios X	52
5.5	Estudo da estabilidade das suspensões de nanopartículas de Silicium P®	53
5.6	Determinação do comprimento de onda (λ) de máxima absorção do Silicium P®	56
5.7	Eficiência de Encapsulação	57
5.8	Validação do método analítico para quantificação do Silicium P® presente nas nanopartículas	57
5.9	Linearidade	57
5.9.1	Determinação da eficiência de encapsulação do Silicium P® nas suspensões de nanopartículas	61
5.10	Estudo da permeação cutânea das nanopartículas de Silicium P®	62
5.11	Avaliação da atividade antimicrobiana	64
6	CONCLUSÃO.....	66
	REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

A pele é um importante componente da beleza exterior, sendo foco de muitos procedimentos cirúrgicos e não-cirúrgicos. Podem ocorrer alterações cutâneas associadas ao envelhecimento intrínseco ou extrínseco, como rugas, flacidez e alterações na pigmentação, isso faz com que as pessoas busquem por procedimentos cosméticos para melhorar a aparência da sua pele (KHAVKIN; ELLIS, 2011).

As rugas são sinais expressivos do envelhecimento cutâneo, podem apresentar consequências dos fatores extrínsecos e/ou intrínsecos como também dos movimentos faciais repetitivos gerados pela contração da musculatura da face (BUCK; ALAM; KIM, 2009). Com o envelhecimento o músculo tona-se hipertrofiado e adquire uma tonicidade aumentada, fazendo assim com que as rugas permaneçam aparentes, mesmo sem esse estar contraído, ao longo do tempo a pele torna-se flácida e as rugas tonam-se marcas profundas (BATISTELA; CHORILLI; LEONARDI, 2007).

As mudanças ao longo dos anos na pele podem ser quantitativas e qualitativas, gerando uma diminuição das proteínas da derme, assim como uma redução da ação dos fibroblastos. Consequentemente haverá diminuição no colágeno tipo I, assim como também podem ocorrer mudanças na morfologia e na quantidade de fibras elásticas (ZOUBOULIS; MAKRANTONAKI, 2011).

Um dos componentes mais importantes da pele é o colágeno tipo I. Ele é responsável por propriedades físicas e biológicas dos tecidos, como rigidez, estabilidade e garante a integridade estrutural desses (VERHAEGEN *et al.*, 2012). Pensando na melhoria da aparência da pele estudos estão sendo realizados *in vivo* e *in vitro*, onde está sendo inserido o silício orgânico na dieta (LI *et al.*, 2010). Esses estudos demonstram o benéfico para a saúde dos ossos assim como também na síntese de colágeno tipo I (REFFITT, D. M. *et al.*, 2003).

Diante da importância do silício orgânico na produção de colágeno, novas formas farmacêuticas estão sendo pensadas para a administração desse componente, uma vez que ele é pouco absorvido quando ingerido em forma de cápsulas ou mesmo pela alimentação (UTHUS *et al.*, 1996). Dentre essas destacam-se as nanopartículas poliméricas.

A nanotecnologia está sendo aplicada na área farmacêutica com o intuito de aumentar a biodisponibilidade do fármaco, controlar a liberação no sítio de ação específico, diminuir a toxicidade local, proteger a molécula de fatores extrínsecos e/ou intrínsecos ligados a cinética do organismo e também facilita a administração de medicamentos de forma não invasiva (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Desta forma esse trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas de Silicium P®.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pele

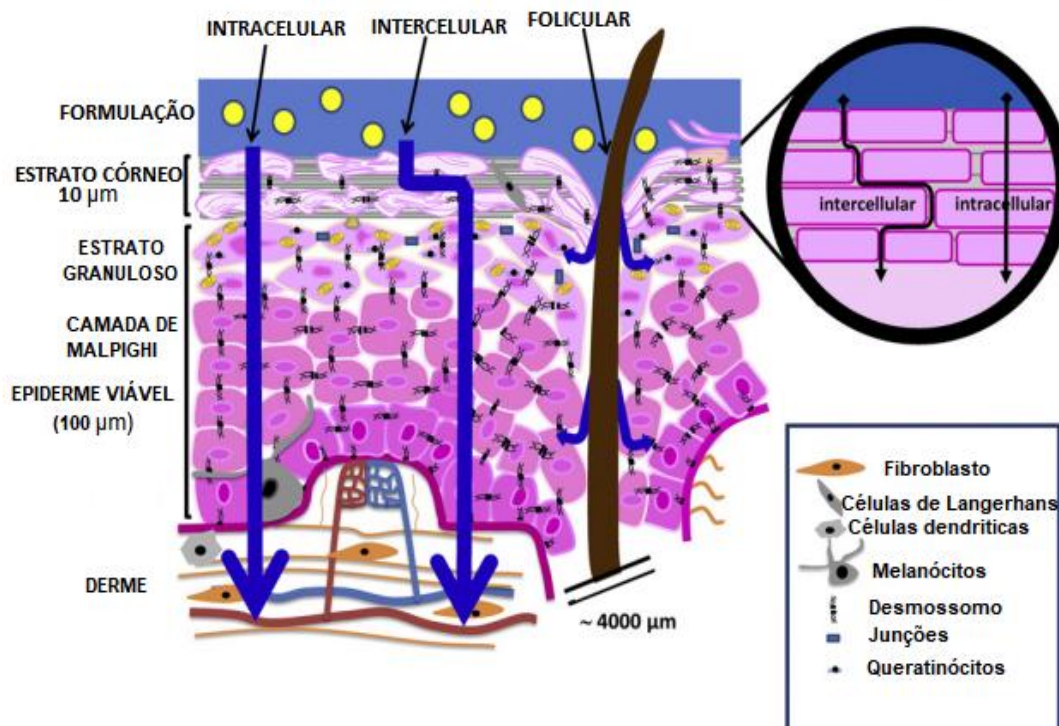
A pele é formada por diferentes camadas, onde estão localizados seus apêndices. Ela funciona como uma barreira física contra o meio externo, impedindo a penetração de micro-organismos e substâncias tóxicas para o nosso organismo, também mantém a temperatura e homeostase dos fluidos e eletrólitos (NICHOLS e KATYAR, 2010; ZOUBOULIS e MAKRANTONAKI, 2011).

A pele é formada por três camadas: epiderme, derme e o tecido subcutâneo. A epiderme é a camada superficial da pele, depende da derme para sua nutrição, pois é avascular. Ela é constituída por queratinócitos, melanócitos, células de Merkel e de Langerhans. Os anexos (unhas, pêlos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas) também tem origem nessa camada. (RITTIÉ e FISHER, 2015).

Existem três vias principais de penetração de substâncias através da epiderme: intracelular, intercelular e folicular. A penetração pela via intercelular se dá pelas lamelas lipídicas onde se encontram os corneócitos. Na via folicular a penetração ocorre através do folículo piloso, onde estão associadas glândulas sebáceas. E pela via intracelular, a penetração ocorre pelos corneócitos que estão preenchidos com queratina e lamelas lipídicas composta por ceramidas, colesterol e ácidos graxos livres (JEPPS *et al.*, 2013; MICHINIAK-KOHN *et al.*, 2005) como mostrado na Figura 1.

A hipoderme é a última camada da pele, nela encontram-se as células de gordura, ela é responsável por manter a temperatura do corpo (KHAVKIN; ELLIS, 2011).

Figura 1- Esquema de penetração de substâncias pela via cutânea



Fonte: Adaptado de BOLZINGER *et al.*, 2012.

A derme é a camada intermediária, formada pela matriz extracelular, fibras de colágeno, fibras elásticas, vasos sanguíneos, terminações nervosas, fibronectina, glicosaminoglicanos e proteoglicanos (HUANG *et al.*, 2008). O colágeno é a proteína mais abundante da matriz extracelular. Até o momento são conhecidos aproximadamente 27 (I ao XXVII) tipos diferentes, onde são codificados por 41 genes presentes em 14 cromossomos (KHAN *et al.*, 2011). É uma glicoproteína insolúvel, devido à grande concentração de aminoácidos hidrofóbicos, formado por um longo filamento proteico, onde as três cadeias polipeptídicas α , alinhadas em paralelo, encontram-se enroladas umas às outras, formando a conformação de tripla hélice, responsável pela resistência dos tecidos. Seus principais aminoácidos são glicina, prolina, lisina, hidroxilisina, hidroxiprolina e alanina. A estrutura do colágeno é estabilizada por ligações de hidrogênio e intermoleculares (PIEZ, 1982).

A formação do colágeno tipo I ocorre principalmente durante o desenvolvimento do tecido embrionário, onde é sintetizado pelos fibroblastos na sua forma precursora solúvel (CANTY, KADLER, 2005). O pró-colágeno está acompanhado por duas cadeias globulares de peptídeos, essas possuem nitrogênio (-N) e carbono (-C)

terminais. Ele é formado dentro do aparelho de Golgi e secretado na matriz extracelular. As duas extremidades do procolágeno são clivadas por enzimas iniciando assim a formação do colágeno. A partir dessa quebra ocorre a formação de moléculas de protocolágeno, seguida por uma união dessas moléculas, onde são estabilizadas por interações hidrofóbicas e eletrostáticas (DAMODARAN *et al.*, 2010).

As ligações cruzadas covalentes intermoleculares das cadeias são formadas por ligações peptídicas. Essas ligações cruzadas garantem estabilidade e força tensora à estrutura supramolecular. As ligações das cadeias de tropocolágeno são realizadas por quatro resíduos chaves: dois resíduos de lisina ou hidroxilisina, contendo o N-terminal e dois contendo o C-terminal, formando então as fibrilas de colágeno (DAMODARAN *et al.*, 2010).

O colágeno apresenta uma grande resistência mecânica, essa é aumentada pelo enrolamento helicoidal. As fibras de colágeno são formadas por um conjunto de fibrilas organizadas em feixes (LEHNINGER, 1995).

As fibras elásticas, também presentes na matriz extracelular, formam uma rede e essa é responsável pela elasticidade da pele normal. Os proteoglicanos e os glicosaminoglicanos garantem a hidratação da pele, devido à capacidade de se ligar ao ácido hialurônico (UITTO e BERNSTEIN, 1998).

Alterações cutâneas associadas ao envelhecimento intrínseco ou extrínseco, como rugas, flacidez e alterações na pigmentação, fazem com que as pessoas busquem por procedimentos cosméticos para melhorar a aparência da sua pele. (KHAVKIN; ELLIS, 2011). O surgimento de uma pele com uma superfície áspera, com rugas finas e grosseiras é causada por uma acentuada diminuição do colágeno, glicosaminoglicanos e proteoglicanos combinada com uma degeneração das fibras elásticas (TRAUTINGER, 2001)

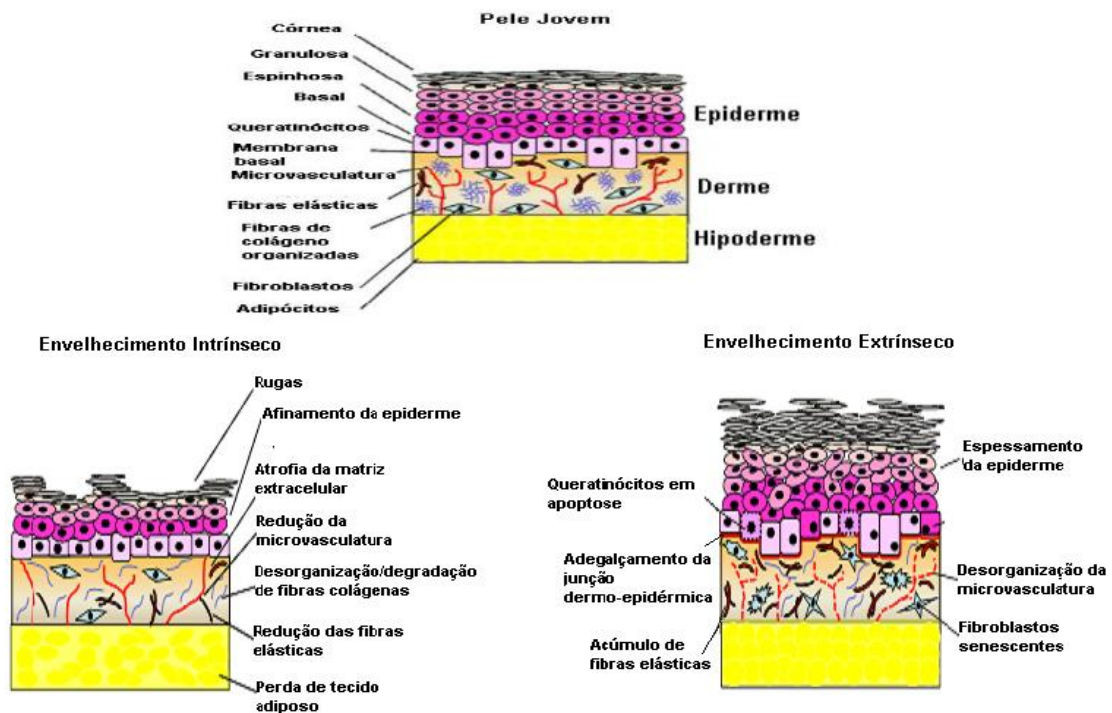
Algumas mudanças podem ocorrer nas células alterando os componentes da matriz extracelular da derme e assim gerando o envelhecimento cutâneo, levando a perda da função do tecido, modificações da pele e diminuição da capacidade de reparar danos (TIGGES *et al.*, 2014; ARAÚJO, 2015).

O envelhecimento cutâneo intrínseco está relacionado com mudanças fisiológicas. Nas mulheres começa a ficar mais intenso após a menopausa, mas também tem relação a fatores genéticos. Ocorre uma progressiva deterioração da função tecidual e uma diminuição da proliferação das células da pele, devido ao aumento de enzimas que possuem a capacidade de degradar a matriz extracelular na derme (JENKINS, 2002; MINE *et al.*, 2008; ZOUBOULIS e MAKRANTONAKI, 2011; RAUT *et al.*, 2012).

O envelhecimento cutâneo extrínseco está relacionado a alguns cuidados, como uso de protetores solares e cremes, assim como a qualidade de vida dela, tabagismo, consumo excessivo de álcool e alimentação. A exposição solar, sem os devidos cuidados, é o principal fator do envelhecimento extrínseco (fotoenvelhecimento). No envelhecimento da pele ocorre uma diminuição na resposta dos queratinócitos e fibroblastos, gerando assim uma diminuição da produção de colágeno e conseqüentemente ocorrendo uma diminuição na elasticidade da pele (GILCHREST, 1996).

Como mostrado na Figura 2 no envelhecimento intrínseco pode-se observar rugas finas, flacidez, ressecamento, epiderme e a derme menos espessas, diminuição dos fibroblastos e conseqüentemente diminuição do colágeno e elastina e atrofia da matriz extracelular (GILCHREST, 1996; ZOUBOULIS E MAKRANTONAKI, 2011). Já as características da pele fotoenvelhecida são: manchas, rugas finas, pele ressecada e áspera, aumento na degradação do colágeno, perda da função dos glicosaminoglicanos e proteoglicanos, apoptose dos queratinócitos (ZOUBOULIS e MAKRANTONAKI, 2011).

Figura 2- Características da pele jovem, da pele envelhecida intrinsecamente e extrinsecamente



Fonte: Laíza Magalhães de Araújo (2015).

Na pele jovem as fibras de colágenos encontram-se organizadas e em grande quantidade. Na pele envelhecida as fibras de colágenos estão desorganizadas e em uma menor quantidade, devido sua degradação e menor produção (NAYLOR *et al.*, 2011).

A degradação dos componentes da matriz extracelular é o que mais contribui para o envelhecimento cutâneo. Com essa problemática diversos estudos realizados *in vivo* e *in vitro*, demonstram que a inserção do silício orgânico Si(OH)_4 na dieta é benéfico para o aumento da síntese de colágeno tipo I.

2.2 Silício orgânico

O silício (Si) é o segundo elemento mais abundante na terra e representa um dos principais oligoelemento do corpo humano. Si é encontrado em células de crescimento rápido como as dos cabelos, unhas, ossos e nas células da pele (RODELLA, *et al.*; 2014). Ele está presente em 1-10 partes por milhão de unhas e cabelos (NASHASHIBI, 1977; SECRET *et al.*, 2013).

Estudos realizados em ratos por Uthus *et. al* (1996) demonstraram que a quantidade biodisponível de silício necessária diariamente para adultos é de 2 a 5 mg,

no entanto ele afirma que essa quantidade não é conseguida apenas com a alimentação, pois ele encontra-se nos alimentos na forma de silicatos ou sílicas, que são pouco absorvidas. Estudos relatam que pessoas ocidentais como Chineses e Indianos consomem uma maior concentração de Si diariamente, devido ao grande consumo de plantas (JUGDAOHSINGH, 2007). Os alimentos com maior concentração de silício são os grãos como de aveia, cevada, farinha de trigo e algumas frações de arroz (ROBBERECHT *et al*, 2009), ele também está presente na água potável (BELLIA, *et al.*, 1994; LI; ZHAOPING *et al.*, 2010).

Carlisle afirmou em 1978 que as modificações dos tecidos conjuntivos são importantes com a idade. A Figura 3 mostra o envelhecimento cronológico da pele e a perda de seus constituintes assim como decréscimo da concentração de Si com o aumento da idade.

Foi realizado um estudo por Calomme e Berghe (1997), que investigaram o efeito da suplementação de bezerros com ácido ortosilícico. A concentração utilizada foi de 0,6 mg Si/kg de peso corporal/dia, adicionada na água potável durante 23 semanas. Ao final do estudo evidenciou-se um aumento significativo do colágeno da derme assim como nas cartilagens (LI *et al.*, 2010). Uma pesquisa realizada por Reffitt e colaboradores (2003) em células, confirmou que o ácido ortosilícico (tipo de silício orgânico) estimula a síntese de colágeno tipo I na pele e aumenta a diferenciação osteoblástica. O rejuvenescimento é favorecido pelo aumento do consumo de alimentos ricos em silício (MACDONALD *et al.*, 2012). A privação de Si na dieta em animais em crescimento mostrou uma diminuição no crescimento dos tecidos ósseos e conjuntivo, os quais também apresentaram defeitos (BELLIA *et al.*, 1994).

Figura 3- Envelhecimento cronológico da pele e a perda de seus constituintes. Decréscimo da quantidade de Si com o envelhecimento



Fonte: Revista BIOTEC, Silicium P®, 2017.

O colágeno da derme diminui 1% ao ano, após os 21 anos, diminuindo então a espessura e elasticidade da pele. Após a menopausa essa diminuição é intensificada, causando alterações ainda maiores, com perda de aproximadamente 30% do colágeno nos primeiros 5 anos e um declínio de 0,55% da elasticidade da pele (BRINCAT *et al.*, 1987; NICHOLS e KATYAR.,2010; ZOUBOULIS e MAKRANTONAKI., 2011), por isso a grande importância da reposição de Si.

Estão disponíveis no mercado alguns suplementos, via oral, à base de silício orgânico estabilizados com a colina, esses são capazes de aumentar a síntese de colágeno, elastina, queratina e estabilizar os glicosaminoglicanos (BAREL, 2005).

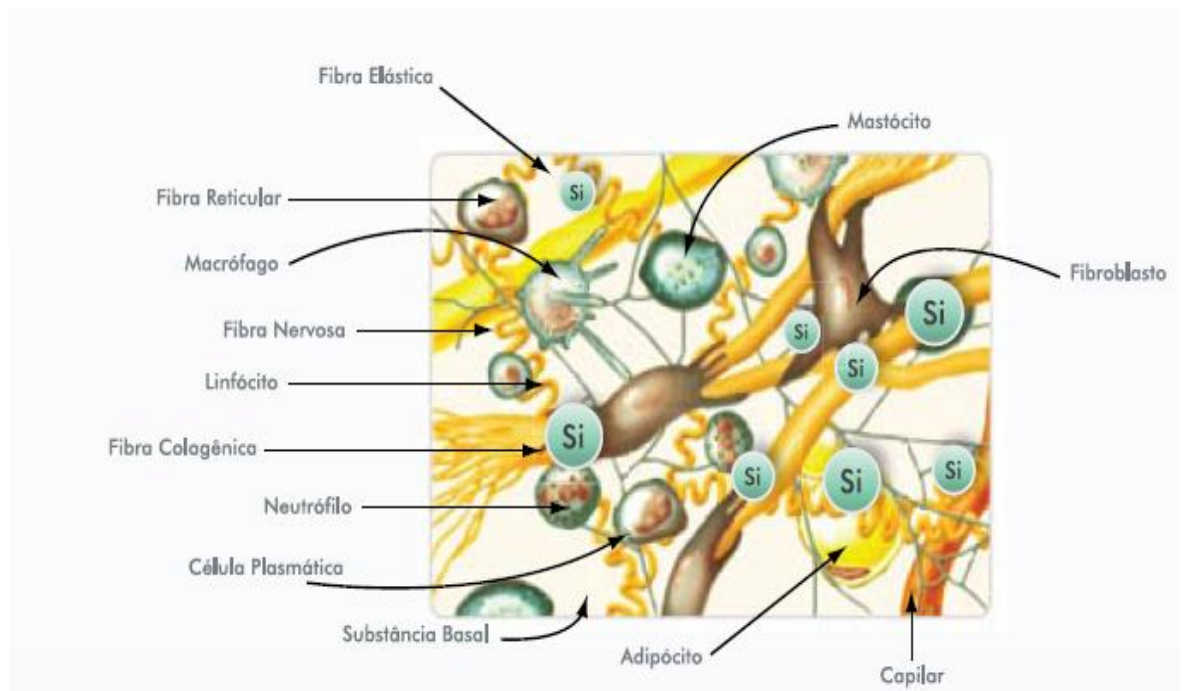
Barel e colaboradores (2005) avaliaram o efeito da ingestão de Si(OH)_4 , estabilizado com a colina, na pele, unhas e cabelos de 48 mulheres (entre 18 e 65 anos), com características de fotoenvelhecimento, por 36 semanas. Esse estudo foi realizado concomitantemente com mulheres recebendo placebo. Após 20 semanas de tratamento observaram uma diminuição em 19% na profundidade das rugas, também houve uma melhora de 89% da elasticidade da pele, quando comparado ao grupo que recebeu o placebo. Nos cabelos eles notaram um aumento na elasticidade

capilar e uma maior resistência assim como nas unhas que ficaram menos quebradiças.

Refitt e colaboradores (2003) afirma a importância do silício para regular o metabolismo de vários tecidos, como os dos ossos, cartilagens e tecido conjuntivo. Sendo uma de suas principais funções a síntese de colágeno tipo I e atividade da enzima prolina hidroxilase.

O Monometilsilanotriol (Silicium P®) também é um tipo de silício orgânico, esse é usado topicamente, ele é responsável por repor o silício perdido com o passar dos anos. Ele participa na formação e estabilização da derme, cria ligações com as macromoléculas como as glicosaminaglicanas, proteoglicanas e as glicoproteínas estruturais (Figura 4).

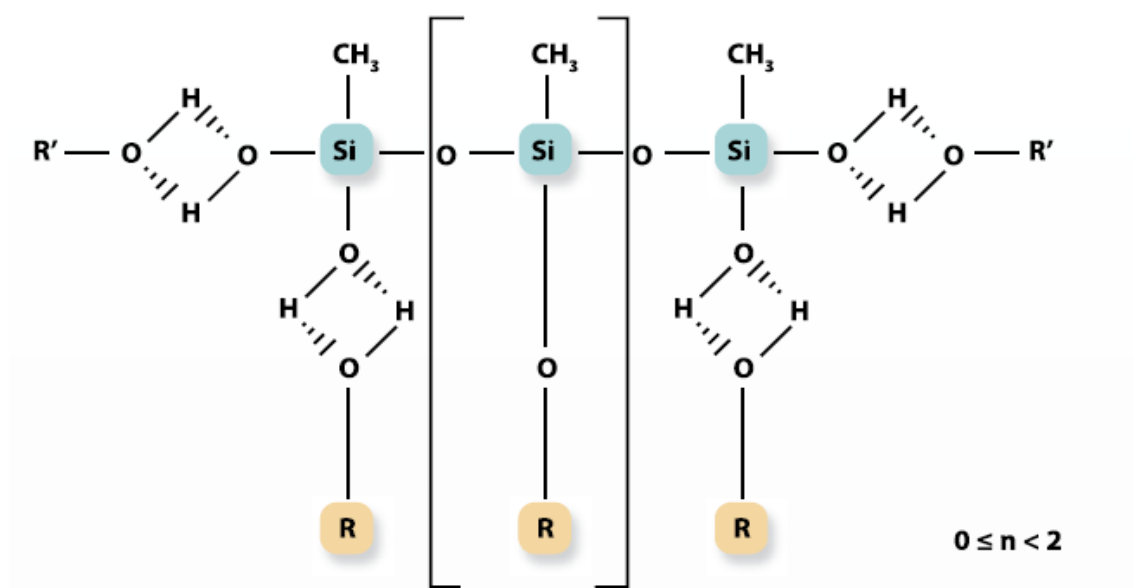
Figura 4- Ligações do Silício orgânico com as estruturas da derme



Fonte: Revista BIOTEC, literatura Silicium P®, 2017.

O Silicium P® é formado por um metil e três hidroxilas, onde essas hidroxilas podem ligar-se à radicais, como mostrado na Figura 5.

Figura 5- Estrutura química do Silicium P®.



Fonte: Revista Biotec, literatura Silicium P®, 2017.

Um estudo *in vitro* foi realizado para comprovar a sua eficácia na proteção do envelhecimento da pele e dos cabelos. Foram aplicados $25 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ de Silicium P® na membrana da pele e quantificado em uma cultura própria. Após 16 horas 90% do silício já havia difundido através da membrana da pele (Revista Biotec, literatura Silicium P®, 2017). Além de estimular a síntese de colágeno ele também possui ação anti-inflamatória (LANSDOWN et al., 2007).

A presença de hidroxilas na molécula do monometilsilanotriol garante a hidratação da epiderme, uma vez que as moléculas de água ficam ao redor do silício (BOMMELAER et al., 1993).

2.3 Nanotecnologia Farmacêutica

A nanotecnologia é uma área promissora no desenvolvimento de sistemas de transporte de fármacos, otimizando as propriedades físicas, químicas e biológicas desses, como a velocidade de liberação e aumento da biodisponibilidade do fármaco e assim substituindo as formas convencionais dos medicamentos (MOGHIMI et al., (2005). Segundo Sakata et al. (2007), a nanotecnologia é a área envolvida no desenvolvimento e caracterização de sistemas terapêuticos na escala nanométrica e micrométrica, sendo seus componentes de origem inorgânica ou orgânica. Michael

Faraday em 1857 descreveu pela primeira vez algumas propriedades de nanopartículas (NPs). No início do século XX, Paul Ehrlich propôs o conceito de Bala Mágica, onde era uma nanopartícula contendo um fármaco, o qual atravessava várias barreiras fisiológicas e celulares. No século XXI foram desenvolvidas nanopartículas vetorizadas, com o intuito de direcionar o fármaco para um determinado tecido ou célula, minimizando os efeitos citotóxicos de seus componentes (HENRIQUE, *et al.*, 2006).

Nos últimos anos as nanopartículas poliméricas biodegradáveis se tornaram muito importantes na área da pesquisa, visto que essas possuem um potencial sistema de liberação de fármacos (hidrofílicos ou lipofílicos), conseguem atingir órgãos e tecidos específicos e atuam como carreadores de princípios ativos (SOPPIMATH *et al.*, 2001; HANS & LOWMAN, 2002).

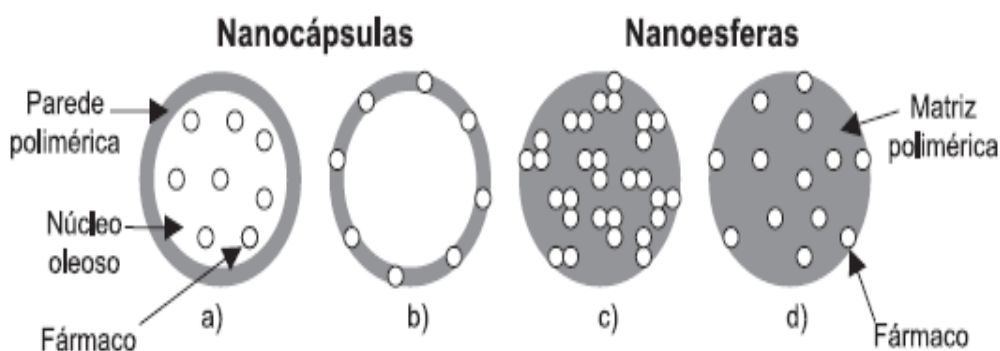
Nanopartículas são sistemas coloidais que variam de 100 a 1000 nanômetros, essas são responsáveis pela liberação controlada e prolongada do fármaco que está em seu interior (NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2010). Os principais objetivos para o uso desse sistema são transporte eficiente do princípio ativo, liberação controlada, biocompatibilidade, biodistribuição, diminuição da toxicidade local, encapsulamento de vários tipos de moléculas e ultrapassagem de barreiras da pele como o estrato córneo (MOHANRAJ, *et al.*, 2006). No entanto, algumas limitações também são destacadas como, difícil desenvolvimento e a dificuldade na incorporação do fármaco (MOHANRAJ, *et al.*, 2006; RAWAT, *et al.*, 2006).

Van Vlerken e colaboradores, (2007) estudaram a importância da escolha adequada do sistema polimérico para a formação das nanopartículas e o encapsulamento do fármaco, uma vez que ele será responsável pela melhoria da biodisponibilidade, eficiência de encapsulação, pelo tempo de retenção desse nas nanopartículas, penetração no estrato córneo e pela biodegradabilidade.

As NPs podem ser divididas em duas classes, nanocápsulas e nanoesferas, onde suas principais diferenças encontram-se na composição e na organização estrutural, como mostrado na Figura 6. As nanocápsulas possuem uma parede polimérica onde o fármaco pode estar aderido a ela ou pode estar presente no seu interior. Em contrapartida as nanoesferas são formadas por uma matriz polimérica maciça onde o fármaco pode encontrar-se retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK *et al.*,

2003). Quando o fármaco se encontra apenas retido na nanopartícula ocorrerá uma liberação mais rápida, no entanto vetorizada e se estiver no seu interior a liberação será mais prolongada.

Figura 6- Representação esquemática da organização de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas.



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

Algumas características das nanopartículas devem ser controladas para que o local de ação do fármaco seja atingido, como o tamanho, as propriedades da superfície e de liberação (obtida através do polímero) (MOHANRAJ; CHEN, 2006). Para a redução do tamanho podem ser usados tensoativos (ZHANG *et al.*, 2011). A superfície das NPs pode ser modificada, para assim ajudar a penetração e a biocompatibilidade, uma vez que polímeros catiônicos são mais mucoadesivos e não-iônicos são mais biocompatíveis. Também podem ser usados tensoativos com a finalidade de diminuir a tensão superficial entre as partículas e as células, permitindo maior contato entre elas (KREUTER, 1997).

As nanopartículas podem ser obtidas por vários métodos, como por dispersão de um polímero pré-formado (nanoprecipitação), evaporação do solvente, emulsificação espontânea/difusão do solvente, polimerização, entre outros (MUNDARGI, 2008). A nanoprecipitação é uma técnica simples, onde para a formação das nanopartículas necessitam de duas fases uma orgânica composta por solvente (metanol, etanol, acetona, hexano, cloreto de metileno ou dioxano), um polímero (sintético, semi-sintético ou natural) e o princípio ativo. Também é composta por uma fase aquosa onde estão presentes os tensoativos (FESSI *et al.*, 1989). A suspensão de nanopartículas é formada quando a fase orgânica é adicionada na fase aquosa

com agitação lenta. Segundo Lince e colaboradores, 2008, as características das NPs dependem da natureza e concentração dos seus componentes.

Segundo Fessi (1989) a técnica de nanoprecipitação é um dos que apresentam melhores resultados em relação a eficiência de encapsulação (E.E), conseguindo valores acima de 80%.

2.4 Polímeros Biodegradáveis

Algumas nanopartículas são desenvolvidas utilizando polímeros, onde esses podem ser sintéticos biodegradáveis ou naturais. Os polímeros biodegradáveis são os mais utilizados devido ao baixo custo quando comparados aos naturais, os mais utilizados são: poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli (ácido láctico) (PLA), copolímero poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e os poliacrilatos. Todos os polímeros citados são aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) – Agência Vigilância Sanitária Americana (HOLLAND *et al.*, 1986; SOARES *et al.*, 2005).

Segundo Saltzman (2001) os polímeros biodegradáveis sofrem degradação química *in vivo*, por hidrólise ou ação enzimática. Os produtos originados não são tóxicos e são biocompatíveis, sendo degradados *in vivo*. Essa degradação pode ocorrer por ação de enzimas, microrganismos, células ou também podem ser metabolizados pelas vias fisiológicas do organismo e são totalmente eliminados pelo metabolismo corpóreo.

A permeabilidade em tecidos, durabilidade e degradabilidade dos polímeros são influenciadas pelas propriedades de superfície como a homogeneidade, energia de superfície e hidrofília. O mecanismo de liberação do princípio ativo do interior do polímero é influenciado por sua massa molar, adesividade e solubilidade (PILLAI; PANCHAGNULA, 2001). Os fármacos quando estão encapsulados com esses polímeros não ficam prontamente disponíveis para o organismo, pois o polímero necessita ser degradado, por isso essa capacidade de fazer uma liberação controlada.

2.5 Poli(ϵ -caprolactona)

Dentre os polímeros biodegradáveis e sintéticos se destaca a poli(ϵ -caprolactona), sendo um poliéster alifático semicristalino, grau de cristalinidade de

50%, possui caráter hidrofóbico, é sintetizado por meio de polimerização por abertura do anel ϵ -prolactona (NAIR e LAURENCIN, 2007).

A PCL é um polímero biocompatível, ou seja, é degradado em forma de monômeros que são eliminados do organismo por vias metabólicas normais *in vivo* e não é tóxico (CHAWLA e AMIJI, 2002; ALEXIS *et al.*, 2008). A degradação é lenta e ocorre por hidrólise, devido as ligações hidroliticamente lábeis (NAIR e LAURENCIN, 2007). A biodegradação lenta é atribuída à hidrofobicidade e à cristalinidade, pois quando o polímero é cristalino e de baixo peso molecular ele sofre degradação intracelular (WOODRUFF, HUTMACHER, 2010).

Alguns empecilhos podem ser encontrados em seu uso, como sua baixa temperatura de fusão ($T_f = 60^\circ\text{C}$), gerando problemas no desenvolvimento das nanopartículas, uma vez que os princípios ativos devem ser solubilizados nessa temperatura ou inferior (ALEXIS *et al.*, 2008).

Dash e Konkimalla, 2012, relatam uma grande versatilidade da PCL, pois as propriedades mecânicas, físicas e químicas podem ser modificadas facilmente além de apresentarem boa compatibilidade com polímeros naturais e sintéticos.

2.6 Permeação *in vitro* de produtos transdérmicos

Pesquisas sobre permeação transdérmica de fármacos são realizadas desde a década de 50. No entanto só em 1979 que o termo foi aprovado *pela Food and Drug Administration*. Com o objetivo de atingir a circulação sanguínea, os sistemas transdérmicos auxiliam a passagem de fármacos através da pele (ALLEN *et al.*, 2007).

A permeação transdérmica de fármacos demonstra algumas vantagens terapêuticas frente aos fármacos de administração oral ou parenteral (KEMKEN *et al.*, 1991). ALLEN e ANSEL (2013) citam essas vantagens, como:

- Preserva o fármaco frente a pH gastrointestinal, atividade das enzimas, interações com outros medicamentos, com comidas e bebidas;
- Facilidade de administração, principalmente em pessoas acamadas, crianças, idosos ou em caso de vômito e diarreia;
- Não ocorre o efeito de primeira passagem, impedindo a inativação do fármaco pelas enzimas hepáticas e digestivas;

- Aumento da absorção do princípio ativo;
- Diminuição no número de doses por dia, devido a liberação controlada e prolongada;

Marcolongo (2003) relata a importância do teste de permeação *in vitro* de fármacos, tanto para o desenvolvimento, permitindo ajustar a formulação, quanto para o controle de qualidade.

Alguns equipamentos podem ser usados para realizar os testes *in vitro* de penetração de fármacos, sendo o mais utilizado a *Vertical Diffusion Cell* (VDC) de Franz (SHAH *et al.*, 1994). Essa é composta por seis células de vidro, onde são termoaquecidas, possuem uma cuba onde terá o meio receptor (na maioria das vezes são usadas soluções tampão), agitador magnético, compartimento para a amostra, entre o compartimento da amostra e o receptor fica a membrana, onde essa fica em contato com a solução receptora, mimetizando assim as condições *in vivo* como demonstrado na Figura 7.

Figura 7- Célula de difusão vertical proposta por Franz, 1975



Fonte: Adaptada de Silva (2010).

A temperatura é controlada por um banho maria, no qual a água aquecida (32°C), circula através da jaqueta que envolve a câmara receptora (SARTORELLI *et al.*, 2000). Vários estudos científicos utilizam as células de Franz modificada para

testar formulações transdérmicas como cosméticos, pesticidas e oftálmicas. Segundo a *FDA* esse sistema é o ideal para controlar a qualidade de formulações transdérmicas (*FDA*,1997).

Algumas condições devem ser seguidas para que o estudo tenha validade como o meio receptor deve ser adequado para que se tenha a condição sink, a temperatura deve ser mantida em 32°C (± 5), o meio receptor deve conter uma solução tampão com o pH fisiológico. Os tempos de coletas devem ser no mínimo 5 (*SHAH et al.*, 1999). A membrana mais adequada para a realização desse teste são peles humanas oriundas de cirurgia plástica, entretanto a dificuldade de obtenção e a necessidade de submeter o experimento ao comitê de ética torna seu uso limitado e assim podem ser substituídas por membranas sintéticas (*SCHMOOK et al.*, 2001; *RIGG, BARRY*, 1990, *BABY et al.*, 2008). Esses experimentos têm se tornado cada vez mais importantes na área farmacêutica devido o controle na produção de novas formas farmacêuticas e também o controle na qualidade desses.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Obter e caracterizar nanopartículas poliméricas contendo Silício orgânico, avaliar a permeação cutânea e sua atividade antimicrobiana.

3.2 Objetivos específicos

- Produzir nanopartículas poliméricas contendo Silicium P®;
- Caracterizar as nanopartículas poliméricas em relação ao diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial Zeta e pH;
- Realizar a caracterização das nanopartículas poliméricas obtidas por meio de análises morfológicas e espectroscópicas;
- Investigar a estabilidade físico-química das suspensões de nanopartículas;
- Desenvolver e validar um método analítico por espectrofotometria de UV-VIS para a quantificação do Silicium P®;
- Determinar a eficiência de encapsulação, por meio do método UV-VIS desenvolvido;
- Proceder o estudo da permeação, *ex vivo*, do Silicium P® em pele humana;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* das nanopartículas contendo o Silicium P®, contra cepas bacterianas gram-positivas e gram-negativas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

- Agitador Magnético com Aquecimento (SOLAB®, modelo S-91, São Paulo, Brasil);
- Analisador de Tamanho de Partícula e Potencial Zeta (MALVERN®, Zetasizer Nano modelo Zs90, Malvern, Reino Unido);
- Analisador Térmico (PERKINELMER®, modelo STA 6000, São Paulo, Brasil);
- Balança Analítica (SHIMADZU®, modelo UX420H, São Paulo, Brasil);
- Balança Analítica de Precisão (BIOPRECISA®, modelo FA2104N Celtac, Paraná, Brasil);
- Bomba de água submersa (SALO BETTER®, modelo 90, São Paulo, Brasil);
- Capela de Exaustão (QUIMIS®, modelo 216-22, São Paulo, Brasil);
- Difratorômetro de Raios X (RIGAKU®, modelo Ultima IV, Texas, Estados Unidos da América);
- Espectrofotômetro UV-VIS (THERMO SCIENTIFIC®, modelo Genesys 10uv, Madison, Washington);
- Espectroscópio de Infravermelho com Transformada de Fourier (SHIMADZU®, modelo IR Prestige-21, Quioto, Japão);
- Estufa Microbiológica (QUIMIS®, modelo Q316M4, São Paulo, Brasil);
- Evaporador rotativo (modelo 804- Fisaton, São Paulo, Brasil);
- Geladeira (ELECTROLUX®, modelo DF36A, São Paulo, Brasil);
- Metalizador (SHIMADZU, modelo IC-50 Ion Coater);
- Microplacas de cultura celular 96 poços (SPL LIFE SCIENCES);
- Microscópio Eletrônico de Varredura por Emissão de Campo (TESCAN®, Mira 3, Brno, República Tcheca);
- Placa de Agitação Magnética e Aquecimento (QUIMIS®, modelo Q261-22, São Paulo, Brasil);
- Potenciômetro Digital de Bancada (HANNA® Instruments, modelo HI 21, São Paulo, Brasil);
- Purificador de Água Sistema Osmose Reversa (QUIMIS®, modelo Q842-210, São Paulo, Brasil);

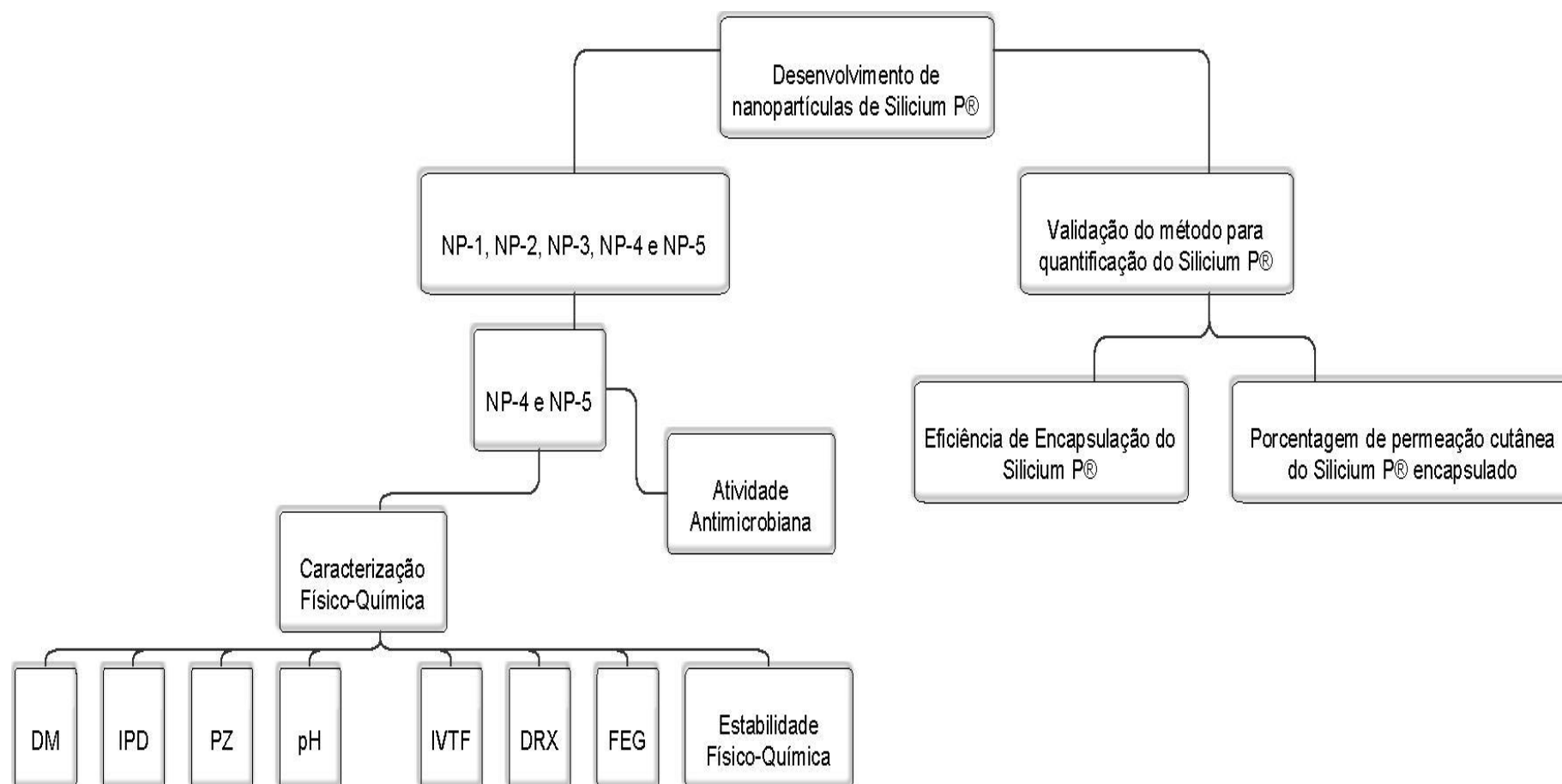
- Sistema de Difusão *ex vivo* – Células de Franz do tipo vertical;
- Ultracentrífuga refrigerada (HITACHI®, modelo Himac CR21GII, Toquio, Japão).

4.2 Reagentes e solventes

- Acetona P.A (VETEC – Química Fina);
- Ágar Mueller Hinton (MERCK);
- Água Purificada Milli-Q (MILLIPORE);
- Álcool metílico P.A (BIOTEC – reagentes analíticos);
- Brometo de potássio grau espectroscópico (KBr) (SIGMA ALDRICH);
- Caldo B.H.I (OXOID Ltda.);
- Cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio P.A (TTC) (VETEC QUÍMICA FINA);
- Cloreto de sódio 0.9% (ISOFRAMA);
- Diclorometano (Synth);
- Etanol P.A (VETEC Química Fina);
- Fosfato dissódico heptahidratado (Synth);
- Monofosfato de sódio monohidratado (Synth);
- Monometilsilanotriol (Silicium P®) (BIOTEC);
- Poli(ε-caprolactona) (PCL) (M_w^-10 kDa, SIGMA-ALDRICH);
- Polissorbato 80 (Tween 80®, NUCLEAR);

4.3 Procedimentos experimentais

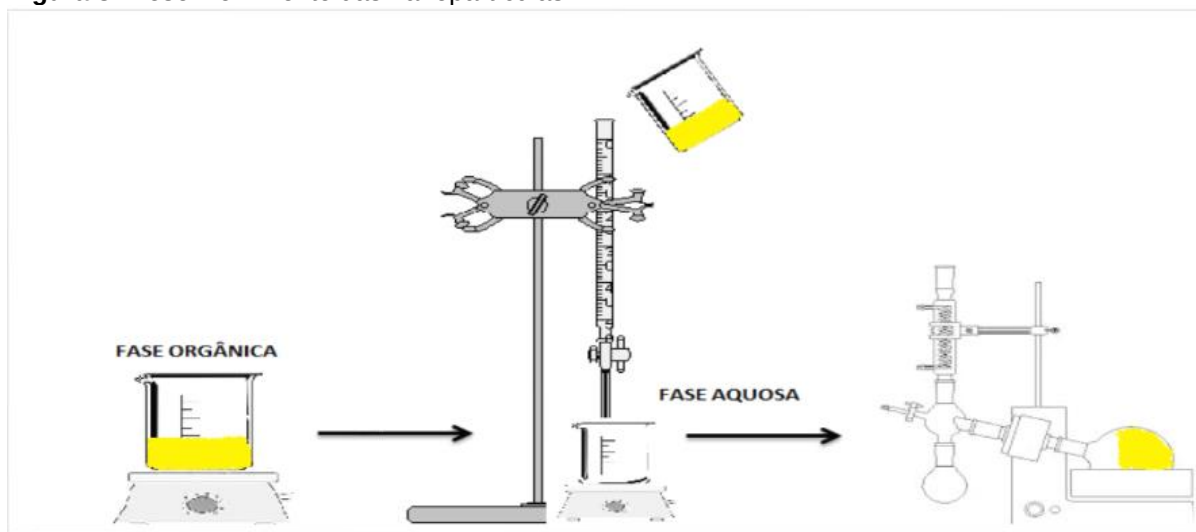
4.3.1 Delineamento experimental



4.3.2 Método para obtenção de nanopartículas de Silício orgânico

A suspensão das nanopartículas foi obtida através do método de deposição interfacial de um polímero pré-formado, desenvolvido por Fessi *et al.*, (1989), com modificações (Figura 8). O Monometilsilanotriol (Silicium P[®]) foi solubilizado em metanol, e adicionado à solução de PCL em acetona, constituindo, assim, a fase orgânica. Em seguida essa fase foi gotejada, com o auxílio de uma bureta sobre a fase aquosa, contendo uma solução de Tween 80[®], previamente preparada. A suspensão foi mantida a 40 °C sob agitação magnética por 10 minutos. A taxa de gotejamento foi de 1mL.min⁻¹. Posteriormente, o solvente foi removido por rotaevaporação à pressão reduzida, a uma temperatura de 40 °C, até volume final de 20 mL, ajustando a concentração para 5 mg.mL⁻¹.

Figura 8- Desenvolvimento das nanopartículas



Fonte: o autor

Visando a obtenção de nanopartículas poliméricas com as características adequadas para atingir os objetivos propostos nesse trabalho (menor diâmetro médio, potencial zeta próximo a 30 mV e índice de polidispersão abaixo de 0,5), foram testadas 4 formulações conforme Tabela 1. Foi, também, produzida uma nanopartícula inerte (NP-5), sem a incorporação do Silicium P[®].

Tabela 1- Composição das nanocápsulas poliméricas contendo Silícium P®.

Componentes	Formulações				
	NP- 1	NP- 2	NP- 3	NP- 4	NP- 5
Fase Orgânica					
Poli(ε-caprolactona)	250 mg	250 mg	250 mg	250 mg	250 mg
Silícium P®	100 mg	100 mg	100 mg	100 mg	-
Acetona	27 mL	14 mL	22 mL	7 mL	7 mL
Metanol	-	14 mL	5 mL	7 mL	7 mL
Fase aquosa					
Tween 80®	383 mg	383 mg	383 mg	383 mg	383 mg
Água miliq	50 mL	50 mL	50 mL	20 mL	20 MI

Fonte: o autor (2017). NP-1 (Formulação 1 de nanopartículas), NP-2 (Formulação 2 de nanopartículas), NP-3 (Formulação 3 de nanopartículas), NP-4 (Formulação 4 de nanopartículas) e NP-5 (Formulação 5 de nanopartículas inertes).

As suspensões foram armazenadas em frascos âmbar sob refrigeração.

4.4 Caracterização físico-química das suspensões de nanopartículas de Silícium P®

4.4.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em potenciômetro digital (Hanna Instruments), previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas suspensões após a preparação e depois de 30, 60, 90 e 120 dias após o preparo das mesmas.

4.4.2 Determinação do potencial Zeta e diâmetro médio

O diâmetro hidrodinâmico das suspensões de nanopartículas de Silícium P®, potencial zeta e índice de polidispersão (IPD) foram analisados no equipamento

Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments), por espalhamento de luz dinâmica. As suspensões foram diluídas (1:100) em água Mili-Q.

4.4.3 Análise por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FEG)

A avaliação morfológica e de superfície das nanopartículas foi realizada em microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo MYRA3, (Tescan). As amostras foram metalizadas com ouro no equipamento SC7620 Mini Sputter Coater. O registro das imagens foi realizado por meio da utilização do *software* específico.

4.4.4 Análise por difração de raios X

As nanopartículas contendo o Silicium P[®], foram examinadas em difratômetro de raios X Ultima IV (Rigaku), scan de 2° min⁻¹ e 2 θ de 3° a 80°, radiação K α de cobre ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), corrente de 30 mA e voltagem 40 kV, para a observação de possíveis picos indicativos de cristalinidade, assim como o polímero de partida (PCL). As suspensões foram depositadas em um suporte de vidro e secas em estufa a 40°C até a formação de um pó para análise.

4.4.5 Avaliação por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF)

As nanopartículas contendo o Silicium P[®] e as inertes, o polímero (PCL) e o Silicium P[®] foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier, em pastilha com KBr, no equipamento IR Prestige-21 (Shimadzu), 64 scans min⁻¹, resolução de 4 cm⁻¹.

4.4.6 Análise estatística do estudo de estabilidade das suspensões de nanopartículas

A estabilidade do diâmetro médio de partícula (DM), índice de polidispersão (IPD), potencial zeta (PZ) e pH das nanopartículas de Silicium P[®] foram analisadas durante 0, 30, 60, 90 e 120 dias com armazenamento em geladeira, temperatura ambiente e estufa (37°C). A significância estatística das diferenças foi calculada por análise da Anova de duas vias, seguida de Bonferroni. Todos os tempos foram

comparados com o tempo inicial (tempo 0). Os testes foram realizados usando o programa GraphPad Prism versão 7.00 (San Diego, CA).

4.4.7 Desenvolvimento e validação do método analítico para a quantificação do Silicium P® presente nas suspensões de nanopartículas

O desenvolvimento do método analítico por espectrofotometria de UV-VIS foi realizado com o objetivo de padronizar um método de quantificação do silício orgânico na suspensão de nanopartículas.

Foi determinado o comprimento de onda (λ) de máxima absorção do Monometilsilanotriol (Silicium P®), por meio de uma varredura em espectrofotômetro Cary Win 50 UV (Agilent) em um intervalo de leitura de 190 a 1100 nm, utilizando-se uma solução padrão do Silicium P® à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em metanol.

A curva analítica foi desenvolvida com 10 níveis de concentração (30; 20; 10; 0,8; 0,5; 0,2; 0,1; 0,08; 0,05 e 0,03 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), todas essas em metanol.

O método foi validado estudando as seguintes figuras de mérito: linearidade, seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e precisão, segundo as normas da *International Conference on Harmonization* (ICH) (2005) e da RDC nº 166, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2017).

A linearidade foi determinada com base no cálculo de regressão linear empregando mínimos quadrados, a partir da construção de uma curva analítica (absorbância versus concentração) utilizando 10 soluções-padrão do Silicium P® em metanol, essas foram analisadas em triplicatas. Com as absorbâncias obtidas foi possível determinar a equação da reta e o coeficiente de correlação (r).

A seletividade foi avaliada por comparação dos espectros representativos das nanopartículas contendo o Silicium P® e de nanopartículas inertes.

A análise do LD e LQ foram baseados na curva analítica obtida para a linearidade. Para sua determinação foram utilizados os valores da inclinação da curva (*slope*) e o desvio padrão (DP) do intercepto com eixo y, de acordo com as equações 1 e 2

$$LD = \frac{3,3 \times DP}{S} \quad (1)$$

$$LD = \frac{10 \times DP}{S} \quad (2)$$

Onde: DP é o desvio padrão médio do intercepto com o eixo y e S é a inclinação da curva analítica ou *slope*.

4.4.8 Determinação da eficiência de encapsulação do Silicium P® nas suspensões de nanopartículas

A quantificação do Silicium P® encapsulado nas nanopartículas foi realizado pelo método indireto. As nanopartículas foram submetidas à ultrafiltração usando um dispositivo de centrifugação (Amicon® 10.000 Mw, Milipore) à 14. 000 rpm por 30 minutos. A concentração de Silicium P® não encapsulado ao sistema foi determinada após a análise do ultrafiltrado resultante do processo de ultracentrifugação da formulação, onde uma alíquota foi diluída em metanol (1:100 v/v). A eficiência de encapsulação (EE%), foi determinada a partir da equação 3.

$$EE\% = \frac{M.\text{Silicium P}^{\circ}\text{-Inicial} - M.\text{Silicium P}^{\circ}\text{ livre} \times 100}{M.\text{Silicium P}^{\circ}\text{ inicial}} \quad (\text{Equação 3})$$

4.4.9 Estudo da permeação cutânea das nanopartículas contendo Silicium P®

Para o estudo da permeação cutânea foi utilizada pele humana obtida de abdominoplastia. A pele foi preparada previamente, retirando-se o tecido adiposo. As regiões que haviam manchas, cortes, estrias ou tatuagens foram excluídas. As amostras preparadas foram acondicionadas a -18°C.

O estudo da permeação cutânea foi realizado em células de difusão vertical, onde a pele foi colocada entre o compartimento doador e o receptor. No compartimento doador foram colocados 3 mL (5mg.mL⁻¹) da suspensão de nanopartículas contendo o silício orgânico, no compartimento receptor foram colocados 12 mL da solução tampão fosfato, pH 6,0, sob agitação constante, garantindo assim a condição “sink”.

Foram retiradas alíquotas de 2 mL na fase receptora nos tempos de 30 minutos, 1h, 1h e 30 min, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 9h, 10h, 11h, 12h, 24h e 48h. Após a cada

coleta foram repostos 2 mL da solução tampão fosfato. Paralelamente foi conduzido um teste, nas mesmas condições, com a adição de tampão no compartimento doador. O material coletado foi utilizado como branco a fim de evitar a interferência de eventuais constituintes da pele nas leituras. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Cary Win 50 UV (Agilent) em 222 nm, os quais foram solubilizados em metanol (1:100 v/v). Esse estudo foi realizado em triplicatas.

4.4.10 Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana do Silícium P® e das nanopartículas foi realizada em modelo experimental de microdiluição em caldo conforme descrito pela NCCLS (2003). Os microrganismos testados foram bactérias gram positivas (*E. faecalis*, *S. aureus*) e gram-negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. mirabilis*).

4.4.11 Padronização das suspensões bacterianas

As suspensões bacterianas usadas para o teste foram preparadas adicionando algumas colônias de microrganismos à solução de salina estéril, até atingir turvação equivalente a 0,5 da escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). Para confirmação da concentração foi realizada uma leitura em espectrofotômetro BTS-330 (Byosystems) em 590 nm.

4.4.12 Determinação da concentração Inibitória Mínima (CMI)

Este teste foi realizado pela técnica de microdiluição, conforme proposto pela NCCLS (2003). Foram utilizadas microplacas de 96 poços. Os poços foram preenchidos com 100 µL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e 100 µg de silício puro e 100 µg de nanopartículas contendo Silícium P® (5mg.mL⁻¹) e 100 µg das nanopartículas inertes. Em cada poço foram adicionados 10 µL das suspensões de bactérias. As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Os testes foram realizados em duplicatas. Após o tempo de incubação, foram adicionados 25 µL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) 3% a cada um dos poços. No decorrer de 30 minutos foi avaliada o desenvolvimento de cor nos poços e, aqueles em que houve inibição do crescimento bacteriano, permanecem incolores, enquanto os poços nos quais houve crescimento microbiano coraram de vermelho.

4.4.13 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

As amostras contidas nos poços que não apresentaram coloração em presença do TCC 3%, foram semeadas em placas contendo ágar de Mueller Hinton e incubadas a 37°C durante 24 h. A CMB foi determinada considerando-se a concentração do último poço no qual não houve crescimento bacteriano.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção e caracterização das nanopartículas de Silicium P®

Foram obtidas nanopartículas poliméricas contendo Silicium P® a partir das 5 formulações propostas. Os resultados de diâmetro médio (DM), índice de polidispersão (IPD), potencial zeta (PZ) e pH estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Diâmetro médio (DM), Índice de Polidispersão (IPD), Potencial Zeta (PZ) e pH das soluções NP-1, NP-2, NP-3, NP-4 e NP-5.

Nanopartículas	DM (nm)	IPD	PZ (mV)	pH
NP-1	924,4 ± 3,3	0,508 ± 1,7	-4,93 ± 2,3	5,60 ± 1,1
NP-2	527,2 ± 4,8	0,818 ± 2,5	-25,3 ± 2,6	5,28 ± 1,9
NP-3	480,3 ± 1,3	0,925 ± 2,8	-15,3 ± 1,9	5,17 ± 1,4
NP-4	208,1 ± 1,8	0,225 ± 1,5	-31,5 ± 1,7	5,61 ± 1,2
NP-5	265,0 ± 2,9	0,212 ± 2,4	-29,3 ± 3,6	5,25 ± 3,1

Fonte: o autor (2017). NP-1 (solução de nanopartículas 1), NP-2 (solução de nanopartículas 2), NP-3 (solução de nanopartículas 3), NP-4 (solução de nanopartículas 4) e NP-5 (solução de nanopartículas inertes).

A formulação NP-4 apresentou os melhores resultados dentre as formulações testadas com menor DM, menor IPD, maior PZ e pH próximo ao da pele.

O DM apresentado pela NP-4 foi de 208,1 nm com desvio padrão de $\pm 1,8$, resultado de grande interesse, uma vez que, partículas com tamanhos nanométricos são capazes de penetrar as camadas da pele ou adentrar através do folículo piloso, liberando o fármaco encapsulado (SOARES et al, 2016). Esse tamanho reduzido também pode ser devido ao efeito estabilizador do polímero ao redor das gotículas de Silicium P® (SCHAFFAZICK et al., 2003).

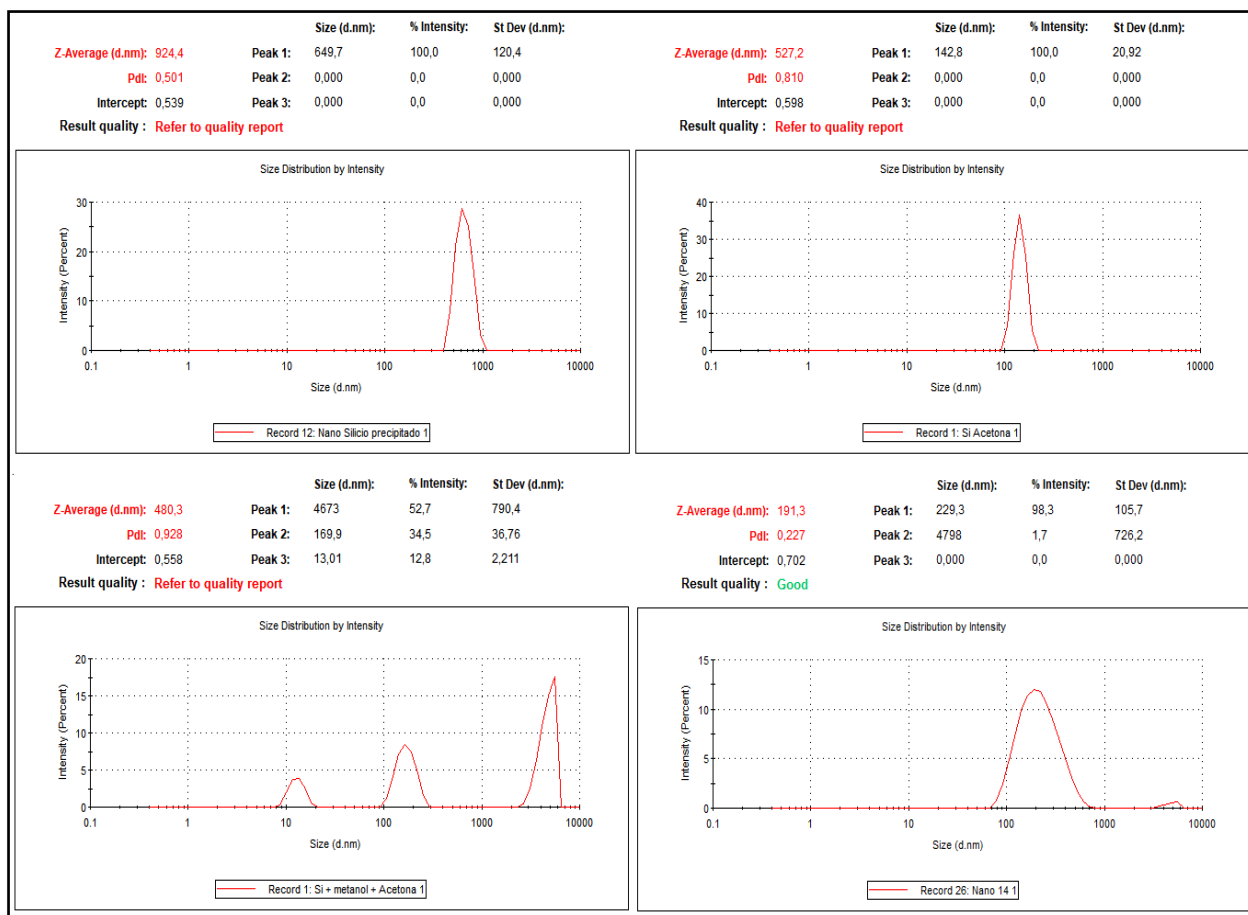
A Figura 9 apresenta o DM e IPD de algumas formulações testadas. As formulações NP-1, NP-2 e NP-3 apresentaram diâmetro médio elevado. Isso pode ter ocorrido devido a não solubilidade adequada do Silicium P®, especialmente no caso da formulação NP-1, onde a presença do metanol melhoraria a solubilidade. Santos (2010) relata que a incorporação do fármaco pode levar a redução do diâmetro da

nanopartícula, enquanto fármacos não solúveis ficam aderidos a superfície do polímero aumentando assim o tamanho.

Pode-se, ainda, perceber que o Silicium P® não interferiu no DM, IPD, PZ e pH das partículas, visto que a solução de nanopartículas inertes (NP-5) apresentou parâmetros semelhantes a formulação NP-4, como demonstrado na Tabela 2.

As nanopartículas NP-4 se mostraram monodispersas, com IPD de 0,225 (DP=1,5). Segundo Avadi et al (2010) o índice de polidispersão pode variar de 0 a 1, sendo que os valores próximos a zero indicam uma solução homogênea e valores superiores a 0,5 indicam uma alta heterogeneidade.

Figura 9- Diâmetro médio (DM) e Índice de Polidispersão (IPD) das formulações NP-1, NP-2, NP-3 e NP-4, respectivamente.



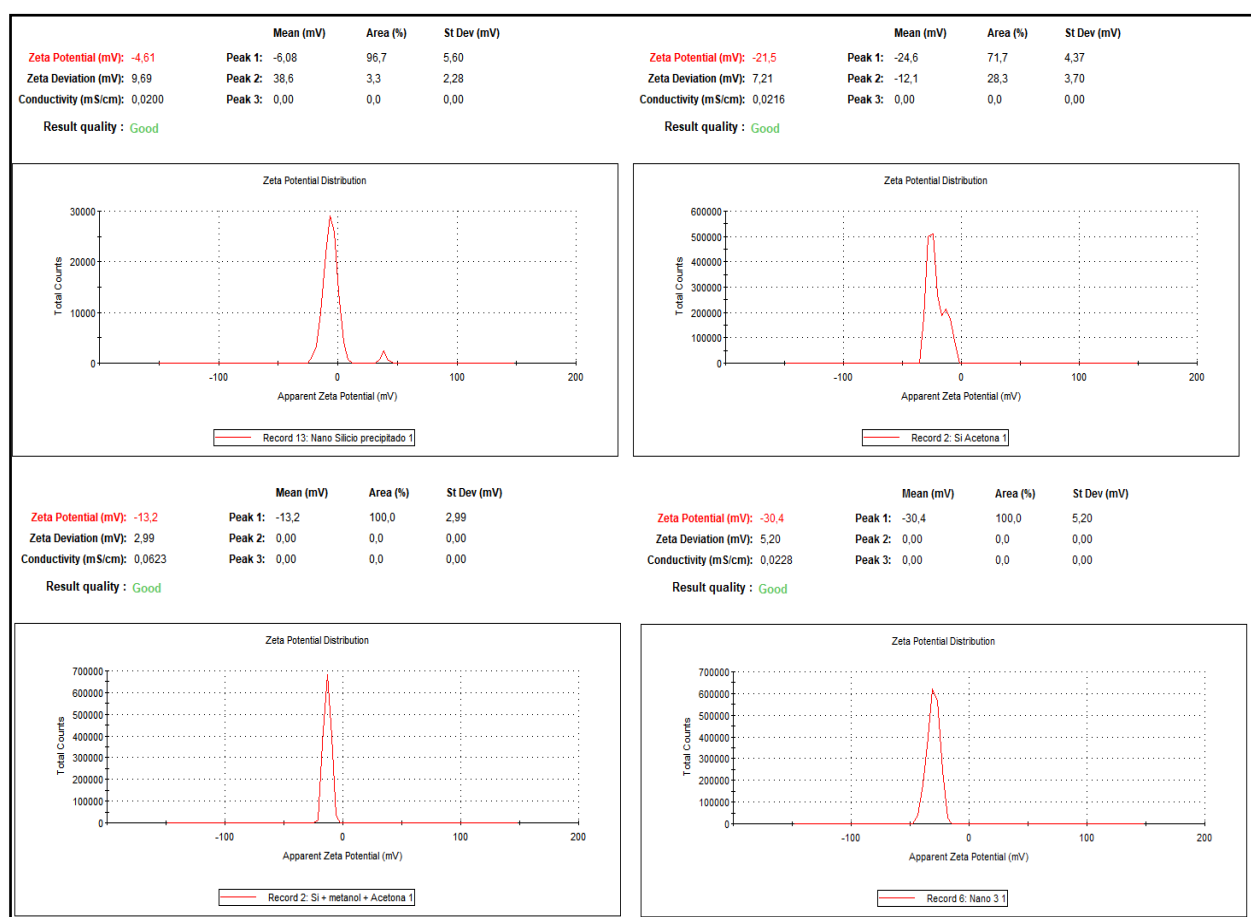
Fonte: o autor (2017).

O PZ reflete o potencial de superfície das partículas, esse é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante (MOSQUEIRA *et al.*, 2000; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003), sendo um indicador de estabilidade das suspensões.

Neves et al (2013) relata que as soluções com PZ próximo a 130I mV são consideradas estáveis já aquelas com PZ próximo a 0 e 5 mV podem produzir mais facilmente o fenômeno de floculação.

Desta forma, pode-se considerar que as NP-4 tendem a ser mais estáveis, já que seu PZ foi de -31,5 (DP=1,7). Esse valor negativo provavelmente foi devido ao grupamento carboxílico nas extremidades da cadeia polimérica da PCL (KIM, 2012). A PCL apresenta caráter aniônico deixando assim as nanopartículas com carga negativa (CALVO *et al.*, 1997; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; FLORES *et al.*, 2011) (Figura 10).

Figura 10- Potencial Zeta (PZ) da solução de nanopartículas NP-1, NP-2, NP-3 e NP-4, respectivamente



Fonte: o autor (2017).

O pH de todas as nanopartículas obtidas apresentaram resultados semelhantes, variando entre 5,17 e 5,61, com desvio padrão de 0,18, esse valor é devido ao grupamento éster presente na PCL (LEONARDI *et al.*, 2002). Considerando esse resultado, todas as formulações apresentaram pH adequados à aplicação na

pele, uma vez que esta apresenta pH levemente ácido entre 4,6 a 5,8. Esse valor de pH é importante porque ajuda na proteção bactericida e fungicida.

Avaliando-se os resultados obtidos, pode se concluir que o método de deposição interfacial de um polímero pré-formado mostrou-se eficiente para o encapsulamento do Silicium P® e que a formulação NP-4 foi a mais adequada.

As NP-4 apresentaram aspecto macroscópico homogêneo, leitoso e opalescente, com reflexo azulado, esse efeito é conhecido como Tyndall, segundo Schaffazick *et al.*, (2002) esse reflexo se deve ao movimento Browniano das partículas, onde as nanopartículas se movimentam devido a forças aleatórias sobre elas, dando então essa coloração azulada (Figura 11).

Figura 11- Solução de nanopartículas de Silicium P®



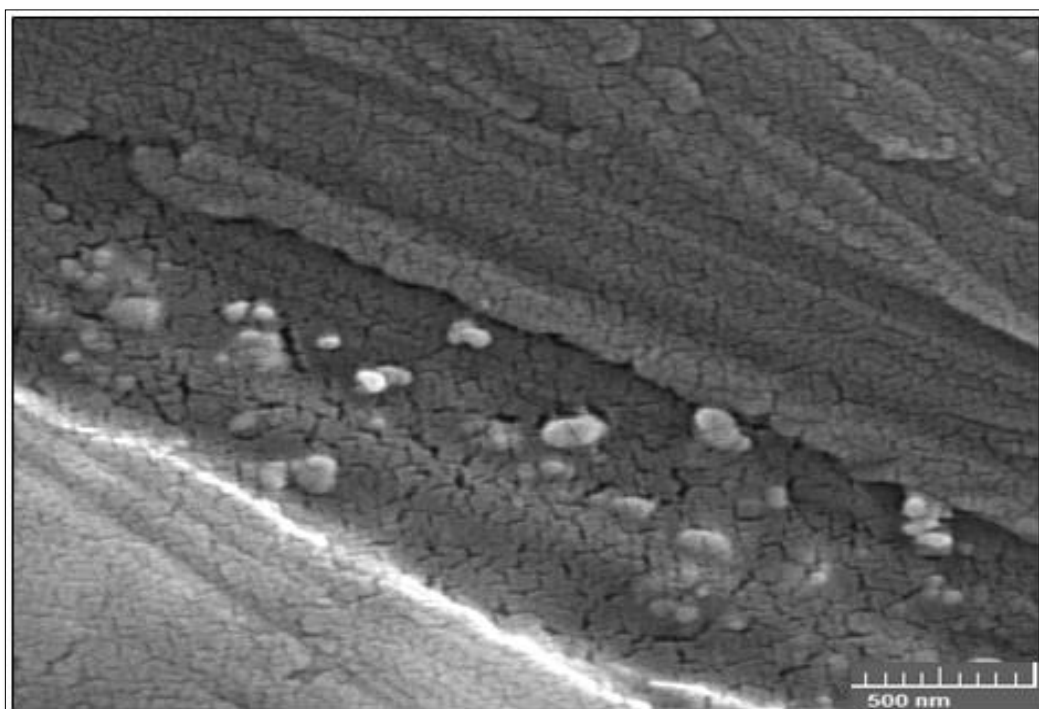
Fonte: o autor (2017).

5.2 Análises morfológicas e de superfície

As NP-4 apresentaram formato esférico e superfície irregular como mostrado nas Figuras 12 e 13. Isso condiz com estudos já realizados anteriormente em nanopartículas de PCL, onde essas apresentaram superfície irregular (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

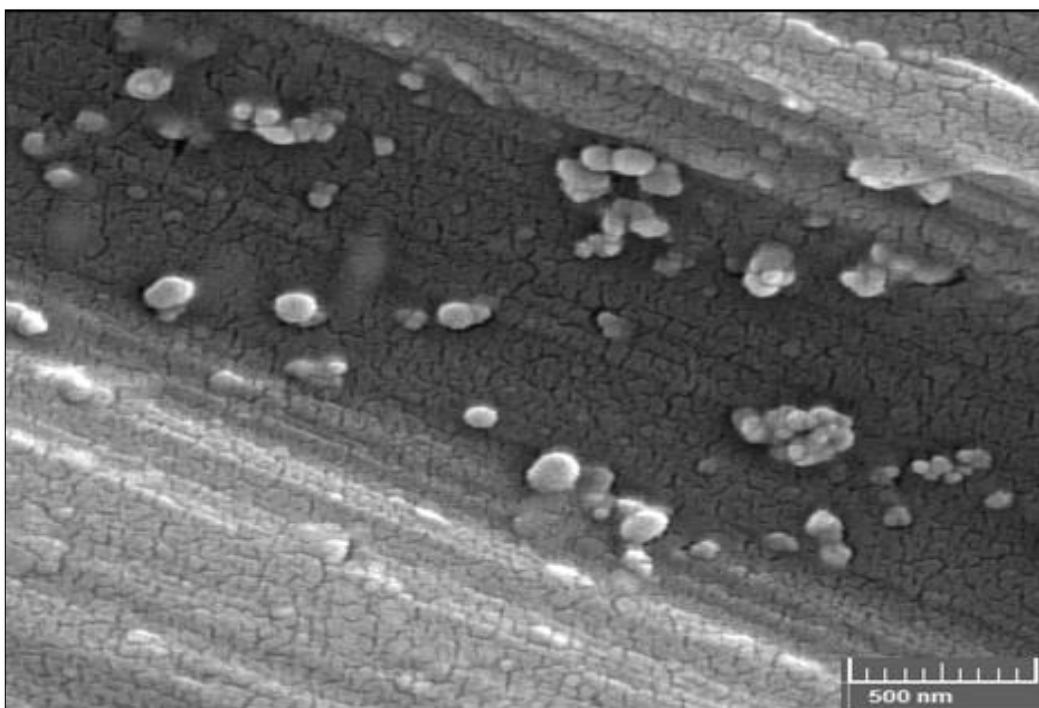
As imagens também confirmaram o tamanho das NP-4 obtidas, conforme a Figura 14, os tamanhos verificados foram 128,5; 146,07; 114,66; 114,68; 157,15; 120,04 nm.

Figura 12- NP-4, obtidas pela técnica de nanoprecipitação de um polímero pré-formado.



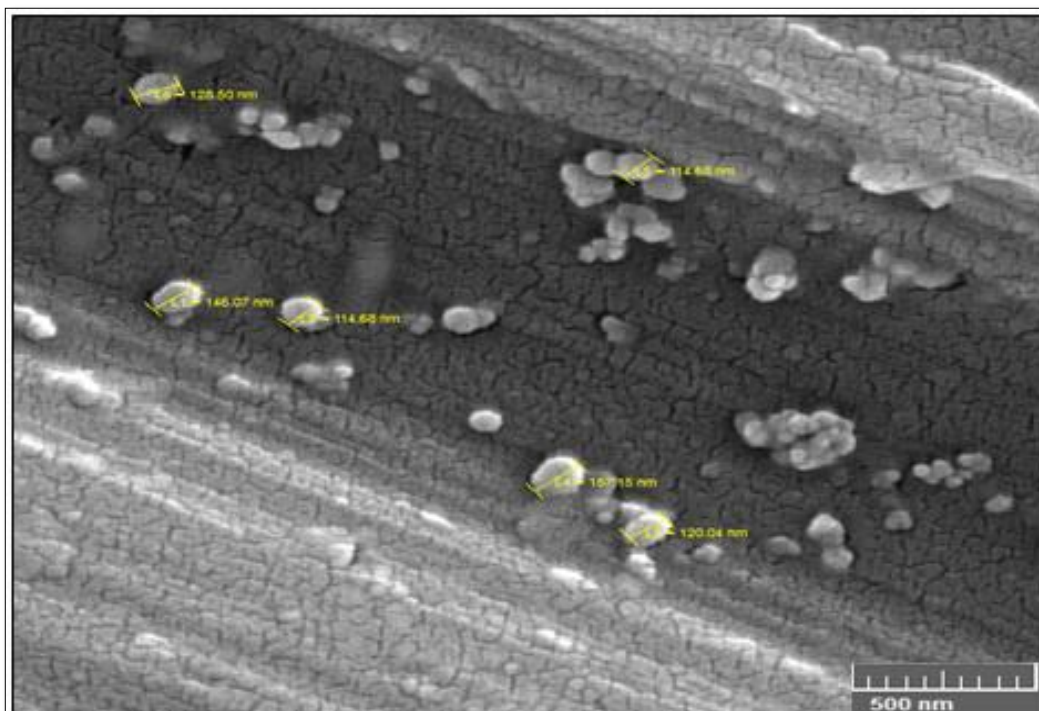
Fonte: o autor (2017)

Figura 13- NP-4, obtidas pela técnica de nanoprecipitação de um polímero pré-formado



Fonte: o autor (2017).

Figura 14- tamanho das nanoapartículas obtidas por nanoprecipitação de um polímero pré-formado. Imagem obtida no microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo (FEG). Tamanhos: 128,5; 146,07; 114,66; 114,68; 157,15; 120,04 nm



Fonte: o autor (2017).

5.3 Avaliação por Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

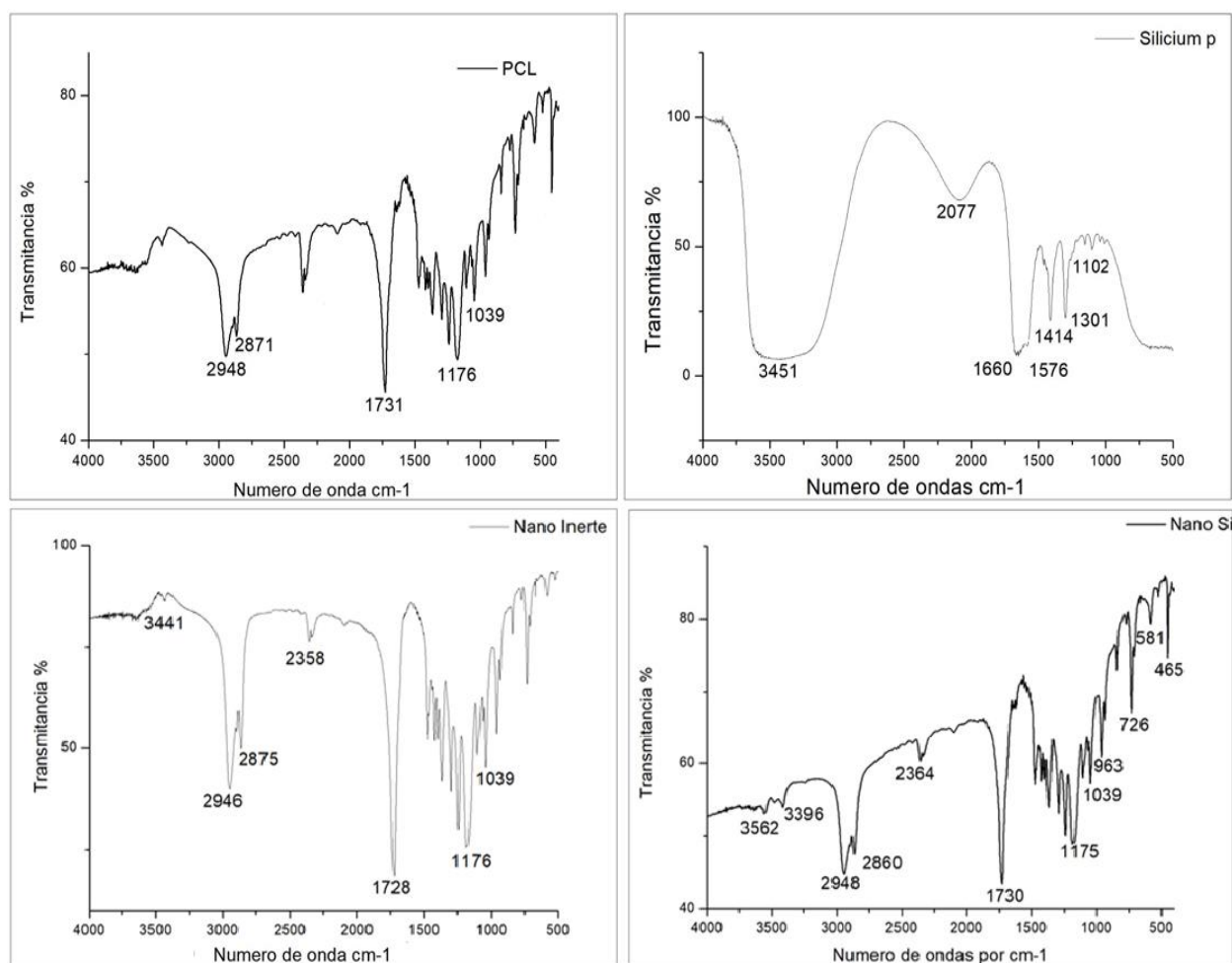
A avaliação por FTIR foi realizada para investigar a interação do polímero com Silicium P®. Chan e colaboradores (2015) relata a importância da interação do fármaco com o polímero em relação a estabilidade da dispersão. Pode ocorrer a formação de ligações de hidrogênio entre o fármaco e o polímero, o que é energeticamente favorável para a interação entre esses dois, assim pode ser alterado o perfil de dissolução do fármaco (HUANG e DAI, 2014). A FTIR é capaz de confirmar a presença de vários grupos funcionais, isso é possível devido a interação das moléculas com a radiação eletromagnética em um processo vibracional. Pavia e colaboradores (2010) afirmaram que o espectro vibracional aparece em bandas, mesmo o processo sendo quantizado, pois cada mudança de nível energético corresponde a uma mudança nos níveis de energia rotacional, assim as linhas se sobrepõem e dão origem a essas bandas.

A Figura 15 representa os espectros do FTIR do polímero PCL, Silicium P®, NP-5 e das NP-4. O espectro da PCL mostra uma banda característica em 1731 cm^{-1} , essa refere-se à vibração de deformação axial do grupamento C=O (POLETTTO et

al., 2007; NADAL, 2016). As bandas em 1176 e 1031 cm^{-1} são referentes ao estiramento da ligação C-O. Em 2948 e 2871 cm^{-1} foram observadas as bandas referentes as vibrações simétricas e assimétricas, respectivamente, do grupamento CH_2 (PAVIA *et al.*, 2010). Também foi observada uma banda com pequena intensidade em 3435 cm^{-1} , essa representa o grupamento O-H, resultante da associação polimérica (SILVERSTEIN *et al.*, 2014).

O espectro obtido para o Silicium P[®] mostrou um estiramento de banda em função da ligação O-H dos grupos silanois, presente na região 3451 cm^{-1} (GUILLEN, 2007; SILVERSTEIN *et al.*, 2014). Em 1660 cm^{-1} aparece uma banda de deformação angular também relacionada à hidroxila dos grupos silanois. Em 1102 cm^{-1} está presente a banda que representa a deformação axial do grupo dos siloxanos (Si-O-Si) (PINTO *et al.*, 2013).

Figura 15- Espectros FTIR do polímero PCL, Silicium P[®], NP-5 e NP-4, respectivamente.



Fonte: o autor (2017)

Em relação ao espectro das NP- 4, percebe-se uma banda em 3562 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação O-H dos grupos silanois presente no Silicium P® (GUILLEN, 2007). As bandas em 2948 e 2860 cm^{-1} são referentes as vibrações simétricas e assimétricas, respectivamente, do grupamento CH_2 característica da PCL.

A diminuição na intensidade pode ser percebida na banda em 1730 cm^{-1} característica da deformação axial do grupamento C=O (POLETTTO *et al.*, 2007) e também das bandas referentes a ligação C-O (1175 e 1039 cm^{-1}) na NP-4, mostrando assim a interação entre a PCL e o fármaco.

5.4 Difração de Raios X

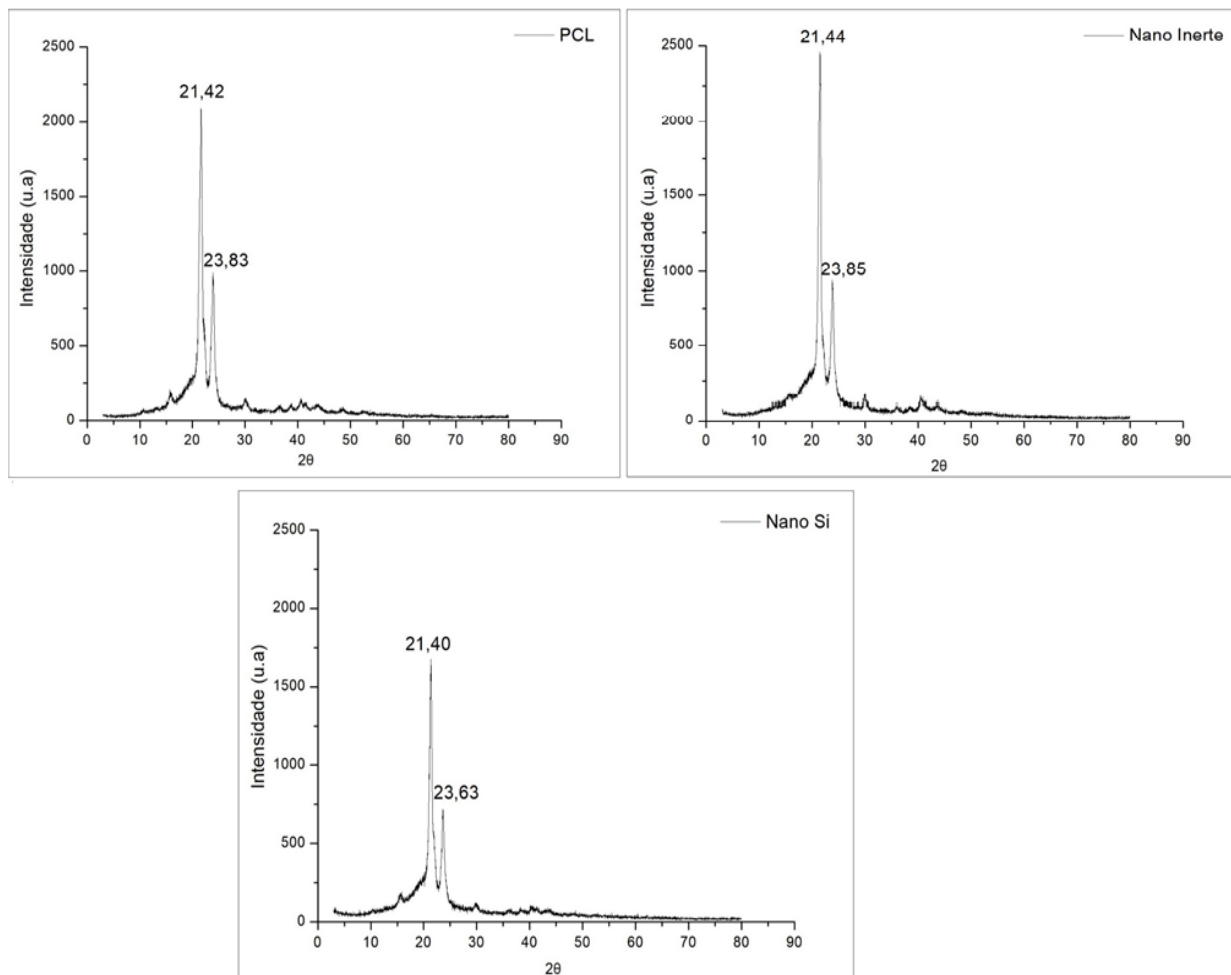
Os raios x são radiações eletromagnéticas com comprimento de onda muito pequeno, sendo sua unidade de medida Angstrom ($1\text{\AA} = 10^{-8}\text{ cm}$). Ao submeter uma amostra cristalina à incidência dos raios x é traçado um difratograma da intensidade da radiação difratada em função do ângulo de incidência. Através desses difratogramas pode-se identificar picos de cristalinidade das amostras, onde esses são característicos de cada amostra (QUEIROS *et al.*, 2006). Essa análise também permite distinguir os compostos cristalinos de compostos amorfos, onde as substâncias cristalinas são representadas por picos e os compostos amorfos não possuem esses picos característicos (DHIRENDRA *et al.*, 2009).

A Figura 16 ilustra os difratogramas da PCL, da NP-5 e NP-4, respectivamente. No difratograma referente a PCL percebe-se picos cristalinos em 2θ de $21,42^\circ$ e $23,83^\circ$, característicos desse polímero, indicando assim que ele possui forma cristalina.

O aparecimento dos picos de cristalinidade depende de várias circunstâncias como da sua estereoquímica, do tratamento térmico recebido e da sua temperatura de transição vítrea. A intensidade dos picos também pode variar de acordo com a massa molar e a densidade da PCL usada para o desenvolvimento das nanopartículas, nesse caso foi utilizado um polímero com cristalinidade bem definida

(WOODRUFF, HUTMACHER, 2010). O difratograma das NP- 5 mostram picos semelhantes aos da PCL.

Figura 16- Difratograma de Raio X da PCL, NP-5 e NP-4, respectivamente



Fonte: o autor (2017).

O mesmo perfil pode ser evidenciado para as NP-4, entretanto, percebe-se uma diminuição nos picos de cristalinidade, o que pode estar relacionado com a interação da PCL com o fármaco. A cristalinidade do fármaco influencia na velocidade da sua dissolução.

5.5 Estudo da estabilidade das suspensões de nanopartículas de Silicium P®

A estabilidade físico-química das nanopartículas armazenadas em geladeira, em temperatura ambiente e com proteção da luz e estufa (37°C), foram avaliadas até 120 dias, nos meses de julho a novembro de 2017, considerando seu aspecto macroscópico, diâmetro médio (DM), índice de polidispersão (IPD), potencial zeta (PZ) e pH.

A suspensão de NP-4 armazenada em geladeira (3°C) mostrou uma maior estabilidade em todos os parâmetros quando comparada com a suspensão de NP-4 mantida nas outras condições avaliadas.

Todas as suspensões mostraram um aumento em relação ao DM e IPD, no entanto, não se observou sedimentação, o que pode ser explicado pela diminuição do movimento Browniano das partículas em temperaturas baixas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Também deve-se considerar, em relação a maior estabilidade das NP-4 armazenadas em geladeira, que em temperaturas mais elevadas a PCL pode sofrer degradação por hidrólise das ligações éster presente na cadeia polimérica, gerando o ácido ϵ - hidroxicaproico. No entanto, essa degradação é muito lenta, uma vez que a penetração da água nas cadeias poliméricas é dificultada pelo seu caráter hidrofóbico (NAIR & LAURENCIN, 2007; SINHA *et al.*, 2004).

Isso respalda os resultados obtidos neste trabalho, uma vez que o DM das NP-4 só começou a ter aumento significativo ($p < 0,001$) a partir de 90 dias de armazenamento em geladeira, enquanto as NP-4 armazenadas em temperatura ambiente ou na estufa apresentaram diferença significativa ($p < 0,001$) do DM a partir de 30 dias. O aumento do tamanho das nanopartículas pode estar relacionado a degradação da PCL em temperatura elevada, evidenciada pela diminuição do pH das suspensões, gerando produtos de tamanhos mais elevados (SINHA *et al.*, 2004).

Os resultados do DM das NP-4 nas diversas condições de armazenamento estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3- Estudo de estabilidade do diâmetro médio (DM) ,nanômetros, da solução de nanopartículas armazenada em geladeira, ambiente protegido da luz e estufa à 37°C (NP-4).

NPs	DM $\pm$ DP nos Tempos Analisados				
	T0	T30	T60	T90	T120
Geladeira	225,0 $\pm$ 0,79	226,6 $\pm$ 0,72	239,1 $\pm$ 0,60	256,6 $\pm$ 0,28	275,2 $\pm$ 8,04
Ambiente	225,0 $\pm$ 0,79	245,5 $\pm$ 0,35	267,8 $\pm$ 0,35	286,1 $\pm$ 0,60	326,5 $\pm$ 1,15
Estufa	225,0 $\pm$ 0,79	247,8 $\pm$ 1,65	268,9 $\pm$ 1,04	287,7 $\pm$ 1,96	336,6 $\pm$ 8,37

Fonte: o autor (2017).

Em relação ao IPD (Tabela 4), os resultados obtidos mostram que não houve diferença significativa nas NP-4 armazenadas em geladeira.

Já para a amostra armazenada em temperatura ambiente notou-se uma diferença significativa ($p < 0,01$) no tempo de 90 dias, também houve diferença significativa ($p < 0,001$) no tempo de 120 dias, comparados ao tempo 0. Em relação as nanopartículas armazenadas em estufa houve um aumento significativo ($p < 0,05$) do IPD em 60 dias e uma diferença significativa ($p < 0,001$) em 90 e 120 dias quando comparadas ao tempo 0.

Tabela 4- Estudo de estabilidade do índice de polidispersão (IPD) da solução de nanopartículas armazenadas em geladeira, ambiente e estufa à 37°C (NP-4).

NPs	IPD $\pm$ DP nos Tempos Analisados				
	T0	T30	T60	T90	T120
Geladeira	0,493 $\pm$ 0,002	0,493 $\pm$ 0,001	0,490 $\pm$ 0,001	0,495 $\pm$ 0,002	0,496 $\pm$ 0,002
Ambiente	0,493 $\pm$ 0,002	0,493 $\pm$ 0,002	0,493 $\pm$ 0,002	0,497 $\pm$ 0,001	0,502 $\pm$ 0,004
Estufa	0,493 $\pm$ 0,002	0,496 $\pm$ 0,001	0,498 $\pm$ 0,001	0,502 $\pm$ 0,005	0,533 $\pm$ 0,003

Fonte: o autor 2017.

Gouvêa e colaboradores (2001) afirma que a diminuição do pH promove uma diminuição do PZ. Embora não se tenha ainda explicação para esse fenômeno, as pesquisas têm apontado uma relação entre esses dois parâmetros. No caso das NP-4 observou-se que quanto mais ácida a suspensão, mais baixos foram os valores de PZ obtidos.

As NP-4 armazenadas em geladeira se mostraram estáveis, em relação ao PZ, em todos os tempos (30, 60,90 e 120 dias), ou seja, não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) quando compradas ao tempo 0, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5- Estudo de estabilidade do potencial zeta (PZ) da solução de nanopartículas armazenadas em geladeira, ambiente protegido da luz e estufa à 37°C (NP-4).

NPs	PZ ± DP nos Tempos Analisados				
	T0	T30	T60	T90	T120
Geladeira	-29,5 ± 0,11	-29,6 ± 0,20	-29,8 ± 0,12	-29,5 ± 0,35	-29,7 ± 0,15
Ambiente	-29,5 ± 0,11	-28,5 ± 0,21	-28,3 ± 0,20	-24,5 ± 0,06	-24,2 ± 0,15
Estufa	-29,5 ± 0,11	-24,5 ± 0,20	-24,6 ± 0,15	-23,6 ± 0,15	-22,6 ± 0,15

Fonte: o autor (2017)

Em relação ao pH, as suspensões de NP-4 armazenadas em geladeira apresentaram diferença significativa ($p < 0,01$) em 60 dias e uma diferença significativa ($p < 0,001$) nos tempos de 90 e 120 dias. Nas soluções armazenadas em temperatura ambiente e em estufa à 37°C, nota-se diferença significativa ($p < 0,001$) tanto no PZ como no pH quando comparada a solução no tempo 0, ou seja, a diminuição do pH interferiu no PZ das soluções (Tabela 6).

A diminuição do pH em um curto período de tempo pode estar relacionada à ionização dos grupos carboxílicos presentes na PCL ou a hidrólise do mesmo (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Tabela 6- Estudo de estabilidade do pH da solução de nanopartículas armazenadas em geladeira, ambiente protegido da luz e estufa à 37°C (NP-4).

NPs	pH ± DP nos Tempos Analisados				
	T0	T30	T60	T90	T120
Geladeira	5,64 ± 0,03	5,62 ± 0,03	5,56 ± 0,03	5,42 ± 0,05	4,95 ± 0,04
Ambiente	5,64 ± 0,03	5,61 ± 0,02	5,24 ± 0,03	5,18 ± 0,03	4,23 ± 0,02
Estufa	5,64 ± 0,03	5,27 ± 0,01	5,17 ± 0,02	5,03 ± 0,02	4,04 ± 0,04

Fonte: o autor (2017).

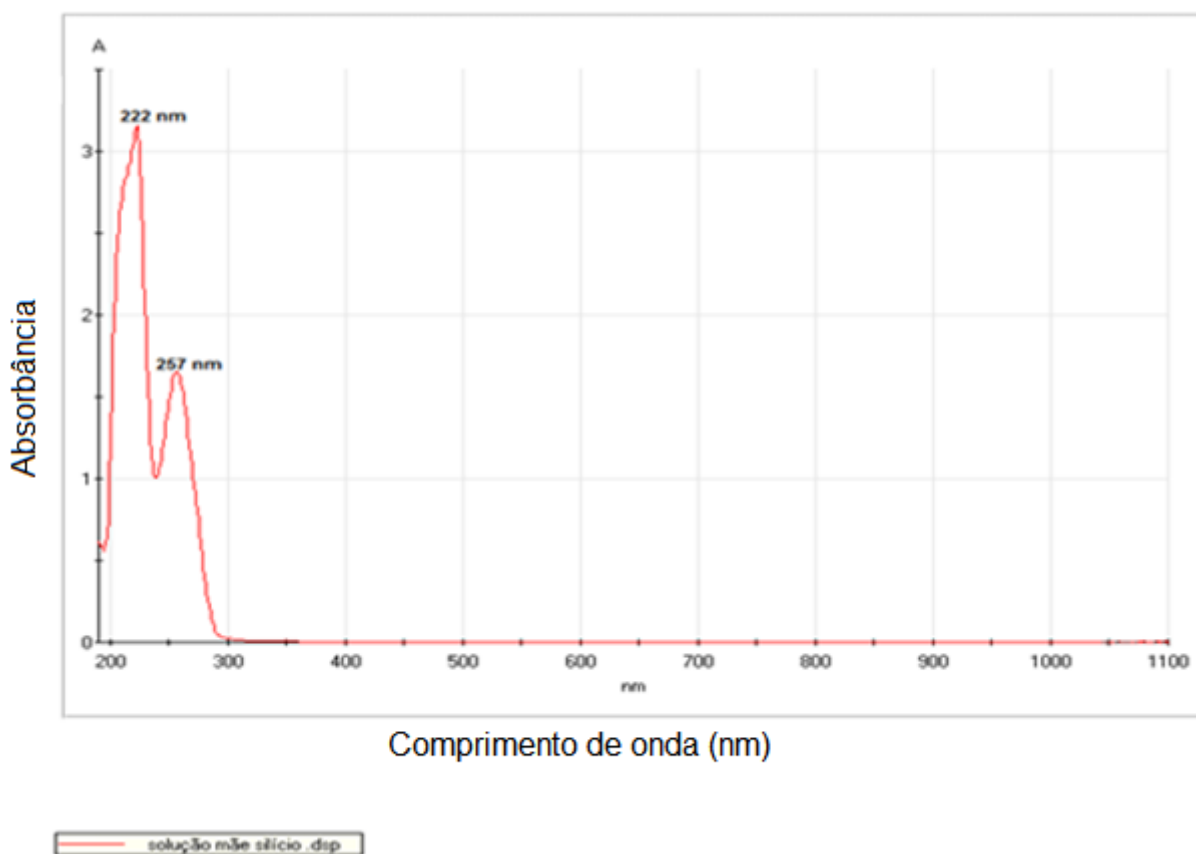
5.6 Determinação do comprimento de onda (λ) de máxima absorção do Silicium P®

Os parâmetros avaliados para a validação do método de quantificação foram seletividade, especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, repetibilidade, precisão intermediária e exatidão (ANVISA, 2017).

Para definir o comprimento de onda de máxima absorção do Silicium P® para a validação do método analítico, foi preparada uma solução do mesmo com metanol e feita uma varredura entre 190 e 1100 nm em espectrofotômetro UV-VIS. Observou-se

uma absorção em 222 nm e 257 nm, no entanto optou-se por utilizar a mais intensa, 222 nm, (Figura 17). Não foram encontrados na literatura estudos referentes a esse parâmetro.

Figura 17- Scan da amostra de Silicium P®.



Fonte: o autor (2017). Varredura em :190-1100 nm. Picos em 222 nm e 257 nm.

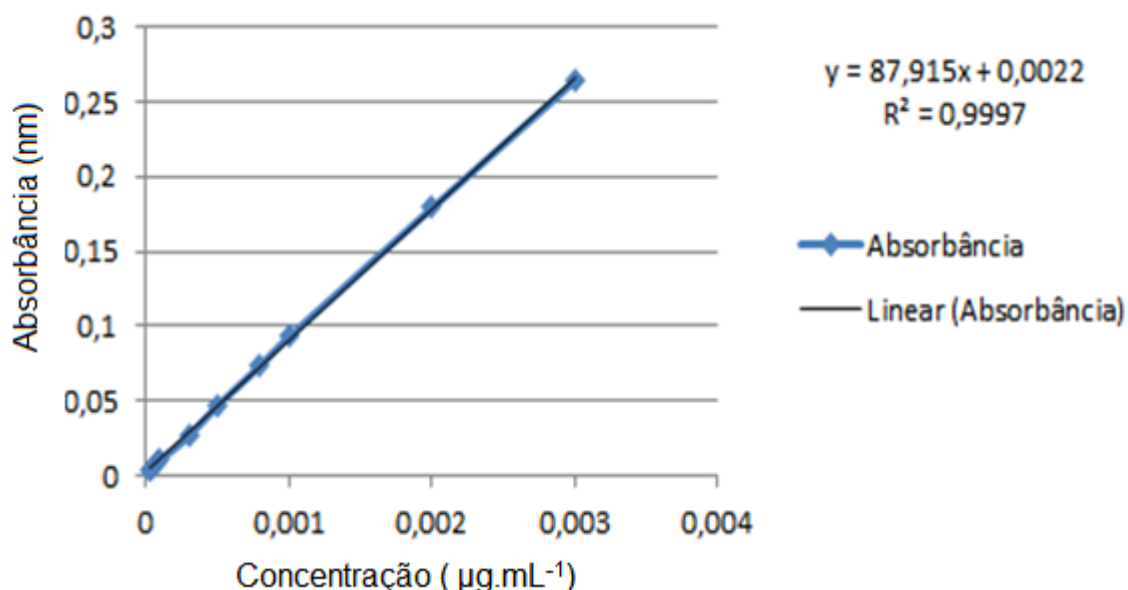
5.7 Eficiência de Encapsulação

5.8 Validação do método analítico para quantificação do Silicium P® presente nas nanopartículas

5.9 Linearidade

O estudo de linearidade do método de quantificação do Silicium P®, realizado em triplicata a partir das absorbâncias, mostrou um coeficiente de correlação (r) médio superior a preconizada pela Anvisa (2017) de 0,990, isso indica uma regressão linear significativa. A equação linear obtida pelo método dos mínimos quadrados é igual a $y = 87,915x + 0,0022$. A Figura 18 ilustra a representação gráfica da curva analítica média, onde estão presentes a equação da reta e o r médio.

Figura 18- Representação gráfica da curva analítica padrão para determinação do Silicium P® obtida por espectrofotometria UV-Vis (222 nm), em metanol



Fonte: o autor (2017)

Através dos dados provenientes do estudo de linearidade foram calculados os limites de detecção e de quantificação, utilizando as equações 1 e 2, respectivamente. O valor obtido para LD foi de 0,003 µg.mL⁻¹ e para o LQ foi de 0,010 µg.mL⁻¹. O LD é definido como a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada e o LQ é a menor quantidade de analito presente em uma amostra a qual pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições do experimento estabelecido (ANVISA, 2017). Esses resultados indicam que o método é adequado para detectar e quantificar o Silicium P® nas nanopartículas na faixa de concentração de 300 µg.mL⁻¹ a 0,08 µg.mL⁻¹.

A precisão avalia a proximidade entre os resultados de absorbância das amostras. Os resultados de repetibilidade e precisão intermediária são expressos em termos de concentração (µg.mL⁻¹) ± DP (desvio padrão) e coeficiente de variação (CV). Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 7. A ANVISA (2003) preconiza valores de coeficiente de variação inferiores a 5 %, nesse caso esse teste analítico escolhido mostrou repetibilidade e precisão intermediária para o analito em estudo, visto que em todas as concentrações os valores foram inferiores a esse.

Tabela 7- Valores experimentais obtidos de Repetibilidade e Precisão intermediária para validação do método de quantificação

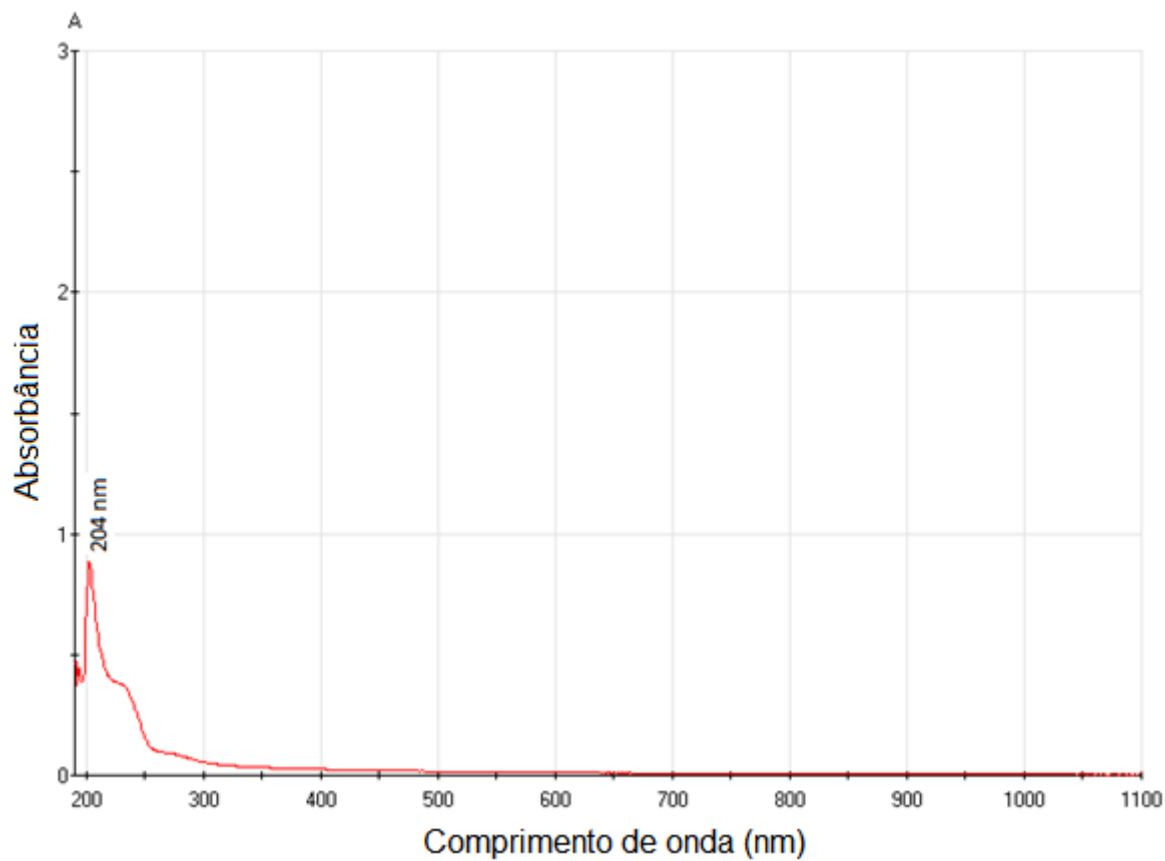
Solução padrão (µg.mL ⁻¹)	Concentração quantificada ± DP (µg.mL ⁻¹)	CV (%)	
Análise de Repetibilidade			
(n=3)			
100	114 ± 0,0025	2,4	
200	210 ± 0,0022	2,8	
300	311 ± 0,0051	1,8	
Precisão Intermediária			
(n=3)			
Dia 1	100	116 ± 0,0027	2,2
	200	215 ± 0,0025	2,9
	300	312 ± 0,0052	2,1
Dia 2	100	115 ± 0,0024	2,3
	200	215 ± 0,0053	2,8
	300	315 ± 0,0047	1,6
Dia 3	100	112 ± 0,0044	4,3
	200	201 ± 0,0053	2,64
	300	294 ± 0,0037	1,41

Fonte: o autor (2017). *DP: desvio padrão; *CV: coeficiente de Variação.

A seletividade do método foi avaliada por meio da comparação dos cromatogramas das nanopartículas contendo o Silicium P[®] e das Nanopartículas inertes, com o intuito de confirmar que os excipientes não interferiram na quantificação do fármaco. O sobrenadante das NP-4 e NP-5 foram diluídos em metanol e analisados por UV-Vis. O espectro da suspensão das NP-5 (Figura 19) mostrou apenas um pico próximo a 204 nm, pertencente ao metanol, visto que seu *cutoff* encontra-se nessa faixa (GUIDE, BURDICK E JACKSON, 1980). O cromatograma das NP- 4 também mostrou um pico de absorbância próximo a 204 nm (metanol) e um pico próximo a 222 nm (Figura 20). Na literatura não há relato do *cutoff* referente ao Silicium P[®]. Esse

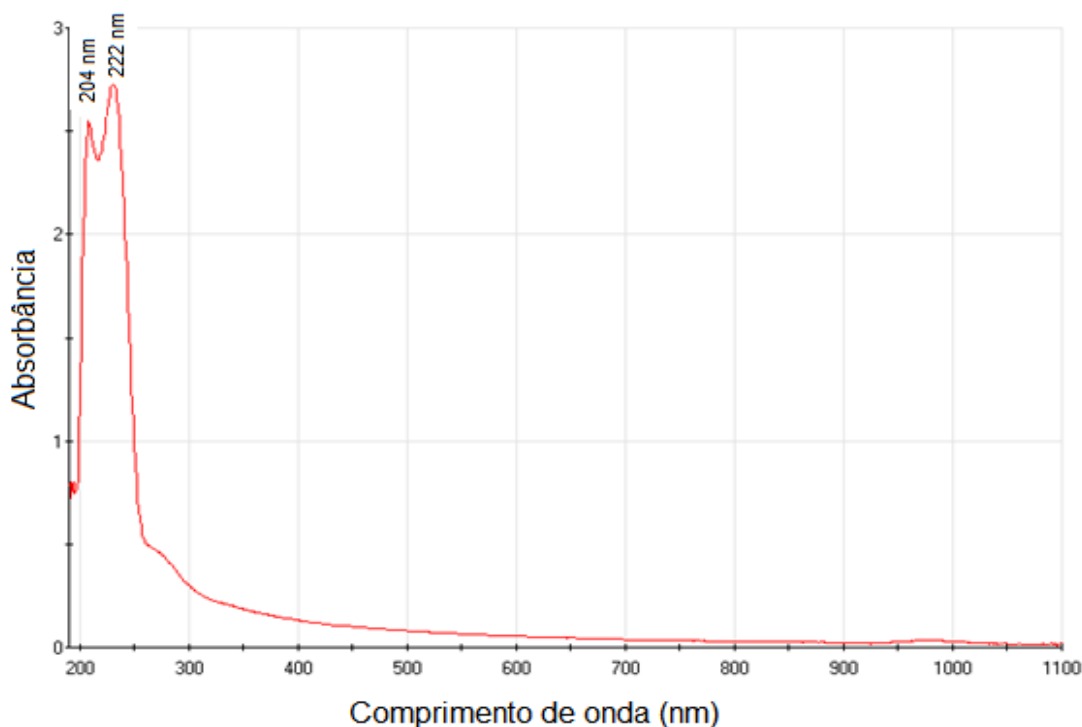
resultado indica que os componentes da formulação não interferiram na quantificação do fármaco, sendo possível confirmar a seletividade do método proposto.

Figura 19- Espectro de absorção do UV-VIS das NP- 5



Fonte: o autor (2017).

Figura 20- Espectro de absorção do UV-Vis das NP- 4



Fonte: o autor (2017).

5.9.1 Determinação da eficiência de encapsulação do Silicium P® nas suspensões de nanopartículas

A eficiência de encapsulação do Silicium P® na solução de nanopartículas foi realizada de forma indireta, sendo determinada a quantidade de fármaco não encapsulado.

As NP-4 apresentaram eficiência de encapsulação (EE%) de $96,9\% \pm 0,008$, com coeficiente de variação de 3,1%, o que demonstra que o método de nanoprecipitação foi eficiente para a encapsulação do Silicium P®. Não há relatos na literatura de estudos sobre a avaliação da eficiência de encapsulação do Silicium P® em nanopartículas pelo método de espectrofotometria UV-VIS.

O método de nanoprecipitação é relatado na literatura como um dos métodos que apresenta melhor eficiência de encapsulação, conseguindo valores sempre superiores a 80%. Logo as soluções de nanopartículas desenvolvidas nesse trabalho apresentam valores condizentes com a literatura em relação a EE, utilizando PCL como polímero formador (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

5.10 Estudo da permeação cutânea das nanopartículas de Silícium P®

A capacidade das nanopartículas permearem depende da sua interação com a pele, bem como das suas propriedades físico-químicas (tamanho, carga da superfície) e das características do polímero (DESAI; PATLOLLA; SINGH, 2010).

A porcentagem da permeação cutânea das NP-4, apresentado na Tabela 8, mostra que até 7 horas de experimento não houve permeação em quantidade significativa. A partir de 8 horas foi observado um aumento progressivo na taxa de permeação, superando 50% em 24h e atingindo 80,53% em 48 horas. O perfil de permeação das nanopartículas está demonstrado na Figura 21.

Os resultados indicaram que a permeação das NP-4 através da pele foi lenta nas primeiras horas, aumentando de forma importante após a nona hora de experimento. Isso pode estar ligado à resistência oferecida pela epiderme à permeação, de forma que as NP-4, atravessaram lentamente, se acumulando nesta camada da pele, até atingirem a derme.

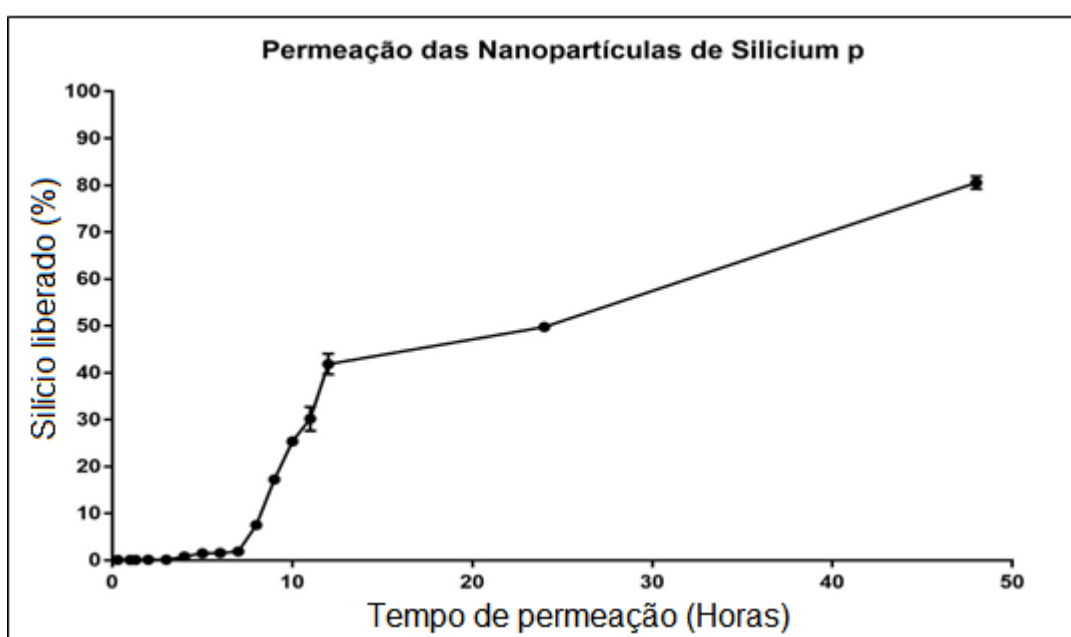
Outro importante fator a considerar é que a encapsulação favorece a liberação controlada do fármaco (SOUZA et al., 2012), permitindo sua atuação por tempo mais prolongado.

Apesar do polímero utilizado no desenvolvimento das NP-4 possuir uma elevada permeabilidade, o que facilita a passagem pela barreira de proteção da pele até a chegada na derme, onde encontram-se os fibroblastos (SINHA *et al.*, 2002), a permeação depende de um conjunto de fatores que resultam em uma maior ou menor permeação.

Tabela 8- Porcentagem de permeação das NP-4 em pele Humana.

Tempo de Permeação	% de permeação $\pm$ DP
30 minutos	$0,07 \pm 0,001$
1 hora e 30 minutos	$0,07 \pm 0,001$
2 horas	$0,08 \pm 0,001$
2 horas 30 minutos	$0,10 \pm 0,006$
3 horas	$0,11 \pm 0,004$
4 horas	$0,71 \pm 0,090$
5 horas	$1,12 \pm 0,083$
6 horas	$1,58 \pm 0,206$
7 horas	$1,83 \pm 0,041$
8 horas	$7,18 \pm 0,608$
9 horas	$17,55 \pm 0,723$
10 horas	$25,39 \pm 0,643$
11 horas	$31,10 \pm 2,570$
12 horas	$42,59 \pm 2,208$
24 horas	$50,23 \pm 0,433$
48 horas	$80,53 \pm 1,364$

Fonte: o autor (2017). *DP: desvio padrão.

Figura 21- Porcentagem de permeação cutânea das NP-4 em pele humana.

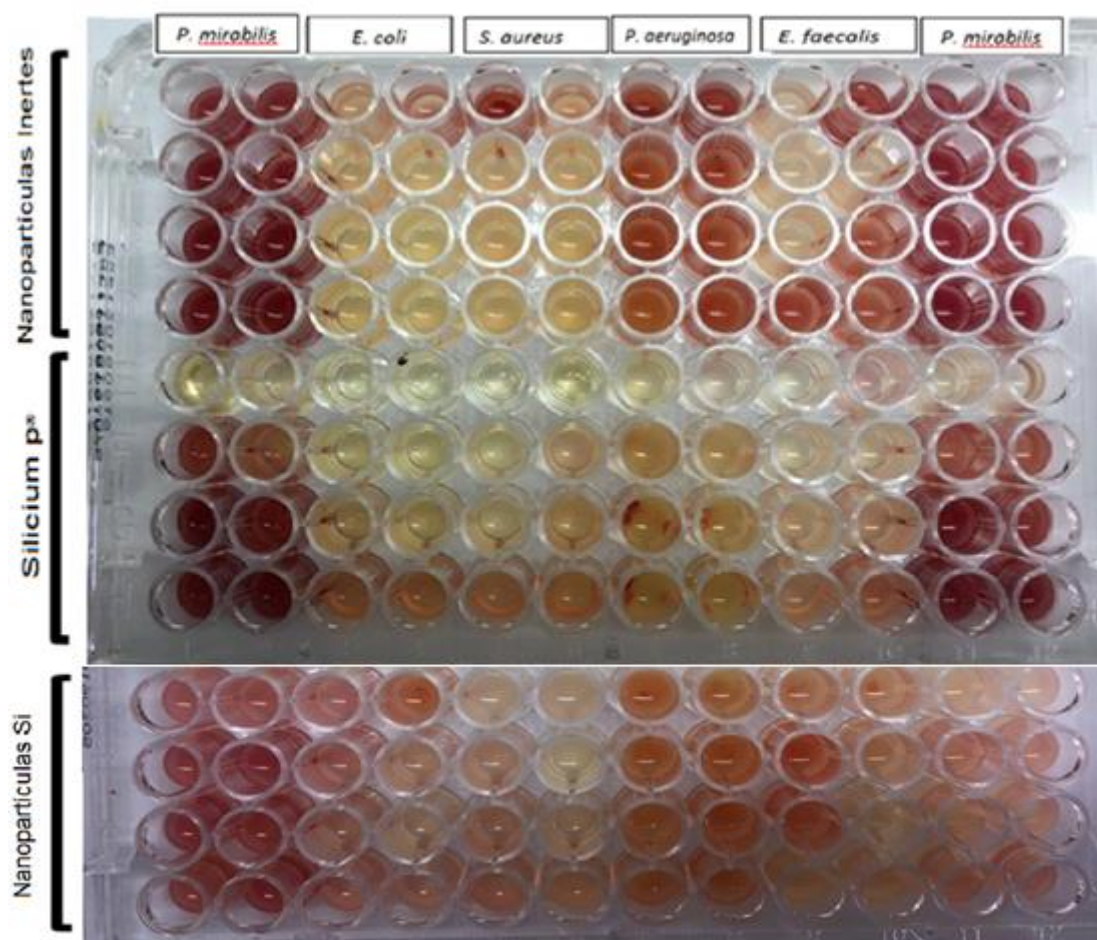
Fonte: o autor (2017).

5.11 Avaliação da atividade antimicrobiana

Os testes para avaliar a atividade antimicrobiana foram realizados em duplicata, em bactérias gram positivas (*E. faecalis*, *S. aureus*) e negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. mirabilis*).

Para o teste da concentração inibitória mínima (CIM) foi utilizado o corante TTC. Ocorreu a mudança de coloração nos poços onde não houve ação das amostras, como mostrado na Figura 22. O mecanismo de reação do TCC baseia-se na dupla tetrazólio/formazano, ele é reduzido na presença de bactérias viáveis formando cristais de formazan com coloração vermelha, essa é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis (MOUSSA *et al.*, 2013).

Figura 22- Microplaca após a coloração com TCC 3%.



Fonte: o autor (2017).

A CIM foi interpretada sendo a menor concentração do fármaco capaz de inibir o crescimento bacteriano e a concentração bactericida mínima (CBM) sendo aquela que impedir o crescimento dos microrganismos (ANDREWS, 2001).

Em relação às nanopartículas inertes (NP-5) não houve ação antimicrobiana frente a nenhuma cepa testada.

O Silicium P[®] mostrou uma CIM em 2,5 mg.mL⁻¹, não há relatos na literatura sobre a ação bacteriostática do mesmo.

O teste para verificar CBM foi realizado com a menor concentração que houve a ação bacteriostática para cada amostra, no entanto nenhuma das amostras demonstrou-se eficaz.

6 CONCLUSÃO

Foi possível concluir que o Silicium P[®] foi encapsulado de forma eficiente nas nanopartículas poliméricas obtidas por nanoprecipitação.

As nanopartículas poliméricas contendo silício (NP-4) apresentaram características adequadas aos objetivos do trabalho, diâmetro médio de 208,1 nm (DP= 1,8), índice de polidispersão (IPD) de 0,227 (DP= 1,5) e PZ de -30,4 (DP=1,7). Essas nanopartículas tiveram maior estabilidade quando acondicionadas em geladeira.

O método analítico desenvolvido para a quantificação do Silicium P[®] nas nanopartículas foi linear, seletivo e preciso e pôde ser utilizado para a determinação da eficiência de encapsulação e permeação do ativo nas nanopartículas poliméricas.

As Nanopartículas contendo Silicium P[®] foram capazes de atravessar a pele, em uma permeação lenta, atingindo o máximo de permeação em 48h (80,53%).

As nanopartículas contendo Silicium P[®] não apresentaram potencial como agente antimicrobiana contra nenhuma das cepas testadas.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, Amit et al. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 164, n. 1, p. 26-40, 2012.
- ALEXIS, Frank et al. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Molecular pharmaceuticals**, v. 5, n. 4, p. 505-515, 2008.
- ALLEN, Christopher DC; OKADA, Takaharu; CYSTER, Jason G. Germinal-center organization and cellular dynamics. **Immunity**, v. 27, n. 2, p. 190-202, 2007.
- ALLEN, Loyd; ANSEL, Howard C. **Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
- ANDREWS, Jennifer M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. suppl 1, p. 5-16, 2001.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Publicada no DOU nº141, de 25 de julho de 2017.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para a validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília: 02 de julho de 2003.
- ARAÚJO, Laíza Magalhães de. **Mestrado em Avaliação da expressão gênica de colágeno em fibroblastos tratados com extratos de fungos endofíticos. 2015**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) — Universidade de Brasília, Brasília, 2015
- AVADI, M. R. et al. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, p. 58–63, 2010.
- BABY, André Rolim et al. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rotina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 233-248, 2008.
- BAREL, A. et al. Effect of oral intake of choline-stabilized orthosilicic acid on skin, nails and hair in women with photodamaged skin. **Archives of dermatological research**, v. 297, n. 4, p. 147-153, 2005.
- BARRY B.W, Dermatological Formulation. Percutaneous absorption. **Drug and**
- BATISTELA, M. A., CHORILLI, M., & LEONARDI, G. R. Abordagens no estudo do envelhecimento cutâneo em diferentes etnias. **Rev. Bras. Farm**, 88(2), 59-62 (2007).
- BELLIA, J. P. et al. Silicon and aluminium and their inter-relationship in serum and urine after renal transplantation. **European journal of clinical investigation**, v. 24, n. 10, p. 703-710, 1994.

BLOUZA, I. L. et al. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for pediatric use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 325, p. 124-131, 2006.

BOGDANOVA, S.; PAJEVA, I.; NIKOLOVA, P.; TSAKOVSKA, I.; MÜLLER, B. Interactions of Poly(vinylpyrrolidone) with Ibuprofen and Naproxen: Experimental and Modeling Studie. **Pharmaceutical Research**, v. 22(5), p. 806–815, 2005.

Bolzinger, M. A., Briançon, S., Pelletier, J., & Chevalier, Y. (2012). Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 17(3), 156-165.

BOMMELAER, Jean et al. **Products for cutaneous applications with cosmetic and/or therapeutic effects**. U.S. Patent n. 5,264,207, 23 nov. 1993.

BRINCAT, M. et al. Skin collagen changes in postmenopausal women receiving different regimens of estrogen therapy. **Obstetrics & Gynecology**, v. 70, n. 1, p. 123-127, 1987.

BROWN, Judith C.; TIMPL, Rupert. The collagen superfamily. **International archives of allergy and immunology**, v. 107, n. 4, p. 484-490, 1995.

BUCK, Donald W.; ALAM, Murad; KIM, John YS. Injectable fillers for facial rejuvenation: a review. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 62, n. 1, p. 11-18, 2009.

CALOMME, Mario R.; BERGHE, Dirk A. Vanden. Supplementation of calves with stabilized orthosilicic acid. **Biological trace element research**, v. 56, n. 2, p. 153-165, 1997.

CALVO, Pilar; VILA-JATO, José L.; ALONSO, María J. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 153, n. 1, p. 41-50, 1997.

CANTY, Elizabeth G.; KADLER, Karl E. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. **Journal of cell science**, v. 118, n. 7, p. 1341-1353, 2005.

CARLISLE, Edith M. Essentiality and function of silicon. In: **Biochemistry of silicon and related problems**, p. 231-253. Springer US, 1978.

CHAN, S-Y.; CHUNG, Y-Y.; CHEAH, X-Z.; TAN, E. Y-L.; QUAH, J. The characterization and dissolution performances of spray dried solid dispersion of ketoprofen in hydrophilic carriers. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, p. 372–385, 2015.

CHAWLA, Jugminder S.; AMIJI, Mansoor M. Biodegradable poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. **International journal of pharmaceutics**, v. 249, n. 1, p. 127-138, 2002.

CHRISTOFOLI, M. Efeito dos óleos essenciais de *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum riedelianum* nanoencapsulados em *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B. **Dissertação de Mestrado, Programa de pós Graduação em Ciências Agrárias**, IF Goiano campus Rio Verde, 2014.

DAMODARAM,S, PARKIN,KL, FENNEMA,OR. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 2010.

DASH, Tapan K.; KONKIMALLA, V. Badireenath. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 158, n. 1, p. 15-33, 2012.

DESAI, Pinaki; PATLOLLA, Ram R.; SINGH, Mandip. Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. **Molecular membrane biology**, v. 27, n. 7, p. 247-259, 2010.

DHIRENDRA, K. et al. Solid dispersions: a review. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 22, n. 2, 2009.

FESSI, H. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1–R4, 1989.

FLORES, F. C. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: Protection Against Volatilization. **Química nova**, v. 34, n. 6, p. 968–972, 2011.

GILCHREST, B. A. A review of skin ageing and its medical therapy. **British journal of dermatology**, v. 135, n. 6, p. 867-875, 1996.

GOUVÊA, D.; MURAD, B. Influência das características ácido-básicas da superfície dos óxidos na estabilidade de suspensões cerâmicas de Al. **Cerâmica**, v. 47, n. 301, p. 51, 2001.

GUIDE, High Purity Solvent. Burdick and Jackson Laboratories. **Muskegon, MI**, p. 138, 1980.

GUILLEN, Joyce Santos Quenca. **Caracterização e análises do ascorbato de monometilsilanotriol em formulações cosméticas**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Handbook for Personal Care and Cosmetic Products. William Andrew Publishing. Inc., 2005, p. 77 – 100.

HANS, M. L., & LOWMAN, A. M. (2002). Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, 6(4), 319-327.

HENRIQUE, J. S., FALCARE, R. S., & LOPES, P. S. (2006). Sistemas de liberação controlada. **Pharmacia Brasileira**, 56, 22.

HOLLAND, S. J., TIGHE, B. J., GOULD, P. L. Polymers for biodegradable medical devices, I. Potential of polyesters as controlled macromolecular release systems. **J. Control. Rel**, v. 4, p. 155-180, 1986.

HUANG, Y. & DAI, W-G. Fundamental aspects of solid dispersion technology for poorly soluble drugs. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v.4(1), p. 18–25, 2014.

Jenkins, G. Molecular mechanisms of skin aging. Elsevier 2002 (123): 801-810.

JEPPS, Owen G. et al. Modeling the human skin barrier—Towards a better understanding of dermal absorption. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 2, p. 152-168, 2013.

JUGDAOHSINGH, R. Silicon and bone health. **The journal of nutrition, health & aging**, v. 11, n. 2, p. 99, 2007.

KARANDE, Pankaj; MITRAGOTRI, Samir. Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1788, n. 11, p. 2362-2373, 2009.

KEMKEN, J.; ZIEGLER, A.; MÜLLER, B. W. Investigations into the Pharmacodynamic Effects of Dermally Administered Microemulsions Containing β -Blockers. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 43, n. 10, p. 679-684, 1991.

KHAN, Wahid et al. Collagen. **Biodegradable polymers in clinical use and clinical development**, p. 59-89, 2011.

KHAVKIN, Jeannie; ELLIS, David AF. Aging skin: histology, physiology, and pathology. **Facial plastic surgery clinics of North America**, v. 19, n. 2, p. 229-234, 2011.

KIM, Sanggu et al. Preparation and physicochemical characterization of trans-resveratrol nanoparticles by temperature-controlled antisolvent precipitation. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 1, p. 37-42, 2012.

KREUTER, J. et al. Influence of the type of surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after its delivery across the blood-brain barrier using surfactant-coated nanoparticles. **Journal of Control Release**, v. 49, p. 81-87, 1997.

LANSDOWN, A. B.; WILLIAMS, A. A prospective analysis of the role of silicon in wound care. *Journal of wound care*, v. 16, n. 9, p. 404-407, 2007.

LEHNINGER, A. L. *Principios de Bioquímica*. 2ª Edição: Sarvier. **São Paulo**, 1995.

LEONARDI, Gislaine Ricci; GASPAR, Lorena Rigo; CAMPOS, PMBGM. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **An Bras Dermatol**, v. 77, n. 5, p. 563-569, 2002.

LI, Y. Q. et al. Antibacterial characteristics and mechanisms of ϵ -poly-lysine against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Controlled**, v. 43, p. 22-27, 2014.

LI, Zhaoping et al. Absorption of silicon from artesian aquifer water and its impact on bone health in postmenopausal women: a 12 week pilot study. **Nutrition journal**, v. 9, n. 1, p. 44, 2010

LINCE, Federica; MARCHISIO, Daniele L.; BARRESI, Antonello A. Strategies to control the particle size distribution of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. **Journal of colloid and interface science**, v. 322, n. 2, p. 505-515, 2008.

MACDONALD, Helen M. et al. Dietary silicon interacts with oestrogen to influence bone health: evidence from the Aberdeen Prospective Osteoporosis Screening Study. **Bone**, v. 50, n. 3, p. 681-687, 2012.

MARCOLONGO, R. (2003). *Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo)*.

MICHNIAK-KOHN, Bozena B. et al. Skin. **Delivery System Handbook for Personal Care and Cosmetic Products**, p. 77-100, 2005.

MINE, Solène et al. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. **PLoS One**, v. 3, n. 12, p. e4066, 2008.

MOGHIMI, S. M., HUNTER, A. C., & MURRAY, J. C. (2005). Nanomedicine: current status and future prospects. **The FASEB journal**, 19(3), 311-330.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles-a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113–142, 2010.

MOSQUEIRA, Vanessa Carla Furtado et al. Poly (D, L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 89, n. 5, p. 614-626, 2000.

MOUSSA, Shaaban H. et al. Tetrazolium/formazan test as an efficient method to determine fungal chitosan antimicrobial activity. **Journal of Mycology**, v. 2013, 2013.

MUNDARGI, Raghavendra C. et al. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly (D, L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. **Journal of Controlled Release**, v. 125, n. 3, p. 193-209, 2008.

NADAL, Jessica Mendes. Desenvolvimento tecnológico, caracterização e *avaliação in vitro e in vivo* de sistemas poliméricos contendo ácido ferúlico. 2016.

NAGPAL, Kalpana; SINGH, Shailendra Kumar; MISHRA, Dina Nath. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 11, p. 1423-1430, 2010.

NAIR, Lakshmi S.; LAURENCIN, Cato T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in polymer science**, v. 32, n. 8, p. 762-798, 2007.

NASHASHIBI, T. S.; AUSTIN, I. G.; SEAKLE, T. M. Photoluminescence in pure and doped amorphous silicon. **Philosophical Magazine**, v. 35, n. 3, p. 831-835, 1977.

NAYLOR, Elizabeth C.; WATSON, Rachel EB; SHERRATT, Michael J. Molecular aspects of skin ageing. **Maturitas**, v. 69, n. 3, p. 249-256, 2011.

NCCLS. **National Committee for Clinical Laboratory**. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard - M7-A6, 6 ed, v. 23. 2003.

NEVES, A. R. et al. Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability. **Int Journal of Nanomedicine**, v. 8, p.177-187, 2013.

NICHOLS, Joi A.; KATIYAR, Santosh K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of dermatological research**, v. 302, n. 2, p. 71-83, 2010.

NORONHA, C. M. et al. Optimization of α -tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 806-903, 2013.

PAVIA, Donald L. et al. **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learning, 2010.

Pharmaceutical Science. New York: Marcel Dekker, v 50, p.480, 1983.

Physiology and Penetration Pathways. In: ROSEN, M. R. (Ed.), **Delivery System**

PIEZ, Karl A. Structure and assembly of the native collagen fibril. **Connective tissue research**, v. 10, n. 1, p. 25-36, 1982.

PILLAI, Omathanu; PANCHAGNULA, Ramesh. Polymers in drug delivery. **Current opinion in chemical biology**, v. 5, n. 4, p. 447-451, 2001.

PINTO, Vitor Hugo et al. Síntese e caracterização de um novo agente sililante-imobilização na sílica gel em meio aquoso. 2013.

POLETO, F. S.; JAGER, E.; RÉ, M. I.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Rate-modulating PHBV/PCL microparticles containing weak acid model drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, p. 70-80, 2007.

QUEIROZ, Robson Aurélio Silveira de et al. Compósito de policaprolactona e carbonato de cálcio (PCLC): um novo biomaterial para enxerto ósseo. 2006.

RAUT, Sushil et al. Lecithin organogel: A unique micellar system for the delivery of bioactive agents in the treatment of skin aging. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 1, p. 8-15, 2012.

RAWAT, Manju et al. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 9, p. 1790-1798, 2006.

REFFITT, D. M. et al. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. **Bone**, v. 32, n. 2, p. 127-135, 2003.

REVISTA BIOTEC, Silicium P®, 2017.

RIEKES, M. K.; BARBOZA, F. M.; VECCHIA, D. D.; BOHATCH, M. J.; FARAGO, P. V.; FERNANDES, D.; SILVA, M. A. S.; STULZER, H. K. Evaluation of oral carvedilol microparticles prepared by simple emulsion technique using poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and polycaprolactone as polymers. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, p. 962-968, 2011.

RIGG, P. C., & BARRY, B. W. (1990). Shed snake skin and hairless mouse skin as model membranes for human skin during permeation studies. **Journal of investigative dermatology**, 94(2), 235-240.

RITTIÉ, Laure; FISHER, Gary J. Natural and sun-induced aging of human skin. **Cold spring harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 1, p. a015370, 2015.

ROBBERECHT, Harry et al. Dietary silicon intake in Belgium: sources, availability from foods, and human serum levels. **Science of the total environment**, v. 407, n. 16, p. 4777-4782, 2009.

RODELLA, Luigi Fabrizio et al. A review of the effects of dietary silicon intake on bone homeostasis and regeneration. *The journal of nutrition, health & aging*, v. 18, n. 9, p. 820, 2014.

ROSA, Derval S. et al. Avaliação da Biodegradação de Poli-β-(Hidroxibutirato), Poli-β-(Hidroxibutirato-co-valerato) e Poli-ε-(caprolactona) em Solo Compostado. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 12, n. 4, 2002.

SAKATA, Shoei et al. Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, n. 4, p. 733-737, 2007.

SALTZMAN, W. Mark. **Drug delivery: engineering principles for drug therapy**. Oxford University Press, 2001.

SANTOS, J. S. Nanopartículas-Aplicações cosméticas e farmacêuticas. **Pharmabooks editora**, 2010.

SARTORELLI, P. et al. Percutaneous penetration studies for risk assessment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 8, n. 2, p. 133-152, 2000.

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova. São Paulo. Vol. 26, n. 5 (2003), p. 726-737**, 2003.

SCHAFFAZICK, Scheila REZENDE et al. Caracterização e estudo de estabilidade de suspensões de nanocápsulas e de nanoesferas poliméricas contendo diclofenaco. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 2, p. 99-106, 2002.

SCHMOOK, Fritz P.; MEINGASSNER, Josef G.; BILLICH, Andreas. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. **International journal of pharmaceutics**, v. 215, n. 1, p. 51-56, 2001.

SECRET, Emilie et al. Antibody-Functionalized Porous Silicon Nanoparticles for Vectorization of Hydrophobic Drugs. **Advanced healthcare materials**, v. 2, n. 5, p. 718-727, 2013.

SHAH, Vinod P.; ELKINS, Jerome S.; WILLIAMS, Roger L. Evaluation of the test system used for in vitro release of drugs for topical dermatological drug products. **Pharmaceutical development and technology**, v. 4, n. 3, p. 377-385, 1994.

SILVA, J. A., APOLINÁRIO, A. C., SOUZA, M. S. R., DAMASCENO, B. P. G. L., & MEDEIROS, A. C. D. (2010). Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada**, 31(3), 125-131.

SILVERSTEIN, Robert M. et al. **Spectrometric identification of organic compounds**. John Wiley & sons, 2014.

SINHA, V. R. et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International journal of pharmaceutics**, v. 274, n. 1, p. 1-33, 2004.

SOARES, Amanda Queiroz. Polímeros Biodegradáveis: Novas perspectivas para as ciências farmacêuticas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, 2005.

SOARES, Margarida et al. Permeação cutânea: desafios e oportunidades. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 3, 2016.

SOPPIMATH, Kumaresh S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of controlled release**, v. 70, n. 1, p. 1-20, 2001.

SOUZA, Luiza Ribeiro. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for dermatomycosis treatment. **Current Nanoscience**, v. 8, n. 4, p. 512-519, 2012.

SUPAC, S. S. Guidance for Industry. Nonsterile Semisolid Dosage Forms. Scale-up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls. **Vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation** May, 1997.

TIGGES, Julia et al. The hallmarks of fibroblast ageing. **Mechanisms of ageing and development**, v. 138, p. 26-44, 2014.

TRAUTINGER, F. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. **Clinical and experimental dermatology**, v. 26, n. 7, p. 573-577, 2001.

UITTO, Jouni; BERNSTEIN, Eric F. Molecular mechanisms of cutaneous aging: connective tissue alterations in the dermis. In: **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. Elsevier, 1998. p. 41-44.

UTHUS, Eric O.; SEABORN, Carol D. Deliberations and evaluations of the approaches, endpoints and paradigms for dietary recommendations of the other trace elements. **The Journal of nutrition**, v. 126, n. 9, p. 2452S, 1996.

VAN VLERKEN, Lilian E.; VYAS, Tushar K.; AMIJI, Mansoor M. Poly (ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery. **Pharmaceutical research**, v. 24, n. 8, p. 1405-1414, 2007.

VARGAS, D. M.; AUDÍ, L.; CARRASCOSA, A. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 367-370, 1997.

VERHAEGEN, Pauline D. et al. Adaptation of the dermal collagen structure of human skin and scar tissue in response to stretch: an experimental study. **Wound Repair and Regeneration**, v. 20, n. 5, p. 658-666, 2012.

WOODRUFF, Maria Ann; HUTMACHER, Dietmar Werner. The return of a forgotten polymer—polycaprolactone in the 21st century. **Progress in polymer science**, v. 35, n. 10, p. 1217-1256, 2010.

WOODRUFF, Maria Ann; HUTMACHER, Dietmar Werner. The return of a forgotten polymer—polycaprolactone in the 21st century. **Progress in polymer science**, v. 35, n. 10, p. 1217-1256, 2010.

ZHANG, F. et al. Polymer-coated nanoparticles: a universal tool for biolabelling experiments. **Small**, v. 7, n. 22, p. 3113–27, 2011.

ZOUBOULIS, Christos C.; MAKRANTONAKI, Evgenia. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. **Clinics in dermatology**, v. 29, n. 1, p. 3-14, 2011.

ZOUBOULIS, Christos C.; MAKRANTONAKI, Evgenia. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. **Clinics in dermatology**, v. 29, n. 1, p. 3-14, 2011.