

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS
MESTRADO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS**

TATIANI ALMEIDA BURATO BOAVENTURA

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
OURO EM MEMBRANAS POLIMÉRICAS**

**CRICIÚMA
2016**

TATIANI ALMEIDA BURATO BOAVENTURA

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
ÓURO EM MEMBRANAS POLIMÉRICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. PhD. Alexandre Gonçalves Dal-Bó.

Co-orientador: Prof. Dr. Tiago Frizon

**CRICIÚMA
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B662a Boaventura, Tatiani Almeida Burato.

Avaliação da interação de nanopartículas de ouro em membranas poliméricas / Tatiani Almeida Burato Boaventura ; orientador: Alexandre Gonçalves Dal-Bó, coorientador: Tiago Frizon. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2016.

82 p: il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Criciúma, SC, 2016.

1. Nanopartículas de ouro. 2. Membranas poliméricas.
3. Nanotecnologia. 4. Adesivos transdérmicos – Uso terapêutico. I. Título.

CDD. 22^a ed. 620.5

Bibliotecária Rosângela Westrupp – CRB 14º/364

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

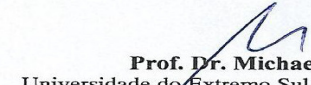
Tatiani Almeida Burato Boaventura

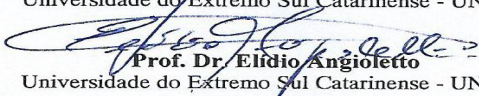
Avaliação da interação nanopartículas de ouro em membranas poliméricas.

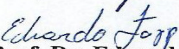
Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (Área de concentração: Tecnologia de Materiais) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Criciúma, SC, 30 de maio de 2016.

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Michael Peterson
Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC


Prof. Dr. Elídio Angioleto
Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC


Prof. Dr. Eduardo Zapp
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Dedico esta dissertação aos meus
pais Delelmo Burato e Dorotéia
Almeida Burato meus maiores
incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda esta jornada.

Ao Professor, e ex-orientador Marcos Marques da Silva Paula, pelo apoio, incentivo e oportunidade de trabalhar sob sua orientação e contribuindo desta forma para que eu obtivesse as ferramentas necessárias em continuar nesta caminhada.

Ao professor, orientador Alexandre Gonçalves Dal-Bó pelo suporte, pelas orientações, correções, incentivos e ensinamentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais da UNESC que, de uma forma ou de outra, contribuíram com a realização deste trabalho.

Agradeço também ao Fundo de Apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação Superior e a Universidade do Extremo Sul Catarinense pelo apoio.

A todos os integrantes do Laboratório LASICOM pela parceria na realização das análises.

Aos meus pais, irmãos, meu marido e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que chegasse até esta etapa da minha vida.

“No meio da dificuldade
encontrasse a oportunidade”

Albert Einstein

RESUMO

Neste estudo, propomos a preparação e caracterização de membranas poliméricas como agentes miméticos para o estudo da interação de nanopartículas metálicas de ouro do tamanho de 11 nm para fins terapêuticos. Tem como objetivo sintetizar e estudar a difusão em célula de Franz com as nanopartículas de ouro em membranas poliméricas com polímero comercial de PS-b-PMMA (poli(estireno)-b-poli(metil metacrilato)). As nanopartículas de ouro foram caracterizadas quanto à morfologia, tamanho e seu grau de dispersão pelas técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET), técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS), raios-X a baixos ângulos (SAXS) e espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-vis). A cinética de difusão da membrana foi acompanhado por espectroscopia de UV-vis, no comprimento de onda de máxima absorção das nanopartículas de ouro, observa-se um efeito hipsocromico leve após 72 horas, esse efeito foi observado também nas análises de MET. Devido a baixo potencial zeta, levaram uma leve diminuição da concentração de nanopartículas de ouro em suspensão. A técnica DLS apresentou uma boa curva mono-exponencial, indicando uma solução aquosa em nanopartículas esféricas com baixa polidispersidade com diâmetro ($2R_H = 11,0$ nm). Observa-se ainda a presença de formação de grandes agregados com estruturas flexíveis. A imagem obtida por MET confirma a existência nanopartículas esféricas com tamanhos aproximados de 11 nm. A distância entre as lamelas foi de aproximadamente 30 nm, possuindo uma condição para difusão de materiais com tamanhos inferiores a 30 nm.

Palavras-chave: Nanopartícula metálica de ouro, PS-b-PMMA (poli(estireno)-b-poli(metil metacrilato)), membranas poliméricas

ABSTRACT

In this study, we propose the preparation and characterization of polymer membranes as a mimetic agents for the study of the interaction of metallic gold nanoparticles of 11 nm size for therapeutic purposes. It aims to synthesize and study the diffusion cell Franz with gold nanoparticles in polymeric membranes of the commercial polymer PS-b-PMMA (poly (styrene) -b-poly (methyl methacrylate)). The gold nanoparticles were characterized for morphology, size and degree of dispersion by transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS), small-angle X-ray scattering (SAXS) and spectrophotometer (UV-visible). The kinetics of diffusion of the membrane was monitored by UV-vis spectroscopy at wavelength of maximum absorption of gold nanoparticles, there is a slight hipsocromico effect after 72 hours, this effect was also observed in TEM analysis. Due to low zeta potential, led a slight decrease in the concentration of gold nanoparticles in suspension. The DLS technique showed a good mono-exponential curve, indicating a spherical nanoparticles in aqueous solution with low polydispersity diameter ($2RH = 11.0$ nm). It is observed also the presence of formation of large aggregates with flexíveis. A structures image obtained by TEM confirms the existence of spherical nanoparticles with approximate sizes of 11 nm. The distance between the lamellae was about 30 nm, having a condition for diffusion of materials with sizes below 30 nm.

Keywords: metallic gold nanoparticle, PS-b-PMMA (poly (styrene) -b-poly (methyl methacrylate)), polymeric membranes.

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Transmitância	54
Equação 2 - Absorbância.....	54
Equação 3 - Lambert-Beer	55
Equação 4 - Coeficiente de difusão aparente	55
Equação 5 - Vetor de onda	56
Equação 6 - Raio hidrodinâmico	56

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação dos diferentes tamanhos de nanopartículas. .	29
Figura 2 - Perfil de liberação alcançado através de uma terapia convencional (A) e por meio de uma liberação controlada (B).....	32
Figura 3 - Sistema de Reservatório (a) e Sistema de Matriz(b).....	35
Figura 4 - Sistema representativo da Pele.	36
Figura 5 - Representação esquemática dos dois principais métodos de preparação de micelas de copolímeros em bloco.	38
Figura 6 - Processo de preparação de nanopartículas e encapsulação do princípio ativo, por dissolução direta (A), por diálise (B) e por microemulsão óleo em água (o/w) (C).	40
Figura 7 - Representação esquemática das morfologias com cadeias de copolímeros em bloco.	41
Figura 8 - Imagens de MEV com diferentes blocos: (a e c) orientação paralela dos cilindros de PMMA sobre as superfícies não neutralizadas de SiO ₂ , e (b e d) orientação vertical dos cilindros sobre um substrato de SiO ₂ recobertos com uma camada de PS-s-PMMA.	42
Figura 9 - Sistema representativo da Fonoforese.	45
Figura 10 - Sistema representativo da Iontoforese.	46
Figura 11 - Sistema célula de Franz.	47
Figura 12 - Representação esquemática do aparelho de estudo permeabilidade usando Célula de Difusão.	48
Figura 13 - Membrana de PS-b-PMMA.....	50
Figura 14 - Membrana de PS-b-PMMA impregnadas com nanopartículas de ouro 11 nm.	51
Figura 15 - Sistema célula Franz Horizontal.	52
Figura 16 - Esquema básico Célula de difusão de Franz horizontal	53
Figura 17 - Apresentação da distribuição de RH da amostra de NP 11 nm.....	61
Figura 18 - Imagem obtida por (MET) das nanopartículas de GNP em água, após a coloração negativa.	62
Figura 19 - Perfil de SAXS para as amostras de nanopartículas de ouro, dissolvidos em água a 25°C com o tratamento da curva utilizando o programa SASFit.....	63
Figura 20 - Filmes do copolímero comercial de PS-b-PMMA preparados	

por <i>casting</i> , organizados em escala nanométrica, observados por MET.....	65
Figura 21 a - Apresenta as imagens de AFM Filmes poliméricos de PS-b-PMMA preparados por <i>casting</i> impregnados com as nanopartículas de ouro.	66
Figura 22 b - Filmes poliméricos de PS-b-PMMA preparados por <i>casting</i> , dopados com nanopartículas de ouro de 11 nm observado por AFM.	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Análise de Espectrofotometria de UV-vis com NP 11 nm com diferentes concentrações.....	59
Gráfico 2 - Espectrofotometria de UV-vis com GNP 11 no compartimento doador durante 24, 48 e 72 horas.	69
Gráfico 3 - Espectrofotometria de UV-vis no compartimento receptor durante 24, 48 e 72 horas.	70
Gráfico 4 - Espectrofotometria de UV-vis com a membrana impregnada de GNP no compartimento doador solução salina analisadas durante 24, 48 e 72 horas.	71
Gráfico 5 - Espectrofotometria de UV-vis com a membrana impregnada com GNP no compartimento receptor, solução salina analisadas durante 24, 48 e 72 horas.	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscópio de Força Atômica
DDS	Sistema de entrega Transdérmica, do inglês <i>Drug Delivery</i>
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DLS	Técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
NSF	<i>National Science Foundation</i>
GNP	Nanopartícula(s) de ouro, do inglês <i>Gold Nanoparticles</i>
HAuCl ₄	Ácido Tetracloroáurico
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
NAC	N-acetilcisteína
NP	Nanopartículas
NSF	<i>National Science Foundation</i>
PMAA	Poli (metil metacrilato)
PS	Poli-estireno
PS-b-PMMA	Poli(estireno)-b-poli(metil metacrilato)
PZ	Potencial zeta
QELS	Espalhamento de Luz Quase-elástico
RPM	Rotação por Minuto
RPS	Plasmons de Superfície
SAXS	Raios-X a Baixos Ângulos
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão, do inglês <i>Transmission Electron Microscopy</i>
THF	Tetrahidrofurano
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV-Vis	Espectroscopia no Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	30
2.1 GERAL	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
3.1 TRATAMENTO TRANSDÉRMICO	31
3.2 SISTEMA DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO	31
3.3 PELE	35
3.4 TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS	36
3.5 INCORPORAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS	38
3.6 POLÍMEROS ASSOCIADOS ÀS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	43
3.7 NANOPARTÍCULAS DE OURO	43
3.8 AGENTES FACILITADORES	44
3.8.1 Ultrassom e Fonoforese	44
3.8.2 Iontoforese	45
3.9. CÉLULA DE FRANZ.....	46
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 SINTESE DAS NANOPARTICULAS DE OURO DE 11NM.....	49
4.2 PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS PS-B-PMMA (POLI(ESTIRENO)-B-POLI(METIL METACRILATO)).....	50
4.3 ANÁLISE DE DIFUSÃO DE MEMBRANAS	51
4.4 ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-VIS	53
4.5 ANÁLISE DE DLS (DYNAMIC LIGHT SCATTERING).....	55
4.6 POTENCIAL ZETA	56
4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	57
4.8 ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS) 57	
4.9 MICROSCOPIO DE FORÇA ATÔMICA (AFM)	57
5 RESULTADOS	58
5.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	58
5.2 POTENCIAL ZETA	59
5.3 ANÁLISE DE DLS (DYNAMIC LIGHT SCATTERING).....	59
5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) ...	61
5.5 ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS) 62	
5.6 MEMBRANAS DE PS-B-PMMA	63
5.7 ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-VIS	68
6 DISCUSSÃO	73
7 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem sido observado um grande crescimento no estudo de sistemas coloidais, devido à crescente demanda por vários setores industriais, sobretudo os associados ao desenvolvimento de nanomateriais ou materiais com controle morfológico na escala nanométrica (LOVINGER, 2005).

Cada vez mais, o conceito de nanociência e tecnologia chamam a atenção do público em geral através da mídia eletrônica e escrita. Mais de 30 milhões de dólares foram disponibilizados pela National Science Foundation (NSF), em 2005, somente para a criação de programas para informar o público sobre nanotecnologia, e abordar as questões sociais relacionadas (LOVINGER, 2005).

O grande interesse no desenvolvimento da nanociência deriva na promessa de manipular a matéria átomo por átomo, molécula por molécula de criar dispositivos com desempenhos e funcionalidades superiores aos fornecidos pela atual tecnologia (LOVINGER, 2005).

As aplicações são muito amplas, indo desde a indústria eletrônica, onde os agregados nanometricamente espaçados são utilizados para desenvolver circuitos e dispositivos também na escala nanométrica até a indústria médico-farmacêutica onde o desenvolvimento e aprimoramento de sistemas que permitam a liberação controlada de fármacos e nutrientes (LOVINGER, 2005).

Atualmente existem diversas formas de administração de fármacos para o tratamento de doenças, como administração oral, nasal, parenteral, dérmica e oftálmica. A utilização da via de administração dérmica por adesivos com liberação controlada de fármacos destaca-se na atualidade como um dos mais promissores, em base que o fármaco deve atingir com exatidão o alvo pretendido. Esta técnica demonstra-se menos dolorosa, mais aceitável e mais eficiente que alguns tratamentos tradicionais, onde a entrega de fármaco ocorre de forma gradual e contínua (FELICE et al., 2014).

As pesquisas com a administração de medicação com nanopartículas (NP), vem mostrando que minimiza os efeitos colaterais, reduz a toxicidade e reduz a quantidade de dose ou aplicação. Isso envolve a criação de materiais funcionais, controle sobre seus tamanhos físicos e novas propriedades químicas que são drasticamente diferentes nas dimensões nanométricas (PRADEEP, 2008).

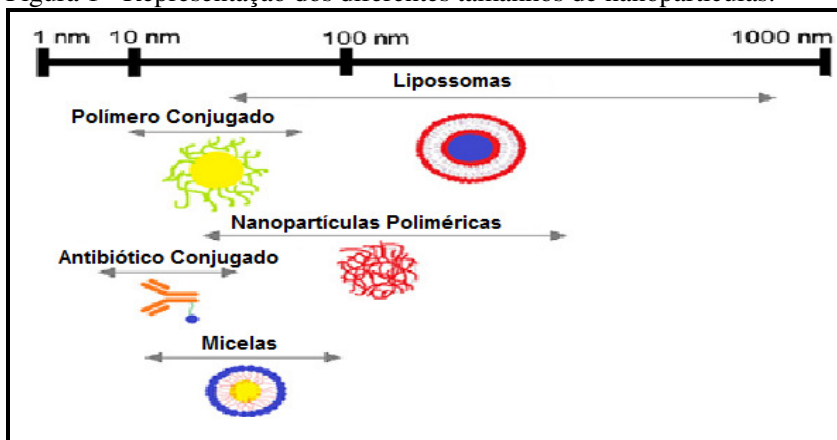
Os tamanhos destes materiais criam uma forte possibilidade de interações com o sistema biológico, visto que os sistemas biológicos

contêm vários componentes que estão nas dimensões nanométricas (proteínas, ácidos nucleicos, membranas) possibilitando possíveis sinergias com os nanosistemas e componentes biológicos. Assim, destacam a utilização de adesivos transdérmicos em conjunto com nanopartículas carreadoras de fármacos pode se tornar viável para o tratamento de doenças através de um sistema mais eficiente, chamado de *Drug Delivery Systems* (DDS). DDS são sistemas utilizados para a administração de fármacos de forma controlada para alcançar um efeito terapêutico (PRADEEP, 2008).

A nanotecnologia aliado aos sistemas de administração de fármacos, poderá ser a evolução da medicina para os próximos anos com grande variedade de usos, podendo salvar um grande número de vidas, mas isso também exige prazos para comercialização. É um dos desenvolvimentos da investigação médica relacionado a resultados mais imediatos principalmente na área do câncer e tem dados que inclui 130 medicamentos à base de nano e mais de 125 dispositivos para diagnóstico (SPARKS, 2012).

Com o aprofundamento dos estudos sistemas DDS aumentam a possibilidade de direcionamento específico, devido ao seu tamanho os seus efeitos colaterais e com um período de liberação da droga mais longo. Hoje em dia existem vários DDS em estudo, como por exemplo, os lipossomas, nanopartículas, dendrímeros, micelas e nanobastões (FELICE et al., 2014). A Figura 1 ilustra a escala de nanopartículas com diferentes tamanhos:

Figura 1 - Representação dos diferentes tamanhos de nanopartículas.



Fonte: Felice et al. (2014).

Recentes estudos realizado por Cardoso et al. (2014) com nanopartículas metálicas no córtex cerebral em ratos, foram submetidos à administração de nanopartículas com tamanhos 11 e 30 nanômetros. Os dados mostraram danos mais elevado no DNA com GNP (nanopartícula de ouro) com tamanho 30 nm e danos menores com GNP com tamanho 11 nm.

Zortea e colaboradores (2014) investigaram os efeitos do ultrassom pulsado e nanopartículas de ouro em ratos após serem submetidos a exercícios físicos prolongados, promovendo danos musculares. Os resultados apresentaram redução inflamatória com o uso combinado de ultra-som e GNP, representando uma importante alternativa no tratamento de lesões musculares. Em outro estudo, Dohnert e colaboradores (2012) utilizaram iontoforese como alternativa de transporte para as GNP e diclofenaco dietilamônio. Neste artigo, os resultados mostraram eficácia na administração do fármaco em ratos portadores de tendinites.

Dando continuidade a estes estudos, propomos a preparação e caracterização de membranas poliméricas como agentes miméticos para o estudo da interação de nanopartículas metálicas de ouro do tamanho de 11 nm para fins terapêuticos. A escolha do tamanho de partículas de ouro está baseado nos estudos recentes realizado por Cardoso et al., (2014) na qual demonstraram índices mais elevados de danos ao DNA com GNP com tamanho de 30 nm e danos menores comparados com 10 nm.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Este trabalho tem como objetivo de sintetizar e estudar a difusão das nanopartículas de ouro em membranas do copolímero comercial PS-b-PMMA (poli(estireno)-b-poli(metil metacrilato)) utilizando célula de Franz.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Sintetizar nanopartículas de ouro de tamanho controlado de 11 nm;
- ✓ Caracterizar as nanopartículas de ouro de quanto a morfologia, tamanho e seu grau de dispersão pelas técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e as técnicas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e de raios-X a baixos ângulos (SAXS) e espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-visível);
- ✓ Avaliar a estabilidade das partículas de ouro quanto seu potencial zeta (PZ);
- ✓ Preparar as membranas do copolímero PS-b-PMMA em “*filmes poliméricos*” através da técnica de *casting*;
- ✓ Caracterizar a morfologia dos filmes das membranas preparadas por *casting* na ausência e presença de nanopartículas de ouro de 11nm por meio das técnicas de microscopia de transmissão eletrônica (MET) e microscopia de força atômica (AFM);
- ✓ Avaliar a interação das nanopartículas com os filmes poliméricos.
- ✓ Acompanhar a permeação e difusão das nanopartículas de ouro pelo filme de PS-b-PMMA (poli(estireno)-b-poli(metil metacrilato)) por Espectrofotometria de UV-vis.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 TRATAMENTO TRANSDÉRMICO

Sistema de entrega transdérmica de fármacos (TDDS) é uma alternativa para minimizar e evitar as limitações administração de drogas oral e parenteral. A entrega transdérmica permite a permeação de fármacos através da pele e a circulação sistêmica (AMIT et al., 2012).

Dentro dos sistemas TDDS são utilizados as membranas de alto controle com polímeros inertes, onde a droga é fisicamente misturada no polímero e moldado em um disco com área e espessura pré-definida. As taxas de liberação da droga podem ser determinadas pela lei de Difusão de Fick (AMIT et al., 2012).

O tratamento de doenças através da utilização de adesivos transdérmicos é promissor por diversos fatores. Um dos principais é o controle da entrega de fármaco. A maioria das formas tradicionais, utilizadas em tratamentos médicos proporciona variação na concentração do fármaco e não possibilitam a entrega contínua e sistemática de medicação como ocorre com os adesivos transdérmicos (PRABHAKAR et al, 2013). Também podem ser citados como objetivos e vantagens da liberação controlada de fármacos a garantia da segurança e a melhora na eficácia dos medicamentos, bem como a adesão do paciente ao tratamento (PRABHAKAR et al., 2013).

Silva et al., (2014) descreve que a entrega transdérmica possui vantagens quando comparada as outras formas tradicionais de administração de fármacos. O metabolismo de primeira passagem hepática, para fármacos administrados por via oral, é o responsável por diminuir a biodisponibilidade e degradar diversos fármacos. Também com relação a outros efeitos indesejáveis podem gerar efeitos secundários como náuseas, diarreia, constipação, ulceração e sangramento na mucosa, o que não ocorre por entrega transdermal (SILVA et al., 2014).

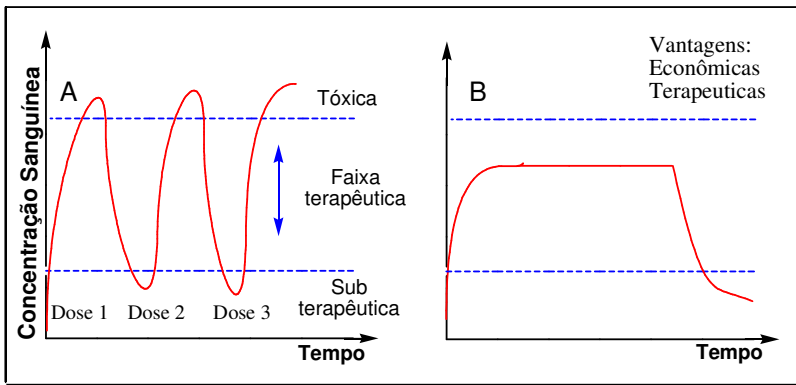
3.2 SISTEMA DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO

O tratamento de uma doença aguda ou crônica tem sido geralmente realizado pela administração de fármacos usando várias formas farmacêuticas tais como comprimidos, cápsulas, supositórios, cremes e pomadas. Estas formas farmacêuticas convencionais são

frequentemente administradas em várias doses, gerando flutuações nos níveis plasmáticos dos fármacos e, conseqüentemente, o aparecimento de efeitos colaterais indesejáveis. Neste sentido, novas estratégias têm sido desenvolvidas, permitindo o controle da velocidade de liberação do fármaco, manutenção da atividade terapêutica por períodos prolongados, ou ainda o direcionamento de agente terapêutico para um alvo específico (WATTS et al, 1990)

A (Figura 02) ilustra as diferenças entre o perfil de concentração do fármaco no organismo através de um método de administração convencional (A) e por meio de liberação controlada (B).

Figura 2 - Perfil de liberação alcançado através de uma terapia convencional (A) e por meio de uma liberação controlada (B).



Fonte: Watts et al. (1990).

Usando um método de liberação convencional a diferença de concentração plasmática efetiva em função do tempo tende a flutuar em torno da faixa terapêutica. Na liberação apresenta um aumento, inicialmente e declina com o passar do tempo, sendo necessária à administração de uma segunda dose. Uma vez que os níveis plasmáticos são dependentes das doses administradas, quanto maior a dose, maiores as chances de que a concentração do fármaco no organismo alcance os níveis tóxicos, acarretando em efeitos adversos (ROBINSON; LEE, 1987). Sistemas de liberação controlada, contudo, podem resultar em níveis de fármacos que se encontram dentro da faixa terapêutica por um longo período de tempo, com a administração de uma única dosagem (LANGER, 1990).

Novos sistemas de liberação de fármacos têm sido introduzidos na comunidade biomédica desde a década de 70. Eles cresceram mais que os sistemas convencionais e, baseados em alta tecnologia, gradualmente os substituem. A liberação de um fármaco em um alvo específico de ação é conhecida por ser um processo complexo constituído por múltiplos passos sendo que o objetivo é obter um sistema onde a máxima segurança seja alcançada (CHIEN, 1990).

O desenvolvimento e caracterização destes sistemas que permitam a liberação controlada e direcionada de princípios ativos (fármacos, nutrientes, etc...) em alvos específicos, têm recebido considerável atenção nos últimos anos, particularmente àquelas preparadas a partir de polímeros biodegradáveis, oferecendo várias vantagens frente aos sistemas de liberação convencionais que incluem: (A) manutenção contínua dos níveis do fármaco no sangue na faixa terapêutica desejada; (B) redução efeitos colaterais prejudiciais devido à liberação vetorizada a algum tecido ou tipo de célula; (C) potencialmente diminuem a quantidade de fármaco necessário; (D) diminuem o número de administrações do medicamento, levando a um maior comprometimento do paciente ao tratamento; e (E) facilidade na administração de fármacos com meia-vida biológica curta, por exemplo, proteínas e peptídeos (ROBINSON; LEE, 1987; LANGER et al, 1990; LANGER 1998).

Com isso vêm se intensificando o interesse no desenvolvimento de polímeros solúveis, no qual o fármaco pode ser ligado ou associado de alguma forma ao polímero ou microesferas biodegradáveis.

A introdução de drogas para a circulação sanguínea através da entrega pela pele é uma importante alternativa para via de administração cutânea. As vantagens potenciais da via transdérmica estão bem documentadas, que incluem o metabolismo de primeira passagem, evitando ingestão gastrointestinal e incompatibilidade (LEVINTOVA et al., 2011).

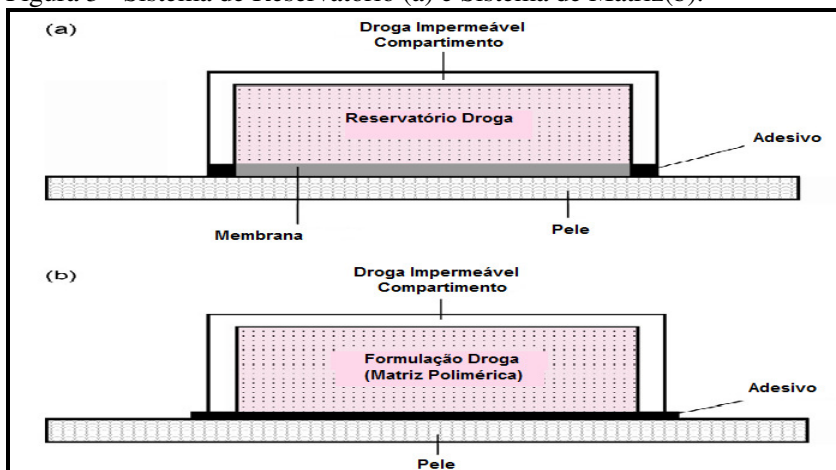
Sobre os sistemas de liberação de fármacos através de membranas o trabalho de Stamatialis et al., (2008) diferencia dois tipos de sistemas básicos: Sistemas Osmóticos e Sistemas de Difusão Controlada. O Sistema Osmótico é constituído por um reservatório feito de uma membrana polimérica semipermeável, apenas permeável para água, onde dentro do reservatório encontra-se o fármaco em solução concentrada. Com o aumento da pressão osmótica, através da passagem de água pela membrana, o medicamento é liberado por um orifício. Este sistema permite a entrega de vários tipos de medicamentos e com taxas

elevadas. Para o Sistema de Difusão Controlada o mesmo trabalho afirma que a liberação é controlada pela membrana dependendo de sua difusividade e da espessura da membrana (STAMATIALIS et al., 2008).

Para os Sistemas Transdérmicos, Stamatialis et al., (2008), informa que a droga é incorporada em um emplastro e a entrega é realizada mediante a diferença de concentração ou outras forças como a corrente elétrica. Algumas vantagens desse sistema, ainda de acordo com Stamatialis et al., (2008), são que se assemelham a infusão intravenosa, mas ao contrário dela, os Sistemas Transdérmicos não são invasivos e não necessitam internação hospitalar.

Os tipos mais usados de sistemas liberação de drogas são o da entrega passiva e podem ser classificados em duas categorias: Sistema Reservatório e Sistema Matriz. No Sistema de Reservatório, exemplificado na Figura 3a, o fármaco é colocado entre duas membranas (STAMATIALIS et al., 2008). A membrana superior e lateral é impermeável ao medicamento, a outra ficará em contato com a pele e controlará a liberação do material. A taxa de liberação pode ser controlada através de alguns fatores como: variação da composição no reservatório, permeabilidade da droga através da membrana (por adaptação do material, porosidade e espessura) e/ou através do adesivo. Para o Sistema de Matriz, ilustrado na Figura 3b, Stamatialis et al., (2008) descreve que o fármaco solubilizado em um polímero é distribuída pela pele por difusão.

Figura 3 - Sistema de Reservatório (a) e Sistema de Matriz(b).

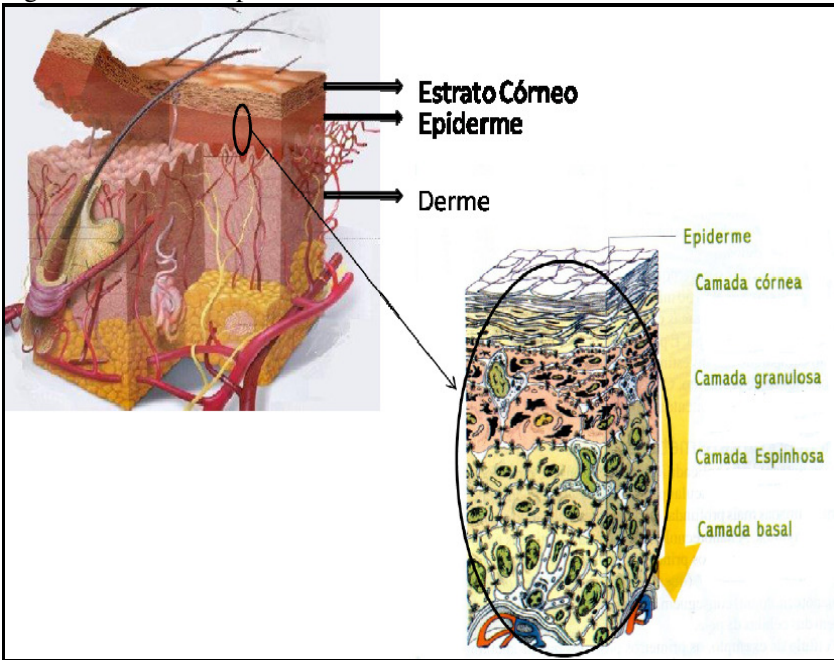


Fonte: Stamatialis et al. (2008).

3.3 PELE

Esse importante órgão do corpo humano, de acordo com Stamatialis et al., (2008), é o maior órgão do corpo, com 2 m^2 de área superficial. A pele é constituída por duas camadas de tecidos chamadas derme e epiderme conforme mostrado na figura 04. A derme possui espessura de 100 a 200 μm sendo a maior parte da pele. A epiderme, camada superior da pele, possui espessura de 100 a 110 μm sendo composta por vários tecidos fisiologicamente ativos e uma camada fisiologicamente inativa chamada estrato córneo com aproximadamente 10 μm de espessura (STAMATIALIS et al., 2008).

Figura 4 - Sistema representativo da Pele.



Fonte: Praça (2011).

A derme é um tecido conjuntivo que sustenta a epiderme. É constituída por elementos fibrilares, como o colágeno e a elastina, elementos de matriz extracelular (proteínas, glicosaminoglicanos, íons e água). Está subdividida em duas camadas: camada papilar em contato com a derme, formada pelo tecido frouxo, camada reticular constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, onde predominam as fibras gelatinosas (PRAÇA, 2011).

Com todas essas características, pode-se considerar viável a entrega de drogas através do estrato córneo e/ou por folículos capilares e dutos de suor. O estrato córneo desempenha fator principal de barreira para a entrega de drogas, pois os folículos capilares e os dutos de suor compõem apenas 0,1% da pele (STAMATIALIS et al., 2008).

3.4 TÉCNICAS DE PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas aliadas a polímeros podem atuar como armazenadores (encapsuladores) caracterizados pela entrega controlada

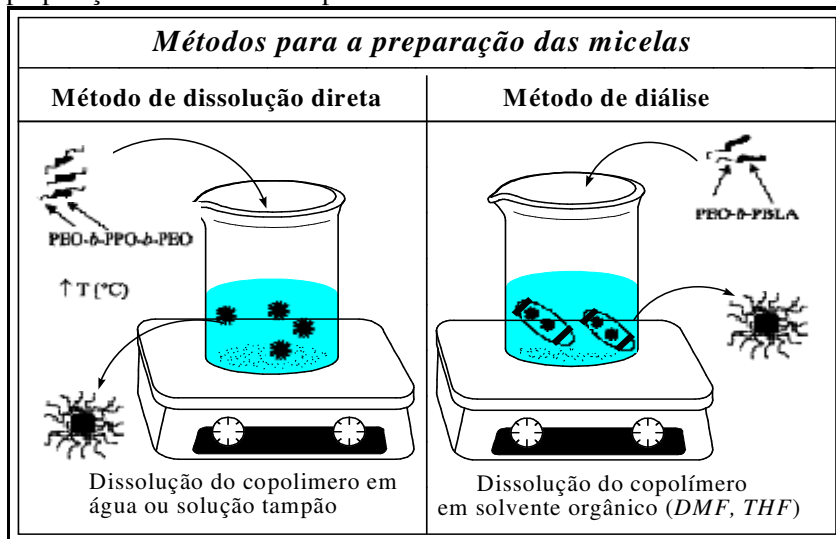
da droga. Esta capacidade, juntamente com a biocompatibilidade e baixa imunogenicidade destas nanopartículas torna um sistema de entrega atrativo, especialmente para drogas à base de proteínas bem como ácidos nucleicos. (SHUTAO et al., 2014).

Podem ser classificados em materiais nanoestruturados ou materiais nanoparticulados. Os tamanhos estão na faixa de nanômetros, que abrange uma vasta gama de 1 nm, 100 a 200 nm. (KOO, 2006). Uma das mais importantes interfaces é a aplicação da nanotecnologia na biologia aliada à medicina (RAMSDEN, 2011).

As nanopartículas poliméricas podem ser sintetizadas por vários métodos, dependendo da aplicação pretendida e do tipo de droga e na via de liberação desejada. As partículas poliméricas podem ser preparadas por métodos físicos tais como separação de fases, evaporação do solvente e secagem em de aspersão (*spray drying*) que tem sido extensivamente estudada. Os métodos químicos incluem emulsão, suspensão, precipitação, dispersão polimerização interfacial, suspensão-policondensação ou poliadição e miniemulsão (LANDFESTER, 2001; JABRRI et al, 2000)

A escolha do método depende principalmente da solubilidade do copolímero em água, porém, convencionalmente, as partículas são preparadas principalmente por dois métodos: dissolução direta e o método de diálise conforme demonstra a Figura 05 (LETCHFORD et al, 2007; BADER et al, 1984).

Figura 5 - Representação esquemática dos dois principais métodos de preparação de micelas de copolímeros em bloco.



Fonte: Dal-Bó (2011).

O método de dissolução direta envolve a adição do copolímero em meio aquoso e algumas vezes esta mistura é aquecida para garantir a micelização. Este método é escolhido para copolímeros que são solúveis em água (LETCFORD et al, 2007; BADER et al, 1984).

O método de diálise é utilizado quando o copolímero não é solúvel em água. Neste caso o copolímero é primeiramente dissolvido em um solvente orgânico comum miscível em água, como tetrahydrofurano (THF) ou dimetilformamida (DMF). Durante o processo de diálise a micelização é induzida pela evaporação do solvente orgânico. O tamanho e distribuição de tamanho, bem como outras propriedades vão depender do tipo de solvente utilizado (DAL-BÓ, 2011).

3.5 INCORPORAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS

Os princípios ativos podem ser incorporados no interior das micelas por incorporação física ou por conjugação química. Existem vários meios para a incorporação física de fármacos no interior das micelas, na maioria das vezes, ocorre pelo método de diálise, ou por

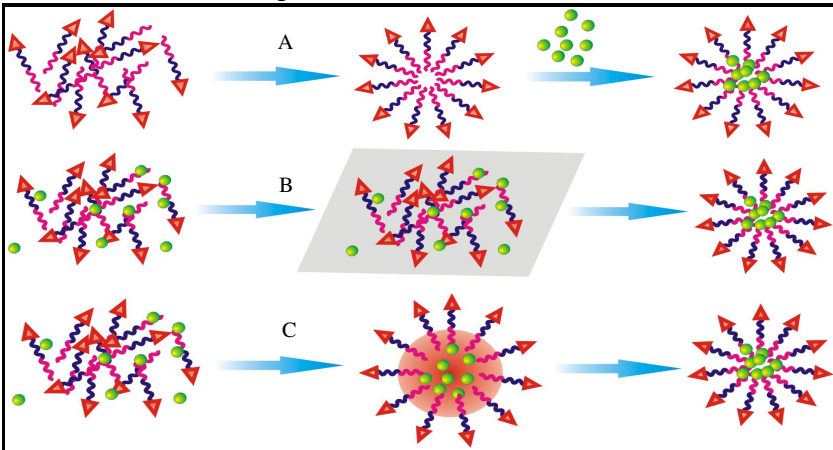
microemulsão óleo em água (o/w). O método de conjugação química requer a presença de grupos reativos do princípio ativo e as características das micelas e as propriedades do polímero dependem do tipo de fármaco conjugado, sendo portanto um método menos vantajoso (RIJICKEN et al, 2007).

Os métodos de incorporação dependem principalmente dos métodos utilizados para a preparação das micelas. No processo de dissolução direta as nanopartículas encapsuladas com o fármaco podem ser preparadas pela dissolução do copolímero em bloco juntamente com o fármaco em solvente aquoso, bem como pela dissolução separada de uma solução contendo o copolímero e outra contendo o fármaco. Este procedimento é mais apropriado para copolímeros moderadamente hidrofóbicos (Figura 6 A).

Já o processo de diálise é necessário quando o copolímero é pouco solúvel em água, neste caso, utiliza-se um solvente orgânico igualmente solúvel para o copolímero e para o fármaco. O mecanismo de formação da micela depende do procedimento de remoção do solvente (Figura 6 B).

Outro procedimento bastante utilizado para a preparação de nanopartículas encapsuladas é o de microemulsão (o/w) (Figura 6 C). Em uma definição mais ampla as microemulsões são dispersões de água e óleo estabilizadas por um emulsificante e são termicamente estáveis. Neste caso gotas do fármaco são adicionadas em um solvente como clorofórmio para a solução de micela em água. O fármaco é incorporado quando o solvente evapora (ALLEN et al, 1999).

Figura 6 - Processo de preparação de nanopartículas e encapsulação do princípio ativo, por dissolução direta (A), por diálise (B) e por microemulsão óleo em água (o/w) (C).

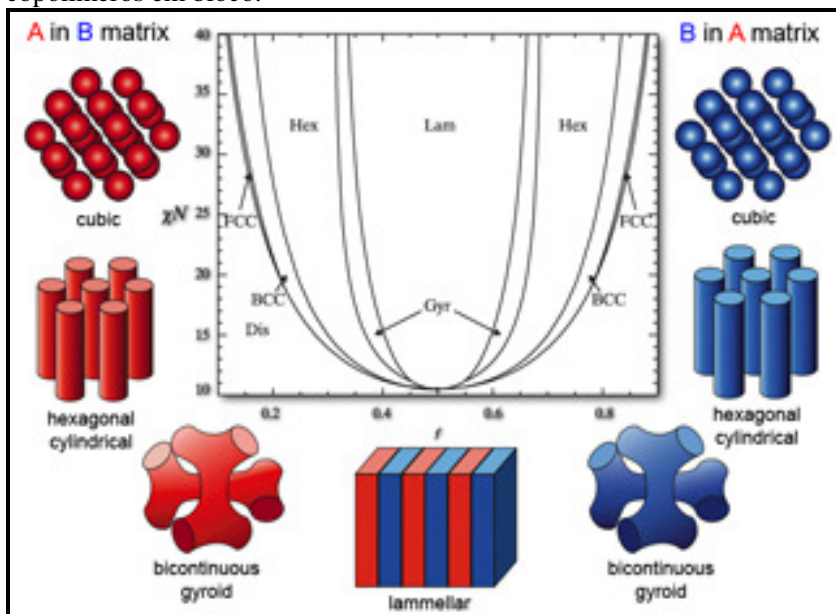


Fonte: Allen et al. (1999).

Os copolímeros podem ainda se revelar precursores para a realização de filmes finos porosos para aplicações no domínio de nanolitografia (TOYKIVICH et al, 2006; KRISHNAMOORTHY et al, 1996). Uma das primeiras demonstrações do uso de copolímeros em bloco como moldes para a litografia foi reportada por Mansky e colaboradores (MANSKY, 1996) que usaram os copolímeros poli (estireno-*bloco*-butadieno). Desde então, filmes à base de copolímeros, onde as dimensões e a morfologia podem ser controladas, constituem um domínio de pesquisa altamente dinâmico (HAMLEY, 2003).

Observando o diagrama de fases é possível prever qual a morfologia que o copolímero adotará, quando dissolvido em um solvente termodinamicamente bom para os diferentes blocos hidrofílicos e hidrofóbicos, e depositado na forma de filme ultrafino sobre a superfície de um substrato (Figura 07). As diferentes morfologias são dependentes de fatores importantes como massa molar, fração em volume dos diferentes blocos, bem como da sua incompatibilidade. Entre as diferentes morfologias podemos encontrar esferas, cilindros e lamelas (ABETZ, 2005).

Figura 7 - Representação esquemática das morfologias com cadeias de copolímeros em bloco.



Fonte: Abetz (2005).

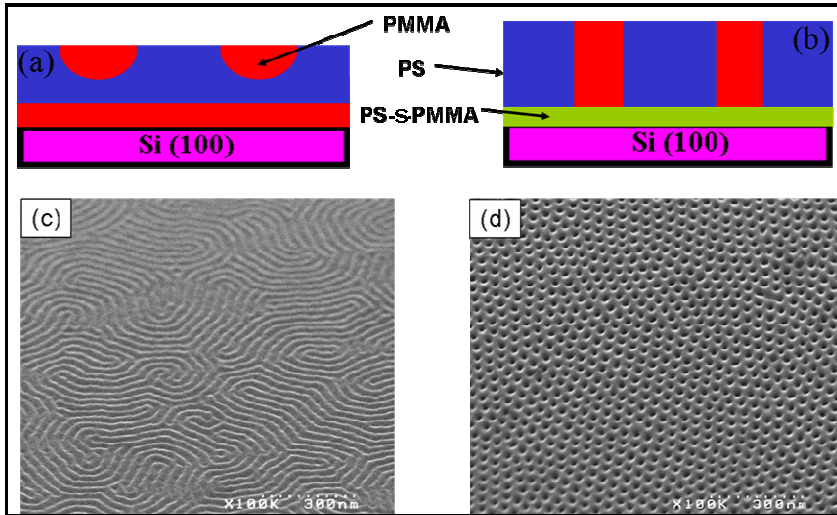
Os filmes finos dos copolímeros podem ser facilmente preparados por *spin-coating* a partir de soluções poliméricas, mas o estado de equilíbrio no filme resultante é raramente encontrado logo em seguida da preparação. Os pós-tratamentos são então necessários a fim de se obter a morfologia desejada (tratamentos térmicos, campo elétrico ou exposições a vapores de solventes). Estas técnicas têm como objetivo o aumento da mobilidade das cadeias resultante de um efeito de plastificação, de uma modificação dos parâmetros de interação dos dois blocos e de uma modificação de energias superficiais (LYAKHOVA, 2006; KEVIN et al, 2005).

Os copolímeros em bloco formando fases cilíndricas auto-organizáveis são particularmente interessantes uma vez que estes cilindros possam se orientar perpendicularmente à superfície do substrato, e que o mesmo possa seletivamente ser extraído do filme formando uma matriz porosa. Uma via elegante, largamente difundida em razão do alto grau de controle da porosidade gerada, é fundamentada

na degradação seletiva de um dos blocos do copolímero auto-organizado (DARLING, 2007)

Geralmente o bloco com a menor energia interfacial tende a se acumular na superfície, resultando em uma orientação de domínios organizados paralelos à mesma. Para se obter uma matriz porosa através da organização de cilindros orientados perpendicularmente, uma neutralização da superfície é necessária, de modo que a energia de interação com o substrato seja a mesma para os diferentes blocos (Figura 08) (DAI, 1994).

Figura 8 - Imagens de MEV com diferentes blocos: (a e c) orientação paralela dos cilindros de PMMA sobre as superfícies não neutralizadas de SiO_2 , e (b e d) orientação vertical dos cilindros sobre um substrato de SiO_2 recobertos com uma camada de PS-s-PMMA.



Fonte: Aissou et al. (2007).

A escolha de bons copolímeros, fração hidrofóbico e hidrofílico, como uma boa escolha do solvente termodinamicamente favorável é de extrema importância para facilitar ou entender a interação entre os filmes poliméricos e as partículas a serem estudadas.

3.6 POLÍMEROS ASSOCIADOS ÀS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

As membranas de polímeros com nanopartículas metálicas possuem características únicas. As principais vantagens são baixa aglomeração e corrosão das nanopartículas, controle dos tamanhos, estabilidade mecânica devido à incorporação das partículas no interior da matriz, facilidade quanto ao transporte, resposta das modificações eletrônica e óptica. Isso é devido a NP (nanopartícula) estarem envoltas por polímeros. Por estes motivos, os cientistas têm utilizado estas membranas para aplicação em catálise e sensores (VILLALOBOS et al., 2014).

A preparação do nanocompósito com nanopartículas utilizando a técnica *in situ* tem sido usada extensivamente a fim de aumentar a adesão interfacial entre os polímeros e as nanopartículas (BHANVASEA et al., 2014).

3.7 NANOPARTÍCULAS DE OURO

De acordo com o descrito em algumas pesquisas, a baixa toxicidade das nanopartículas de ouro e prata, biocompatibilidade e sua eficiente funcionalização tornam esses materiais adequados ao desenvolvimento de novas formas de administração de drogas (GHOSH et al., 2008; HUANG et al., 2011).

As nanopartículas de ouro são excelentes suportes para fixação de drogas. Para as nanopartículas maiores na faixa de 10-100 nm são normalmente sintetizadas pelo método *Turkevich* com íons de citrato. Para uma eficiente funcionalização desta superfície é realizada adição de um agente de nivelamento contendo tiol. Este simples procedimento levou à funcionalização covalente das nanopartículas com uma ampla variedade de ligações (VIGDERMAN et al., 2012).

A facilidade de se obter nanopartículas de ouro estáveis, com tamanho adequado e funcionalizada para tratamentos de doenças está relacionada ao grande conhecimento que hoje se têm destas partículas. Esses estudos, como o de Huang et al., (2011), relatam a importância do tamanho, forma e correta modificação superficial através de grupos ligantes para a eficiente penetração celular (VIGDERMAN et al., 2012).

As nanopartículas metálicas vêm sendo ativamente estudada para aplicação biomédica devido sua biocompatibilidade e fácil ligação com as moléculas. Estudos revelam que as nanopartículas associadas a

compostos antioxidantes e anti-inflamatórios demonstram melhor potencial terapêutico (TSAI et al., 2007).

Recentemente estudos realizados no nosso grupo de pesquisa, demonstraram que o uso das NP isolado ou ligado ao N-acetilcisteína (NAC) pode ser útil no tratamento de inflamações, embora se necessite de mais estudos sobre os efeitos terapêuticos (PAULA, et al., 2015).

3.8 AGENTES FACILITADORES

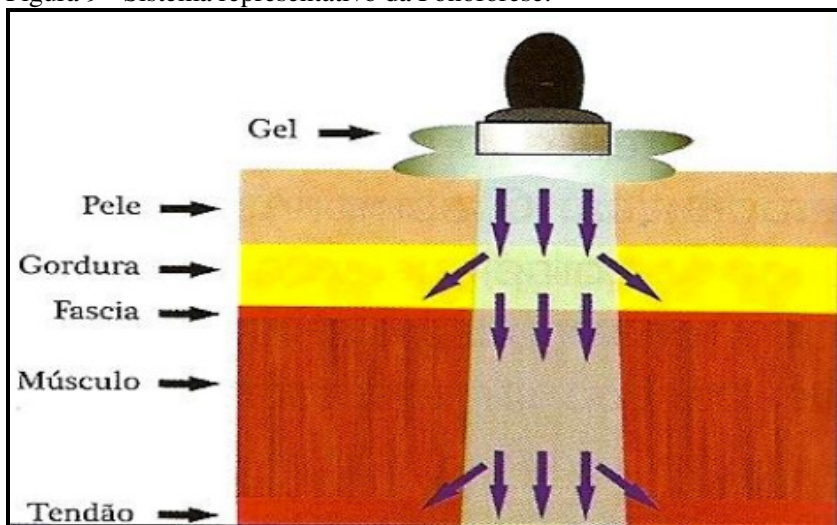
3.8.1 Ultrassom e Fonoforese

A aplicação do ultrassom para a entrega de compostos farmacêuticos tem como base dois fatores: capacidade de melhorar a eficácia dos medicamentos e a melhoria da adesão dos compostos farmacêuticos. Neste processo poderá incluir o efeito de cavitação (geração de bolhas de gás), efeitos térmicos, transporte convectivo e efeitos mecânicos conforme exemplificado na figura 09 (AMIT et al., 2012).

O ultrassom é uma forma de energia acústica frequentemente utilizada na fisioterapia pelos seus efeitos de calor profundo e analgésico. Quando a onda ultrassônica penetra no organismo, interage com células e tecidos através de mecanismos térmicos e não térmicos. Estruturas aquecidas pelo ultrassom são preferencialmente músculos fibrosados, bainhas tendíneas e raízes nervosas (GUFFEY e KNAUST, 1997).

Assim o ultrassom provoca estímulos mecânicos através da pele fazendo com que haja a migração de moléculas de fármacos, sendo este processo chamado de fonoforese conforme representado na figura 09, que por sua vez demonstra que o fármaco pode chegar a uma profundidade tecidual maior quando comparado a ausência de aplicação do mesmo. Na fisioterapia, a fonoforese com fármacos antiinflamatórios é comumente usada para tratar lesões inflamatórias dos tecidos (HSIEH, 2006).

Figura 9 - Sistema representativo da Fonoforese.

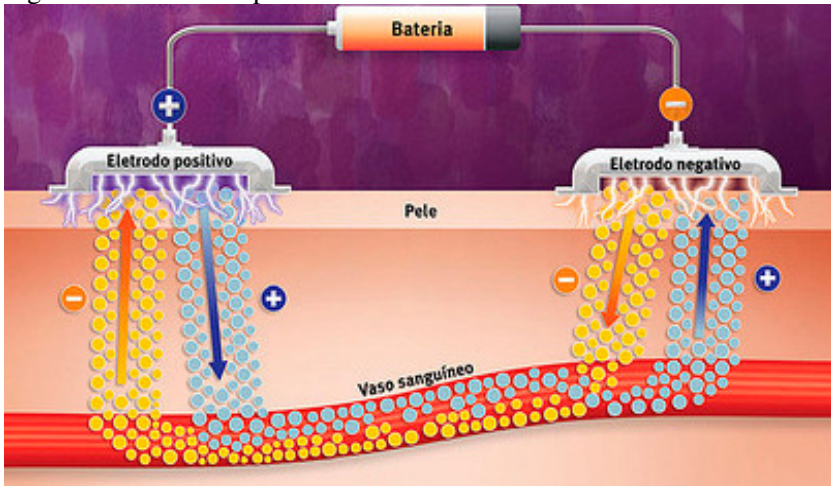


Fonte: Agne (2009).

3.8.2 Iontoforese

A iontoforese é a introdução de radicais em uma membrana sob a influência de um campo elétrico, onde tem se comprovado um fator importante na liberação da droga (AMIT et al., 2012). Explicando o funcionamento da iontoforese, Stamatialis et al., (2008) descreve que utiliza aceitáveis quantidades de corrente elétrica. A Figura 10 representa o dispositivo que consiste de dois sistemas contendo dois eletrodos (ânodo e o cátodo) e o fornecimento de energia. Neste exemplo, a droga líquida ou em gel é colocada no adesivo/eletrodo que tem a mesma carga que o medicamento, neste caso o ânodo. O outro adesivo-eletrodo contém eletrólito de referência ou gel e assim o fármaco é dirigido por repulsão eletrostática (STAMATIALIS et al., 2008).

Figura 10 - Sistema representativo da Iontoforese.



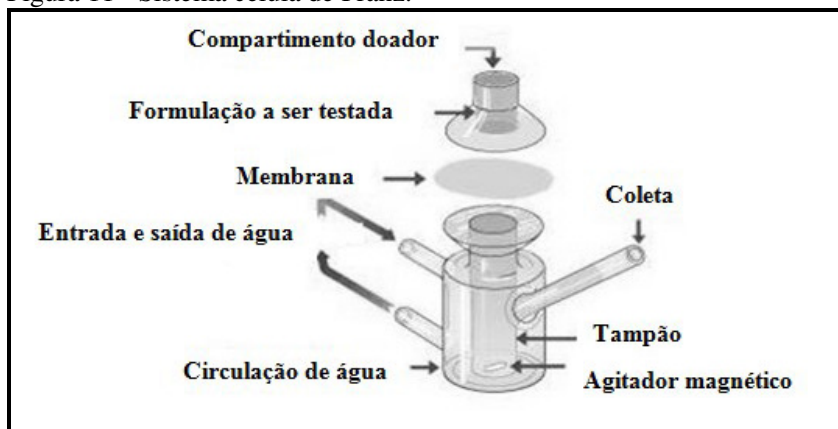
Fonte: Chien (1987).

3.9. CÉLULA DE FRANZ

Estudo de permeação *in vitro* utilizando Célula de Franz é um importante auxílio para o estudo de absorção cutânea *in vivo*. É um meio de avaliar as características de transporte das drogas farmacêuticas. Este sistema de difusão passiva para o transporte transdérmico tem sido desenvolvido para diferentes tipos de membranas (LEVINTOVA et al., 2011).

Estudos de absorção cutânea pode fornecer um meio conveniente para avaliar as características de permeação de drogas. As células de difusão de Franz modificadas são mais comumente usados. Estas células contêm duas câmaras, uma contendo o agente ativo (veículo doador) e a outra contendo uma solução receptora; uma membrana separa os dois, enquanto o receptor a câmara é revestido para manter o controle de temperatura. No uso destas células, o receptor é tipicamente uma solução agitada, e o doador pode ser uma solução não agitada em gel conforme demonstrado na figura 11 (LEVINTOVA et al., 2011).

Figura 11 - Sistema célula de Franz.



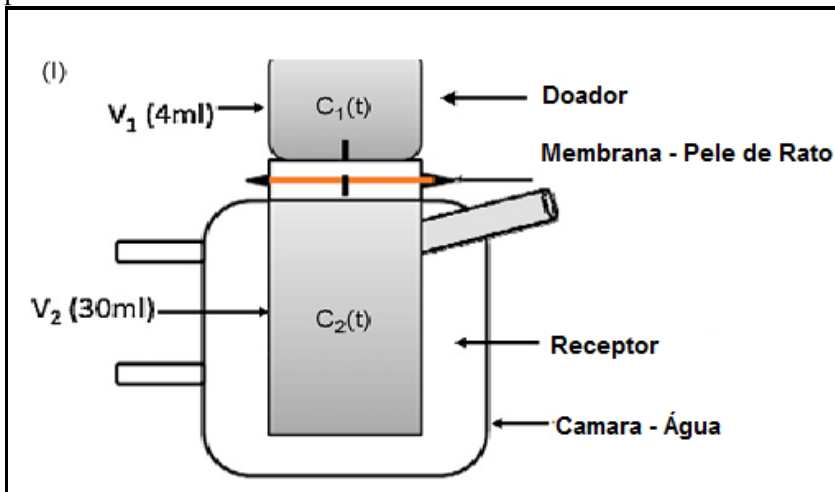
Fonte: Silva (2011).

A célula de difusão vertical de Franz consiste em um sistema estático, vem sendo aplicado em vários estudos de permeação em pele. Conforme a *FDA (Food and Drug Administration)* este sistema é o ideal para o controle de qualidade para soluções tópicas. É um dos sistemas mais eficiente para realizar testes de liberação de fármacos em adesivos transdérmicos (PRAÇA, 2011).

No entanto, o número de variáveis como agitação, temperatura, dosagem, amostragem manual significa um elevado grau de variabilidade. Assim, diferentes autores utilizam células modificadas, a fim de ter uma melhor reprodutibilidade (LUCERO et al., 2013). Para o estudo da permeação, deve ter um volume fixo de soluções doadoras e receptoras sendo agitadas, em seguida, deve-se avaliar o decurso de tempo para a permeação através destas membranas (LIU et al., 2014).

Sonavane et al., (2008) realizou a permeação de NP de ouro com tamanhos 15 nm, 112 nm e 198 nm em pele de rato. As NP de ouro com 15 nm apresentou melhor resultado. Conforme demonstrado na Figura 12 representa forma esquemática do aparelho de estudo permeabilidade, usando Célula de Difusão de Franz com pele de rato. Os compartimentos C_1 e C_2 representam compartimento doador e receptor, enquanto que V_1 e V_2 representam volume de suspensão de NP com fosfato.

Figura 12 - Representação esquemática do aparelho de estudo permeabilidade usando Célula de Difusão.



Fonte: Sonavane et al. (2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo contempla a avaliação e difusão de nanopartículas metálicas em membranas poliméricas para ter um entendimento sobre a interação, estabilidade das nanopartículas, conhecimento físico-químico de permeação, cinética para que possa auxiliar futuramente a liberação controlada das nanopartículas metálicas sozinhas ou associadas com fármacos. Em termos de sistema de liberação controlada de fármacos, *drug delivery*, o ideal é que ele libere moléculas terapêuticas num determinado local alvo por longo período de tempo, por ser uma metodologia menos evasiva e agressiva, poderá ser futuramente utilizada para combater alguns tipos de enfermidades, na qual tem-se dificuldade da entrega do fármaco.

Para sua concretização é preciso o conhecimento da membrana e as nanopartículas nessa primeira etapa sem o uso de estímulos externos como agentes facilitadores e conhecimento da difusão pela membrana ou liberação quando já impregnadas na própria membrana.

4.1 SINTESE DAS NANOPARTICULAS DE OURO DE 11NM

As nanopartículas de ouro tamanho aproximado de 11 nm (nanômetros) foi sintetizada a partir de método descrito por Turkevich et al., (1951) e Cardoso et al., (2014) com pequenas alterações nas metodologias utilizadas por esses autores. O ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) foi adquirido da Sigma-Aldrich, e o ascorbato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, 99%), agente redutor e estabilizante, adquirido da Acros.

Em um balão de 250 mL de três bocas sob fluxo de argônio, equipado com condensador e protegido por um tubo secante de cloreto de cálcio, foram adicionados inicialmente, 100 mL de uma solução 0,50 mM de ácido tetracloroáurico, a solução foi mantida sob a agitação mecânica a 700 rpm (rotação por minuto) e aquecida lentamente até atingir o equilíbrio térmico de 90 °C. Após atingir o equilíbrio térmico diminui-se agitação mecânica para 300 rpm e foi adicionado com o auxílio de um funil de adição uma solução de 25 mL na concentração de 100 mM de ascorbato de sódio e 0,05% do anfifílico glicoconjugado (N-acetyl-b-D-glucosaminyl-PEG900-docosanate $\text{C}_{22}\text{PEOGLcNAc}$) gota-a-gota à solução por 1 hora. O acompanhamento e termino da síntese das nanopartículas deu-se por espectroscopia no ultravioleta-visível com o espectrômetro da Shimadzu modelo UV-1800.

4.2 PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS PS-b-PMMA (POLI(ESTIRENO)-b-POLI(METIL METACRILATO))

A preparação dos filmes, do polímero comercial de PS-b-PMMA seguiu as adaptações das metodologias já descritas por Aissou et al. (2007). O polímero foi adquirido comercialmente da Polymer SourceTM do Canadá com uma razão hidrofóbico/hidrofílico com as seguintes características de massa molecular numérica de $M_n = 82.000$ g/mol razão dos blocos 2/1.

As membranas de PS-b-PMMA, foram preparadas através da técnica *spin coating* e *casting*. O *spin coating* envolve uma técnica de depositar o polímero no centro de um substrato, que em seguida gira em alta velocidade, aproximadamente 300 RPM.

Para a formação das membranas de PS-b-PMMA a técnica *casting* apresentou maior uniformidade conforme Figura 13. Esta técnica é aplicada sobre um suporte inerte e seca por evaporação do solvente THF (tetrahidrofurano) em um ambiente saturado com próprio solvente.

Figura 13 - Membrana de PS-b-PMMA.



Fonte: elaborado pela autora (2015).

Utilizando a técnica de *casting* foi preparado PS-b-PMMA impregnadas com nanopartículas de ouro a fim de aumentar a adesão

interfacial entre o polímero e as nanopartículas conforme demonstrado na Figura 14.

Figura 14 - Membrana de PS-b-PMMA impregnadas com nanopartículas de ouro 11 nm.



Fonte: elaborado pela autora (2015).

4.3 ANÁLISE DE DIFUSÃO DE MEMBRANAS

Para início do estudo da permeação *in vitro* foi utilizado a célula de Franz vertical conforme mostra a Figura 11. Porém com o andamento dos experimentos observou-se algumas dificuldades no manuseio do equipamento, principalmente no ponto de coleta, concluindo assim que através deste equipamento a coleta dos resultados não seriam satisfatórios.

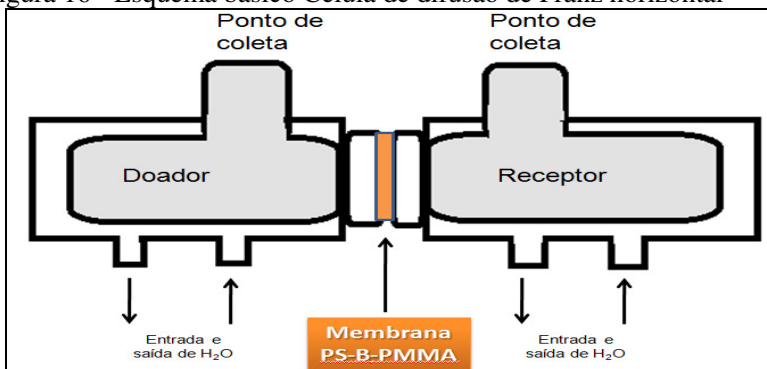
Figura 15 - Sistema célula Franz Horizontal.



Fonte: Elaborado pela autora (2015).

Para uma melhor reprodutividade para o estudo da permeação, foi realizado pesquisas de modelos de células Franz onde se concluiu que a célula de Franz horizontal poderia realizar um estudo de permeação com o mínimo de variabilidade. Foi adquirida a célula de Franz horizontal conforme mostra a Figura 15.

Figura 16 - Esquema básico Célula de difusão de Franz horizontal



Fonte: elaborado pela autora (2016).

As membranas foram preparadas e hidratadas por 24 horas, montadas na célula de difusão de Franz com diâmetro de 9 mm (área contato com membrana). A célula é composta por dois compartimentos, na qual um ficará a solução a ser estudada, doadora de nanopartículas de ouro e no outro comportamento uma solução receptora, conforme detalhado na figura 16. No compartimento receptor foi utilizado solução salina com pH semelhante ao da solução doadora. Foram realizadas análises de permeação das nanopartículas de ouro com tamanho de 11 nanômetros sobre as membranas nos intervalos de tempo de 12, 24, 48 e 72 horas. Com as membranas poliméricas já impregnadas com nanopartículas de ouro de 11 nanômetros, colocou-se em ambos compartimentos uma solução salina para que pudéssemos acompanhar a possível difusão ou lenta liberação das nanopartículas da membrana. As amostras foram coletadas e caracterizadas por espectrofotometria UV-vis, as membranas poliméricas foram estudadas e avaliadas pelas técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de força atômica.

4.4 ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-VIS

A análise de Espectrofotometria de UV-vis foi realizado no equipamento modelo Shimadzu UV-1800 com feixe de comprimento onda de 190 à 1100 nm com largura de banda espectral 1 nm. O processo de absorção é iniciado quando a luz atravessa a amostra em que uma quantidade de luz é absorvida e esta absorção é a diferença

entre a intensidade de radiação incidente I_o e a radiação transmitida I . Esta quantidade de luz transmitida é expressa em transmitância ou absorbância, a transmitância é expressa pela formula Eq.(01) (SILVERSTEIN et al., 2007):

Equação 1 – Transmitância

$$T = \frac{I}{I_o}$$

Fonte: Silverstein et al. (2007).

E para absorbância é relacionado na seguinte fórmula:

Equação 2 - Absorbância

$$A = \log \frac{1}{T} = -\log T$$

Fonte: Silverstein et al. (2007).

Segundo a Lei de Lambert-Beer diz que a absorbância é diretamente proporcional ao caminho (b) que a luz percorre na amostra, concentração (c) e a absorvidade (ϵ):

Equação 3 - Lambert-Beer

$$A = \epsilon cb = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

Fonte: Silverstein et al. (2007).

4.5 ANÁLISE DE DLS (DYNAMIC LIGHT SCATTERING)

Dynamic light scattering (DLS) os experimentos foram realizados em *Brookhaven Instruments* com configuração padrão (BI-200 *goniometer*, BI-9000 *at digital correlator*) com um laser de He-Ne (632,8 nm = λ). Para as experiências de DLS, o volume de espalhamento foi minimizado utilizando uma abertura de 0,4 milímetros e um filtro de interferência antes de detectar o sinal no fotomultiplicador com um ângulo de 90°. As funções de auto correlação foram obtidos no modo multi- τ utilizando 224 canais. As amostras em água Milli-Q (1 mg / ml) foram filtrados através de membrana com um tamanho de poro de 0,45 μm diretamente para a célula de amostra e colocado no índice correspondentes decahidronaftaleno líquido (Aldrich). As distribuições de tempos de relaxação $A(t)$ foi obtido por meio de análise CONTIN da função de auto-correlação $C(q, t)$ [4]. A frequência de relaxamento, $\Gamma = 1 / \tau$ é uma função do ângulo de dispersão [5,6]. Foi calculado o coeficiente de difusão aparente (D_{app}) das nanopartículas conforme a equação 4.

Equação 4 - Coeficiente de difusão aparente

$$\frac{\Gamma}{q^2} \rightarrow 0 = D_{app}$$

Onde q é o vetor de onde, conforme definido.

Fonte: Pedersen et al. (1996).

Equação 5 - Vetor de onda

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

λ é o comprimento de onda do feixe com laser incidente (632,8 nm), n o índice de refração da amostra, e θ o ângulo de espalhamento. O raio hidrodinâmico (R_H) (ou diâmetro, $2R_H$) foi calculado utilizando a relação de Stokes-Einstein conforme a equação 6.

Fonte: Pedersen et al. (1996).

Equação 6 - Raio hidrodinâmico

$$R_H = \frac{K_B T}{6\pi\eta D_{app}}$$

Onde K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura da amostra e η é a viscosidade do solvente (água) [4-5].

Fonte: Pedersen et al. (1996).

4.6 POTENCIAL ZETA

Os materiais macroscópicos em contato com um líquido adquirem uma carga elétrica em sua superfície. A carga líquida na superfície da partícula afeta a distribuição de íons na sua vizinhança, aumentando a concentração de contra-íons junto à superfície. Assim, forma-se uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido. Cada partícula e os íons mais fortemente ligados à mesma se movem como uma unidade, e o potencial no plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio circundante é chamado Potencial Zeta (PZ) (Andrade et al., 2008).

As medidas de potencial zeta para definir o valor da estabilidade das nanopartículas de ouro sintetizadas, foram realizadas no equipamento PZ Analyzer, (Brookhaven Instruments) na UFRGS mantendo a uma temperatura de 25 °C.

4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

As imagens MET foram feitas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul). O tamanho e a estrutura da morfologia dos anfífilicos foram gravados em filmes Kodak SO163 utilizando um microscópio eletrônico (Eletrônico de Transmissão JEOL JEM 1200 Ex II) operando em 80 kV. Os negativos foram digitalizados usando uma câmera CCD Kodak Mega plus. Para preparar as amostras MET, 4 μ L de uma solução aquosa de micelas formadas foi espalhado sobre uma grade de cobre revestido com fino filme de carbono. Excesso de solução micelar foi delicadamente removida com papel absorvente. As amostras foram então marcadas negativamente pela adição de uma gota aproximadamente 4 μ L de 2% acetato de uranila, e o excesso de solução foi novamente removido antes da secagem em condição ambiente e quando analisadas na forma de filme foram inseridas as amostras diretamente sobre o suporte de carbono, e levemente recobertas por corante.

4.8 ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS)

As medidas de SAXS foram realizadas na linha SAXS1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil), proposta 20150020. O comprimento de onda da radiação incidente foi de 1,55 Å e a radiação espalhada foi detectada utilizando-se um detector 2D Pilatus 300 K. Todas as imagens 2D se mostraram isotrópicas e foram normalizadas pela transmissão de cada amostra. Os perfis $I(q)$ vs. q foram corrigidos subtraindo-se o espalhamento de radiação proveniente do solvente (água).

4.9 MICROSCOPIO DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

As análises de AFM foram realizados no Microscópio Shimadzu modelo SPM-9700. Utilizando o modo não-contato sobre placas de silício como substrato. Foi realizada uma limpeza prévia com detergente e água, 30 minutos de ultrasonificação em acetona e em isopropanol nas placas de silício, após a limpeza das placas foi depositados solução polimérica dopada com ouro em cima para realização do filme por *casting* após a formação dos filmes foram feita as leituras.

5 RESULTADOS

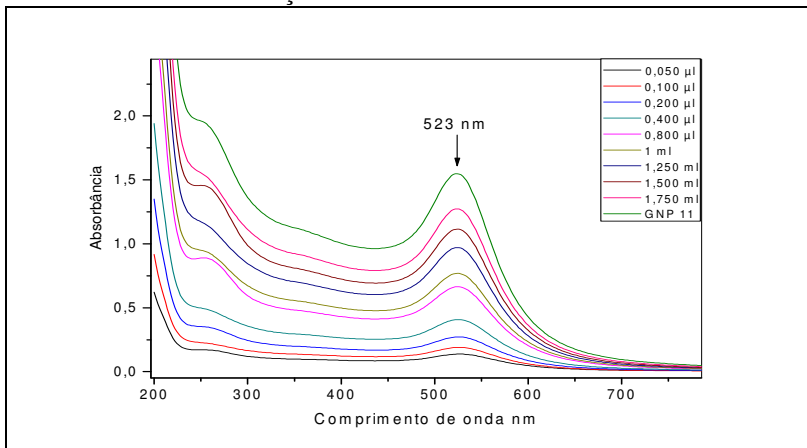
5.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO

O acompanhamento da síntese e formação das nanopartículas de ouro deu-se visualmente e analiticamente utilizando medições por espectrofotometria de UV-vis, as nanopartículas de ouro coloidal quando começam a serem formadas devido ao processo de redução de Au^{3+} para Au^0 rede cúbica de face centrada, com tamanho de partículas definidas, resultando uma solução coloidal vermelha altamente estável, porém visualmente e por espectrofotometria de UV-vis, podemos somente acompanhar a formação das partículas, o tamanho, morfologia e grau de polidispersão foram necessárias outras técnicas para confirmar e avaliar a devida eficiência da técnica.

Em particular, nanopartículas metálicas exibem propriedades óticas extremamente interessantes. A diversidade de cores observada para esses materiais está relacionada às oscilações dos elétrons de condução, em ressonância com a luz incidente, denominada ressonância dos plasmons de superfície (RPS), e tem sido devidamente explicada pela teoria de Maxwell-Garnet. Os efeitos visuais observados nestes sistemas coloidais os tornam objetos de estudo interessantes para utilização no acompanhamento de experimentos de difusão por espectrofotometria de UV-vis.

Para estabelecer uma medição com exatidão do estudo da interação e difusão nanopartículas de ouro em membranas poliméricas, realizou-se uma curva de calibração a fim de se estabelecer como referência no processo de difusão. Através do Gráfico 01 foi realizado medições em diferentes concentrações das nanopartículas de ouro por Espectrofotometria de UV-vis com material de referência GNP 11 nanômetros. Após realização do experimento foi retirado o máximo de absorção de cada espectro e foi realizado uma regressão linear absorvância versus concentração, obtendo uma equação da reta $Y=0.159x-0,140$ com uma linearidade de 0.985. Concluindo que dentro dessa faixa estaremos estudando e avaliando a difusão das nanopartículas numa faixa de concentração onde não observamos desvio reais ou aparentes da Lei de Beer-Lambert. Com conhecimento da equação da reta para esse sistema, após a cada intervalo tempo de observação caso houver uma difusão de nanopartículas de ouro devido o valor de absorvância podemos estimar a concentração de ouro na solução receptora.

Gráfico 1 - Análise de Espectrofotometria de UV-vis com NP 11 nm com diferentes concentrações.



Fonte: elaborado pela autora (2015).

5.2 POTENCIAL ZETA

O potencial zeta (ZP) foi usada para avaliar a carga de superfície das nanopartículas em água. O potencial zeta encontrado para GNP 11 nanômetros foi de $-12,00 \pm 2,25$.

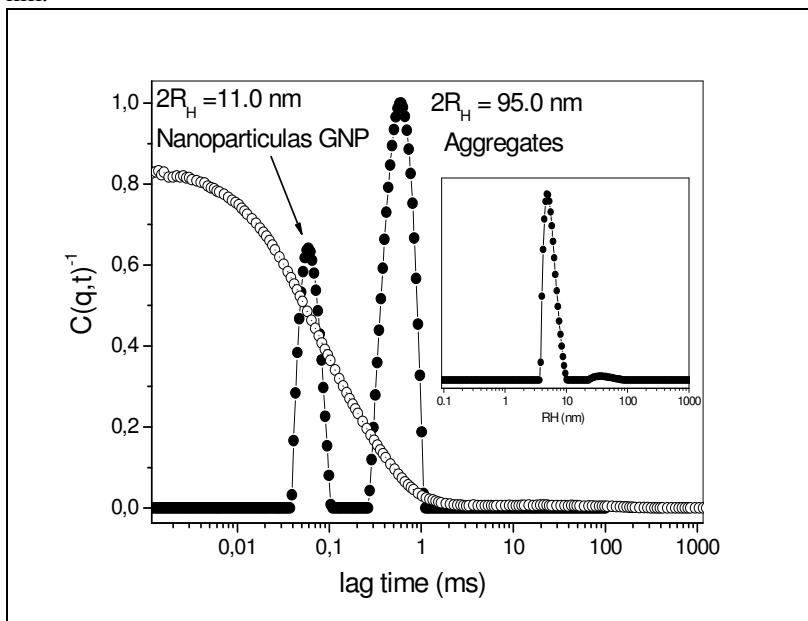
5.3 ANÁLISE DE DLS (DYNAMIC LIGHT SCATTERING)

A técnica de espalhamento de luz permitiu estudar o tamanho e polidispersão das nanopartículas. O espalhamento de luz é um fenômeno que relaciona várias técnicas experimentais e tem sido largamente empregado na análise de inúmeros sistemas nos últimos anos. Em face do seu constante desenvolvimento, o espalhamento de luz estabeleceu-se como uma valiosa ferramenta no que tange ao estudo da dinâmica e da estrutura de macromoléculas poliméricas, nanopartículas metálicas, lipossomas, dentre outros sistemas coloidais. Através de medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS), também chamado de espalhamento de luz quase-elástico (QELS), com luz polarizada e despolarizada mediu-se as flutuações no tempo da intensidade de luz espalhada, causadas pelos movimentos das partículas de ouro em solução.

A Figura 17 mostra a função de correlação temporal, medido a um ângulo de dispersão de 90° e a respectiva distribuição do tempo de relaxação $A(t)$, como revelado pela análise do programa comercial CONTIN para uma solução aquosa de GNP, a 25°C . É importante notar que a função de correlação é representada por uma boa curva mono-exponencial, indicando uma boa correlação da amostra. Para o GNP, em solução aquosa em nanopartículas esféricas com baixa polidispersidade com diâmetro ($2R_H = 11,0\text{ nm}$). Observa-se ainda a presença de uma contribuição de espalhamento de luz atribuído à formação de grandes agregados com estruturas flexíveis. No entanto, a intensidade de espalhamento de luz é ponderada pela massa das partículas e tamanho o que implica que DLS relata uma distribuição de intensidade média.

A inserção na Figura 17 representa a distribuição de R_H (determinado a partir da distribuição de τ pela equação de Stokes-Einstein), tomando em consideração a contribuição do volume de partículas, em vez de a contribuição de dispersão de luz (dividindo-se a contribuição de intensidade de espalhamento de luz pelo símbolo R^3).

Figura 17 - Apresentação da distribuição de R_H da amostra de NP 11 nm.



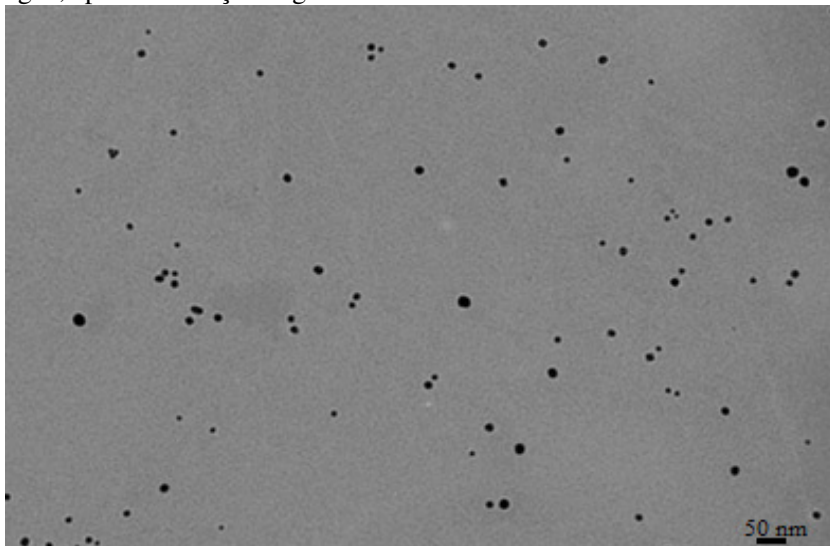
Fonte: elaborado pela autora (2015).

A Função de auto correlação $C(q,t)$ adquirida no ângulo de espalhamento $\theta = 90^\circ$ e a respectiva distribuição do tempo de relaxação $A(t)$, para uma solução aquosa de GNP a 25°C . A Figura 17 inserida mostra a respectiva distribuição de R_H , considerando a contribuição das partículas relacionadas com o seu volume total.

5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A imagem obtida por (MET), Figura 18, confirma a existência nanopartículas esféricas com tamanhos aproximados de 11 nm e também concordam com os resultados de SAXS que apresentam curvas típicas de partículas esféricas com baixa polidispersidade. Somente em faixas de q maiores notasse pequenas agregações o que pode estar associado ao valor de potencial zeta, este valor poderá manter as partículas estáveis em suspensão porém não suficiente para separar uma das outras, assim formando pequenos agregados que são sujeitos a separação de fase depois de alguns dias.

Figura 18 - Imagem obtida por (MET) das nanopartículas de GNP em água, após a coloração negativa.



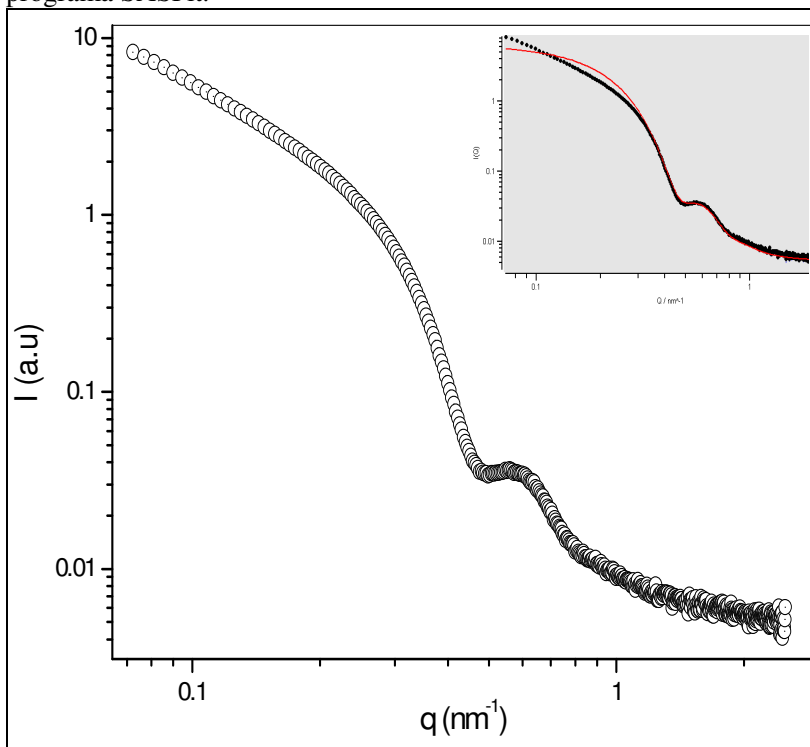
Fonte: elaborado pela autora (2015).

5.5 ESPALHAMENTO DE RAIOS-X A BAIXO ÂNGULO (SAXS)

Com a finalidade de complementar os resultados de espectroscopia de UV-vis, ZP, DLS, MET e de caracterizar a morfologia das partículas foi realizados experimentos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).

O perfil de SAXS apresentado na Figura 19, vai de encontro que as técnicas de DLS e MET que evidenciaram partículas com morfologia esféricas na faixa aproximada de tamanho de 11 nm de diâmetro com uma polidispersão 0.14. A linha sólida vermelha ilustra o melhor ajuste utilizando-se o modelo teórico de Pedersen e Gerstenberg. Essa faixa de concentração de GNPs apresentaram uma relação sinal-ruído razoável e a presença de agregados, sugerida pela elevada intensidade de espalhamento de raios-X a baixos ângulos ($I(q) \rightarrow 0$). Na região de altos percebe-se que a curva vermelha não ajusta aos dados experimentos evidenciando a formação de agregados e sugerindo que as partículas estão começando a se agregarem.

Figura 19 - Perfil de SAXS para as amostras de nanopartículas de ouro, dissolvidos em água a 25°C com o tratamento da curva utilizando o programa SASFit.



Fonte: elaborado pela autora (2015).

5.6 MEMBRANAS DE PS-b-PMMA

As avaliações das propriedades e estabilidades individuais dos materiais poliméricos é tão importante quanto o conhecimento das propriedades dos copolímeros ou das nanopartículas individuais. Em diversos estudos do polímero puro de PS (poli-estireno) não é um bom formador de filmes por ser muito quebradiço, porém o polímero apresenta uma boa estabilidade térmica, monômero é abundante, fácil de trabalhar por reações via radicalar e o polímero PMAA (Poli (metil metacrilato) puro mostra-se um material termoplástico rígido, transparente e incolor. Aissou et al. (2007) estudaram o copolímero em

bloco em diversas configurações para preparação de filmes poliméricos e estudados pelas técnicas de AFM e MET.

Através da composição e constituição de cada bloco hidrofílico e hidrofóbico no copolímero podemos formar filmes com maior ou menor facilidade. Foram preparadas membranas PS-b-PMMA pelo método de *casting*, formou bons filmes com uma boa maleabilidade no manuseio. Para a preparação das membranas, foi utilizado um ambiente saturado de THF (tetrahidrofurano) para evaporação do solvente de forma gradativa e regular, mostrou-se boa formação de filmes transparentes e homogêneos, devido a estas características optou-se por utilizar membranas PS-b-PMMA pelo método de *casting*.

Para preparação das membranas impregnadas com GNP de 11 nm, utilizou-se GNP centrifugado a 10.000 RPM (rotação por minuto), uma solução concentrada de nanopartículas com o mínimo de água. Optou-se por este método, pois os GNP sem centrifugação ao realizar a impregnação na membrana observou-se que não forma filme transparente e de forma homogênea. Realizou-se este método de impregnação nas membranas de PS-b-PMMA, obteve boa homogeneidade .

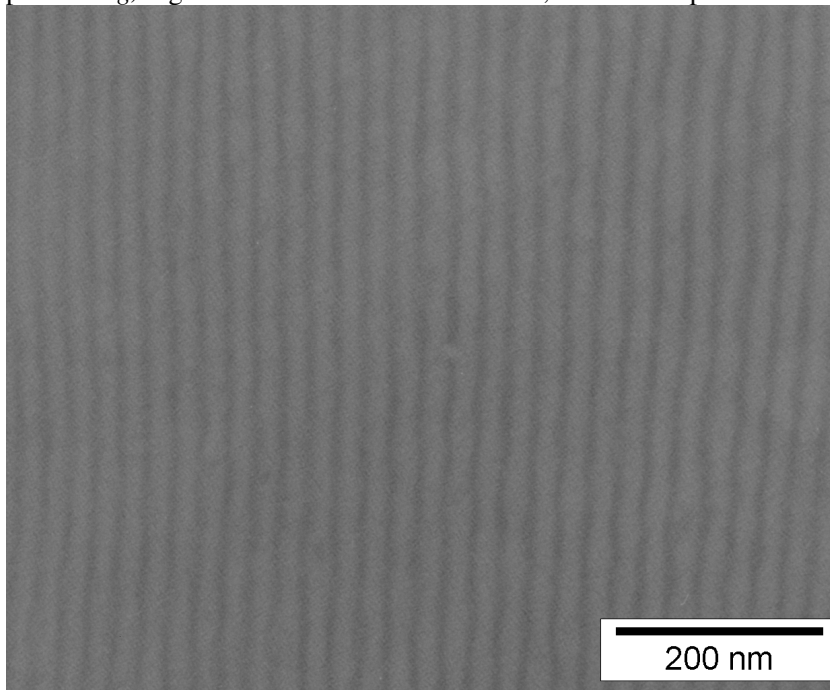
Optamos por fazer filmes via *casting* visto que, por *spin coating*, os filmes dos copolímeros não forma um filme adequado para o uso na célula de Franz. Após exaustiva preparação dos filmes pelo modo *casting* sem tratamento na superfície dos filmes, foram caracterizados microscopicamente os melhores filmes para avaliar seu ordenamento.

A escolha do solvente THF, foi em decorrência de ser um bom solvente tanto para parte hidrofóbica do polímero como para parte hidrofílica, o solvente por apresentar um baixo ponto de ebulição e não forma ligações efetivas com copolímero atingindo uma saturação na superfície e evaporar rapidamente sem auxílio de uma bomba vácuo para reduzir a pressão de vapor do solvente. Assim após atingir o equilíbrio, começa ocorrer a evaporação do solvente lentamente formando excelentes filmes que podemos observar nas imagens de MET.

Observou uma organização bastante regular através da microscopia eletrônica em transmissão (MET) (Figura 20). A distância entre as lamelas, calculada por tratamento de transformada de Fourier das imagens foi de aproximadamente 30 nm, entre essas lamelas ou trilhas, logo essa membrana possui uma excelente condição para difusão de materiais com tamanhos inferiores a 30 nm, sendo promissores

nessas condições para atuarem como sistemas liberadores de fármacos ou sensores.

Figura 20 - Filmes do copolímero comercial de PS-b-PMMA preparados por *casting*, organizados em escala nanométrica, observados por MET.

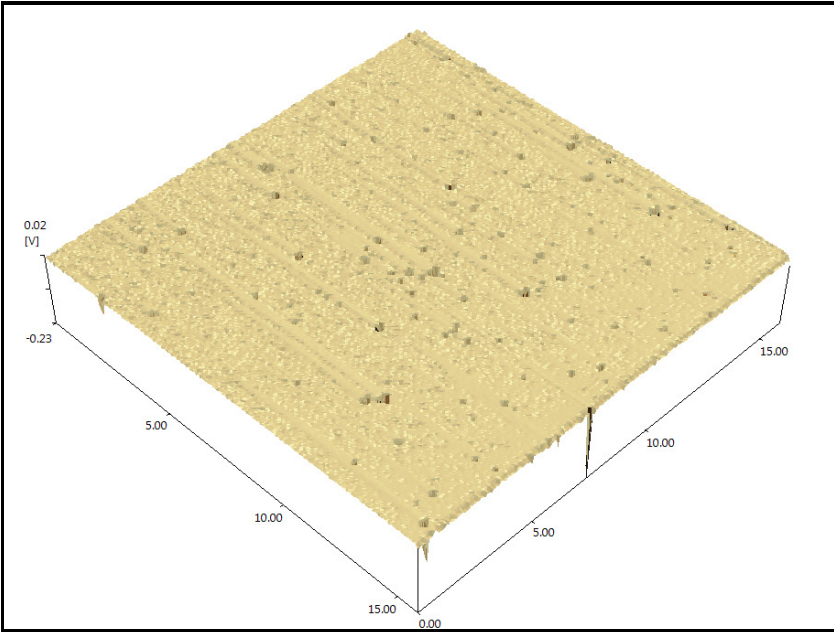


Fonte: elaborado pela autora (2015).

As imagens de AFM (microscopia de força atômica) foram obtidas no modo não-contato sobre placas de silício como substrato. A Figura 21 apresenta as imagens de AFM filmes poliméricos de PS-b-PMMA preparados por *casting* impregnados com as nanopartículas de ouro o qual podemos observar nas Figuras 21a e 21b as mesmas trilhas observadas na imagem de MET (figura 20) e os pontos mais escuros são as nanopartículas de ouro impregnadas entre as trilhas formadas no filme. As imagens de AFM também nos possibilitou observar além de partículas homogêneas de ouro como já visualizadas pelas outras técnicas, uma baixa rugosidade no filme impregnado com as nanopartículas. O fato de acrescentar nanopartículas durante a

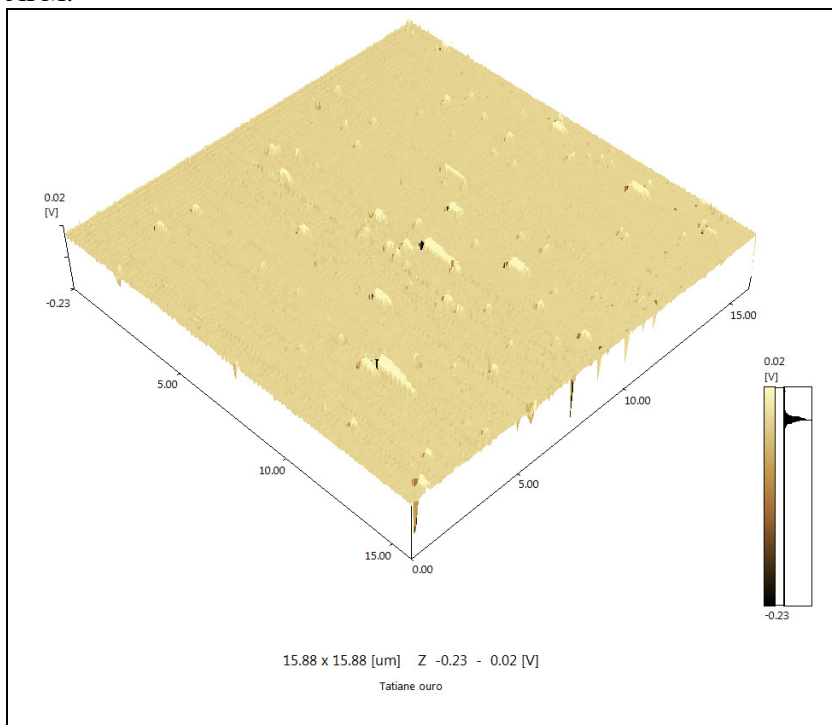
preparação do filme por *casting* não afetou habilidade de formar um filme homogêneo e de baixa rugosidade.

Figura 21 a - Apresenta as imagens de AFM Filmes poliméricos de PS-b-PMMA preparados por *casting* impregnados com as nanopartículas de ouro.



Fonte: elaborado pela autora (2015).

Figura 21b - Filmes poliméricos de PS-b-PMMA preparados por *casting*, dopados com nanopartículas de ouro de 11 nm observado por AFM.



Fonte: elaborado pela autora (2015).

A membrana polimérica utilizada no teste de permeação foram avaliadas por MET após o intervalo de 72 horas, antes de realizar a imagem de MET, foi realizado uma lavagem com água deionizada para remoção de sais e possíveis contaminantes sobre a membrana, com intuito de avaliar somente as nanopartículas de ouro que tiveram algum tipo de interação específicas com a membrana.

Observa-se na Figura 21b, aglomerados de nanopartículas de ouro fortemente aderidos a membrana mesmo após a lavagem, evidenciando uma forte interação das nanopartículas de ouro com grupamentos químicos do filme polimérico. A formação desses aglomerados está associada a dois fatos:

✓ O primeiro fato está associado às nanopartículas não terem um elevado potencial zeta, assim favorece as partículas ficarem mais

próximas e aglomerem aumentando de tamanho e assim dificultando a difusão pela membrana, caso os agregados forem maiores que 100 nm podem começar ocorrer a separação de fase e assim diminuir a quantidade de nanopartículas de ouro, diminuindo a quantidade de partículas para migrarem do sistema doador para sistema receptor;

✓ O segundo fato é a forte associação específica das nanopartículas ao filme, na qual observamos também esse fato no filme polimérico, impregnado por ouro analisado por AFM.

O que diferenciou os filmes PS-b-PMMA preparados por *casting*, impregnado com NP do não impregnado por NP de ouro, as membranas impregnadas apresentaram uma boa dispersão homogênea, não tendo formação de agregados, como normalmente estas membranas são utilizadas para estudar a permeação.

5.7 ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-VIS

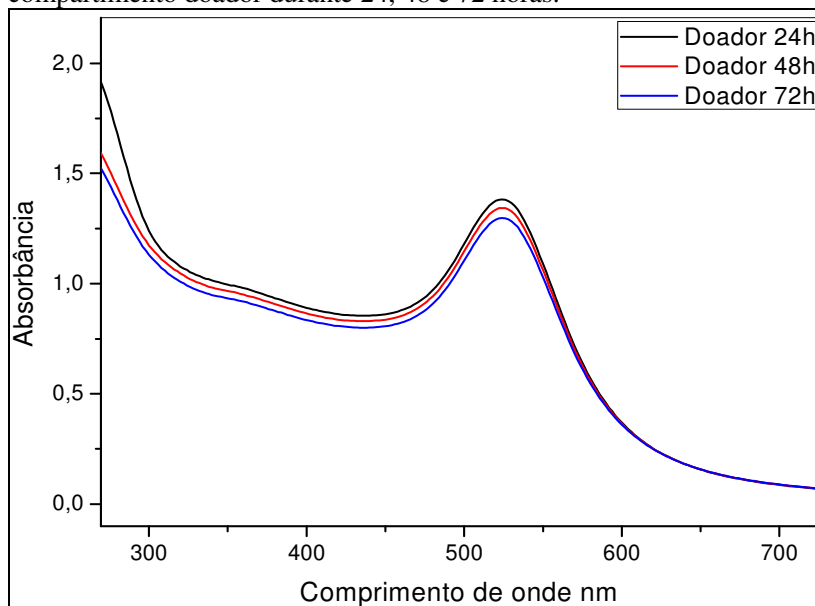
Os experimentos de permeação e difusão foram conduzidos célula de difusão de Franz horizontal conforme Figura 16, com membrana de PS-b-PMMA devidamente hidratada durante 24 horas. No compartimento doador foi inserido GNP com 11 nanômetros no qual se iniciou a coleta após 24 horas, para acompanhar cinética de difusão pela membrana ou a forte interação das nanopartículas de nano ouro com a membrana. Neste período, foram coletadas amostras no doador e receptor durante 24, 48 e 72 horas. As amostras eram coletadas e inseridas nos compartimentos doador e receptor após serem analisadas por espectrofotometria de UV-vis. O gráfico 02 mostra os resultados de espectrofotometria UV-vis no compartimento doador. Observa-se na região λ_{Max} 523 nm típico de GNP tamanho 11 nanômetros

O conteúdo de nanopartículas de ouro foi acompanhado diretamente por espectroscopia de UV-vis, no comprimento de onda de máxima absorção das nanopartículas de ouro, observa-se um efeito hipsocromico, leve após 72 horas esse efeito é facilmente explicado com os aglomerados encontrados na membrana após as análises de MET, mostradas na figura 18. Esses agregados foram formados com decorrer do tempo de exposição devido a baixo potencial zeta, levaram um uma leve diminuição da concentração de nanopartículas de ouro em suspensão, por consequência a uma leve supressão da absorção conforme os resultados do gráfico 02.

Essa explicação é reforçada e evidenciada quando observa-se a solução receptora (gráfico 03) não há um incremento da absorção, ou

seja após 72 horas houve somente uma aglomeração e uma forte interação das nanopartículas de ouro com membrana, o que reforça o que foi visualizado e discutido na imagem de MET, Figura 18.

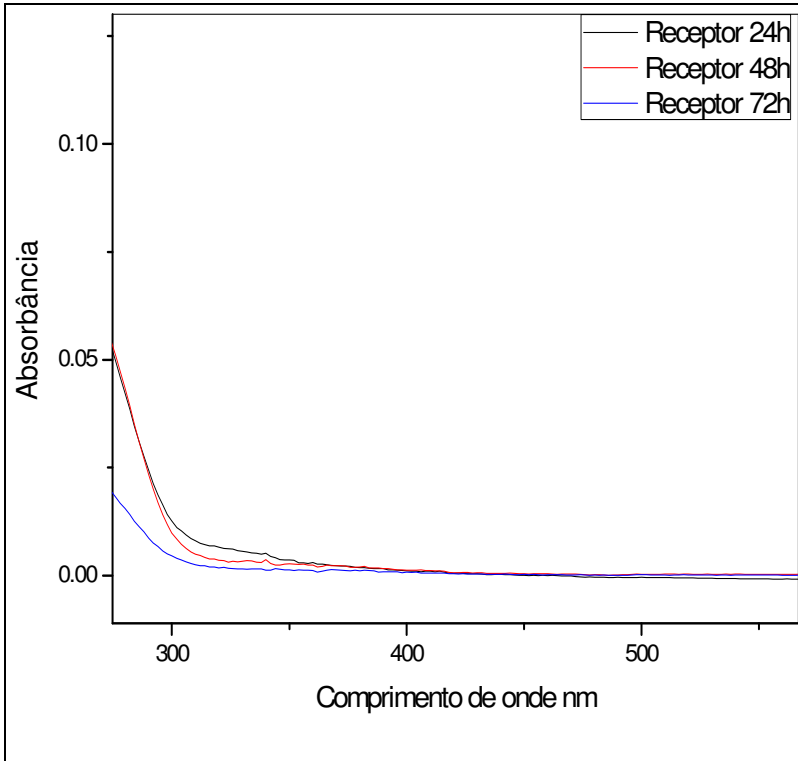
Gráfico 2 - Espectrofotometria de UV-vis com GNP 11 no compartimento doador durante 24, 48 e 72 horas.



Fonte: elaborado pela autora (2015).

No compartimento receptor utilizou-se uma solução salina e coletadas amostras de 24, 48 e 72 horas. As amostras eram coletadas e analisadas por espectrofotometria de UV-vis e após as análises eram colocada novamente no compartimento receptor. Durante a permeação a temperatura dos compartimentos permaneceram na temperatura de 24°C. Conforme demonstra no gráfico 03 não observou-se pico λ_{Max} na região de 523 típico de GNP 11 nm.

Gráfico 3 - Espectrofotometria de UV-vis no compartimento receptor durante 24, 48 e 72 horas.



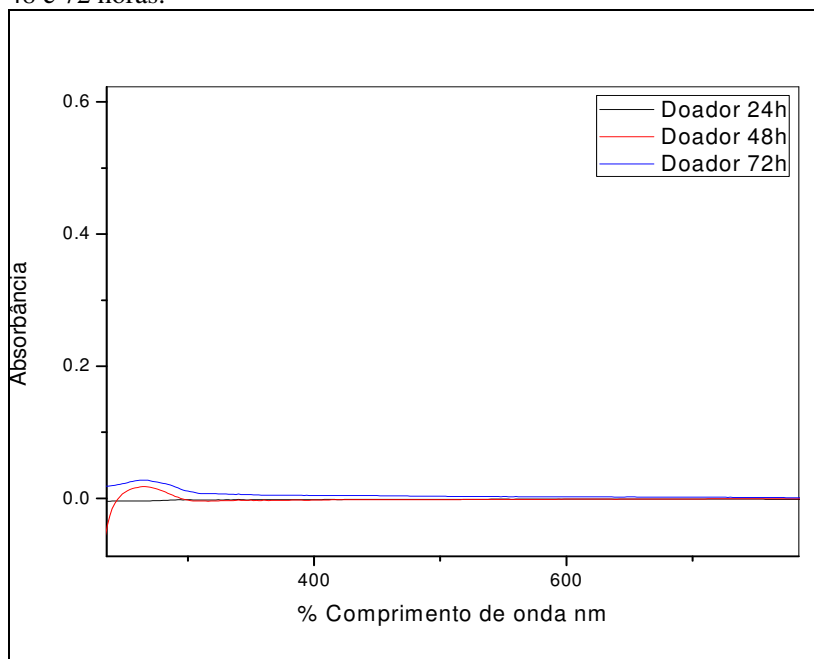
Fonte: elaborado pela autora (2015).

A não permeação das nanopartículas de ouro em suspensão pela membrana polimérica como já discutidas, poderá estar associada alguns fatores, como baixo potencial zeta das nanopartículas (Andrade et al), 2008. No decorrer do tempo começa a formação de aglomerados, que poderá impossibilita a permeação ou difusão pela membrana. A forte interação da nanopartícula com a membrana não tem força motriz suficiente para difundir sem auxílio de um facilitador interno. Outros tipos de membranas comerciais tais com nylon, teflon, ésteres de celuloses utilizadas para sistemas de filtração de solventes ou de solução aquosas, com poros de 0,22 e 0,45 μm usadas como controle para permeação de partículas metálicas, demonstraram não ser efetivas, mesmo como número de poros maiores que os filmes de PS-b-PMMA.

Analisou-se teste de difusão com membrana impregnada de GNP com 11 nanômetros. No compartimento doador e receptor utilizou-se solução salina sobre agitação a uma temperatura de 24°C. Foram coletadas amostras de 24, 48 e 72 horas em ambos compartimentos, após analisados por espectrofotometria de UV-vis as amostras eram depositadas novamente em seus compartimentos. O gráfico 04 mostra os resultados de espectrofotometria de UV-vis no doador, não observando pico λ_{Max} na região de 520 típico de GNP 11 nm, as mesmas observações para o receptor, mesmo obtendo um filme polimérico com nanopartículas de ouro bem dispersas, não foi o suficiente para ocorrer a difusão, evidenciando que as nanopartículas de ouro estão fortemente ancoradas por ligações específicas a membrana.

Para utilização das membranas de PS-B-PMMA para permeação e difusão de nanopartículas de ouro não é efetivo sem utilização de um meio externo facilitador que possam ser uma força motriz para que ocorra a permeação ou difusão dessas partículas.

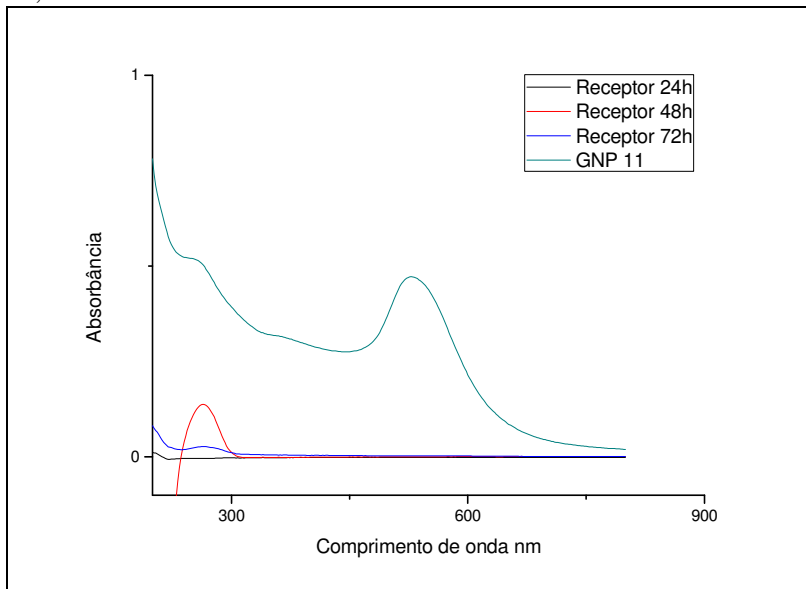
Gráfico 4 - Espectrofotometria de UV-vis com a membrana impregnada de GNP no compartimento doador solução salina analisadas durante 24, 48 e 72 horas.



Fonte: elaborado pela autora (2015).

Conforme mostra o Gráfico 5 a análise de espectrofotometria UV-vis no compartimento receptor não houve pico λ_{Max} na região de 520 nm.

Gráfico 5 - Espectrofotometria de UV-vis com a membrana impregnada com GNP no compartimento receptor, solução salina analisadas durante 24, 48 e 72 horas.



Fonte: elaborado pela autora (2015).

6 DISCUSSÃO

Em uma solução geralmente divide-se em duas regiões: uma região interna que inclui íons fortemente ligados à superfície e uma região exterior onde a distribuição dos íons é determinada pelo equilíbrio entre forças eletrostáticas e movimento térmico. Dessa forma, o potencial nessa região decai com o aumento da distância da superfície até a uma distância suficientemente segura, atingir o potencial da solução. Esse potencial é convencionalmente chamado de Potencial Zeta (Andrade et al., 2008). O valor ideal do Potencial Zeta deve ser maior ou igual a ± 30 mV. O potencial zeta encontrado para GNP 11 nanômetros foi de $-12,00 \pm 2,25$ este valor poderá manter as partículas estáveis em suspensão porém não suficiente para separar uma das outras, assim formando pequenos agregados que são sujeitos a separação de fase depois de alguns dias.

Para a medição do tamanho e da distribuição das moléculas é realizado a técnica DLS. O espalhamento de luz através do movimento Browniano das partículas, faz com que a luz seja espalhada com intensidade diferente. A análise da intensidade desta flutuação resulta na relação Stokes-Einstein. A função de correlação foi representada por uma boa curva mono-exponencial, indicando uma boa correlação da amostra, uma solução aquosa em nanopartículas esféricas com baixa polidispersidade com diâmetro ($2R_H = 11,0$ nm). Observa-se ainda a presença de uma contribuição de espalhamento de luz atribuído à formação de grandes agregados com estruturas flexíveis.

A análise de Microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada para o estudo do material para observação em caráter superior. A imagem obtida por MET confirma a existência nanopartículas esféricas com tamanhos de 11 nm, com curvas típicas de partículas esféricas com baixa polidispersidade. A distância entre as lamelas, foi de aproximadamente 30 nm, essa membrana possui uma condição para difusão de materiais com tamanhos inferiores a 30 nm, sendo promissores nessas condições para atuarem como sistemas liberadores de fármacos ou sensores.

O perfil de SAXS evidenciou partículas com morfologia esférica na faixa aproximada de 11 nm com uma polidispersão de 0,14 evidenciando sua morfologia como DLS e MET, porém com uma curva vermelha não ajustada aos dados experimentais evidenciando a formação de agregados.

A interação das nanopartículas com a membrana polimérica pode facilitar a liberação ou a permeação pela membrana dependendo da litografia ou poderá reter as nanopartículas. Talvez a permeação das partículas dopadas poderá facilitar somente a liberação por difusão lenta com ou não auxílio de uma técnica complementar, como iontoforese ou ultrassom. Conforme mostrado nas análises de espectrofotometria de UV-vis o teste de difusão com PS-b-PMMA e GNP 11 no compartimento doador e receptor não observou-se pico λ_{Max} na região de 520 típico de GNP 11 nm. No teste de difusão com membrana impregnada de GNP, nos compartimentos doador e receptor também não foi observado pico λ_{Max} na região de 520 característico das nanopartículas de ouro.

7 CONCLUSÃO

Neste contexto, concluiu-se que as nanopartículas de ouro foram efetivamente sintetizadas e caracterizadas, apresentaram forma e tamanhos correspondentes ao diâmetro médio de 11 nm e que as soluções de GNP utilizadas apresentaram estabilidade química, assegurando a confiabilidade do estudo proposto.

A metodologia de preparação e caracterização dos filmes de PS-b-PMAA por *casting* com a escolha de um bom solvente para ambos os blocos mostrou-se eficiente, com distancias entre as lamelas do copolímero de 30 nm, evidenciados por MET possuindo uma condição para difusão de materiais com tamanhos inferiores a 30 nm.

Concluiu-se que durante a difusão da célula de Franz não houve permeação de nanopartículas de ouro na região pico λ_{Max} na região de 520 típico de GNP 11 nm. Durante a difusão com membrana impregnada de GNP com 11 nanômetros, nos compartimentos doador e receptor também não foi observado pico λ_{Max} na região de 520 característico de GNP 11 nm. Pode estar associado ao baixo potencial zeta que ao recorrer do tempo poderá ocorrer formação de aglomerados, que impossibilita a permeação ou difusão pela membrana. A forte interação das nanopartículas com a membrana não tem força motriz suficiente para difundir sem auxílio de um facilitador interno. Também a forte associação específica das nanopartículas ao filme, impregnado por ouro analisado por AFM. Conforme citados nas referências, os agentes facilitadores poderiam ajudar na capacidade de melhorar a eficácia dos medicamentos e a melhoria da adesão dos compostos farmacêuticos, como a iontoforeses e o ultrassom.

- **Perspectivas futuras**

Conforme citamos no estudo, a utilização de agentes facilitadores como a iontoforese e o ultrassom poderá ajudar na liberação das nanopartículas, na permeação ou a passagem da barreira polimérica PS-b-PMMA.

REFERÊNCIAS

ABETZ, V. (Ed.). **Block Copolymers I: Advances in Polymer Science**. Springer, Germany, 2005.

AGNE J.E. Eu sei Eletroterapia. Santa Maria: Pallotti, 2009. 365 p.

AISSOU, K. e colaboradores. Self-assembled block polymer templates as high resolution lithographic masks. **Surface Science**, v. 601, p. 2611–2614, 2007.

ALLEN, C.; MAYSINGER, D.; EISENBERG, A., Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.16, p. 3-27, 1999.

AMIT Alexander et at. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. **Journal of Controlled Release, Drug Delivery System**, v. 161, p. 26-40, 2012.

ANDRADE, J. E. Medidas de Tamanho e Potencial Zeta de Nanopartículas Utilizando Espalhamento de Luz, Universidade Federal do Sergipe, 2008.

BADER, H.; RINGSDORF, H.; SCHMIDT, B. Watersoluble Polymers In Medicine. **Angewandte Makromolekulare Chemie**, v.123, p. 457-485, 1984.

BHANVASEA B.A; SONAWANE S.H. Ultrasound assisted in situ emulsion polymerization for polymer nanocomposite: A review. **Journal Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**,. v. 85, p. 86-112, 2014.

CARDOSO, Eria et al. Acute and chronic administration of gold nanoparticles cause dna damage in the cerebral cortex of adult rats. **Journal Mutation Research**, v.766-767, p.25-30, 2014.

CHIEN, Y.W. **Novel Drug Delivery Systems**. Marcel Dekker, Inc. Ed. New York, 1990(2).

DAI, C-A e colaboradores. Reinforcement of Polymer Interfaces with Random Copolymers. **Physical Review Letters**, v. 73, p. 2472-2475, 1994.

DARLING, S. D. Directing the self-assembly of block copolymers. **Progress in Polymer Science**, v. 23, p. 1152-1204, 2007.

DOHNERT, M. B et al. Gold nanoparticles and diclofenac diethylammonium administered by iontophoresis reduce inflammatory cytokines expression in Achilles tendinitis. **Journal International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p.1651-1657, 2012.

DUNCAN Bradley; KIM Chaekyu; ROTELLO M. Vincent; Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v.148, p. 122 – 127, 2011.

DAL-BÓ, Alexandre Gonçalves . Preparação e caracterização de novos anfifílicos funcionalizados com (Oligo-e Polissacarídeos). Tese Doutorado.Universidade Federal de Santa Catarina,Florianópolis, SC, 2011.

FELICE Betiana et al. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. **Materials Science and Engineering C**. 2014. v.41, p.178 - 195.

GROSH et al. Gold nanoparticles in delivery applications. **Journal Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1307-1315, 2008.

GUFFEY, J.S.; KNAUST, M.L. The use and efficacy of ultrasound. **Rehab Manag**, v. 44, n. 11, p. 48– 50, 1997.

HAMLEY, I. W. Nanotechnology with Soft Materials. **Soft Materials**, v. 42, p. 1692-1712, 2003.

HSIEH Y.L. Effects of Ultrasound and Diclofenac Phonophoresis on Inflammatory Pain Relief: Suppression of Inducible Nitric Oxide Synthase In Arthritic Rats. **Journal Physical Therapy**, 2006, v. 86, p.39-49, 2006.

HUANG Y. et al. Co-administration of protein drugs with gold nanoparticles to enable percutaneous delivery. **Journal Biomaterials**, v. 31, p. 86-91, 2011.

JABBARRI, E.; KHAKPOUR, M. Morphology of and release behavior from porous polyurethane microspheres. **Biomaterials**, v.21, p. 2073-2079, 2000.

KEVIN A. et al. Solvent annealing thin films of poly(isoprene-b-lactide). **Polymer**, v. 4, p. 11635–11639, 2005.

KOO, Joseph H. **Polymer nanocomposites: processing, characterization, and applications**. New York: McGraw-Hill, c 2006. xii, 272 p.

KRISHNAMOORTHY, S. et al. Tunable, high aspect ratio pillars on diverse substrates using copolymer micelle lithography: an interesting platform for applications. **Nanotechnology**, v. 19, p. 285301-285306, 2008.

LANDFESTER, K. The generation of nanoparticules in miniemulsion. **Advanced Materials**, v. 13, p. 765-768, 2001.
Langer, R., Drug delivery and targeting. **Nature**, v.392, p. 5-11, 1998.

LANGER, R. New methods of drug delivery. **Scienc**, v. 249, p. 1527-1533, 1990.

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

LEVINTOVA, Yuliya; PLAKOGIANNIS, Fotios M; BELLANTONE, Robert A. An improved in vitro method for measuring skin permeability that controls excess hydration of skin using modified Franz diffusion cells. **Journal of Pharmaceutics, Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 9, p. 96-116, 2011.

LIU Danhua et al. Permeation measurement of gestodene for some biodegradable materials using Franz diffusion cells. **Journal Saudi Pharmaceutical**, v. 22, p. 489 – 602, 2014.

LOVINGER, A. J. Polymer research in a era of prefixes. **Polym. Rev.** v. 45, n. 3, p. 195-199, 2005.

LYAKHOVA, K. S. Kinetic Pathways of Order-to-Order Phase Transitions in Block Copolymer Films under an Electric Field. **Macromolecules**, v. 39, p. 3024-3037, 2006.

MANSKY, P. Nanolithographic templates from diblock copolymer thin films. **Applied Physics Letters**, v. 68, p. 2586-2588, 1996.

PAULA M.M.S. et al. Gold nanoparticles and/or *N*-acetylcysteine mediate carrageenan-induced inflammation and oxidative stress in a concentration-dependent manner. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 113, p.3323-3330, 2015.

PRABHAKER D; SREEKANTH J; JAYAVEERA K. N. Transdermal Drug Delivery Patches: A Review. **Journal Drug Delivery & Therapeutics**, v. 3, p. 213-221, 2013.

PRAÇA, Fabiola Silva Garcia. Liberação e permeação in vitro de produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais. 2011. 44 f. **Tese (Doutorado)** - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

PRADEEP, T. **Nano: the essentials: understanding nanoscience and nanotechnology**. New York: McGraw-Hill, 2008. xvii, 432 p.

RAMSDEN, Jeremy. **Nanotechnology: an introduction**. Oxford: William Andrew: Elsevier, 2011. xiii, 272 p.

RIJCKEN, C.J.F. et al. Triggered destabilisation of polymeric micelles and vesicles by changing polymers polarity: An attractive tool for drug delivery. **Journal Of Controlled Release**, v. 120, n. 3, p. 131-148, 2007.

ROBINSON J.R; LEE V.H.L. **Controlled drug delivery and fundamentals applications**. 2 ed; 1987.

SHUTAO, Guo; LEAF, Huang. Nanoparticles containing insoluble drug for cancer therapy. **Jornal Biotechnology Advances, Biotechnology in Nanomedicine**, v. 32, p. 778-788, 2014.

SILVA, H.C.S. Nuno et al. Bacterial cellulose membranes as transdermal delivery systems for diclofenac: *In vitro* dissolution and permeation studies. **Journal Carbohydrate Polymer**, v. 116, p. 264-269, 2014.

SILVA, J.A et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, p.125-131, 2011.

SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X.; KIEMLE, David J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007. 490 p.

SONAVANE Ganeshchandra et al. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. **Journal Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 65, p. 01-11, 2008.

SPARKS, Sherron. **Nanotechnology: business applications and commercialization**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2012. xv, 253 p.

STAMATIALIS D.F. et al. Medical applications of membranes: Drug delivery, artificial organs and tissue engineering. **Journal of Membrane Science**, v. 308, p. 1-34, 2008.

STOYKOVICH, M. P.; NEALY, P. F. Block Copolymer and conventional lithography. **Materialstoday**, v. 20, p. 20-29, 2006.

TSAI C.Y. et al. Amelioration of collagen-Induced arthritis in rats by nanogold. **Journal Arthritis Rheum**, v. 56, p. 544-554, 2007.

TURKEVICH J; STEVENSON P; HILLIER J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussion Faraday Society**, v. 11, p.55-60, 1951.

VIGDERMAN Leonid; ZUBAREV R. Eugene. Therapeutic platforms based on gold nanoparticles and their covalent conjugates with drug molecules. **Journal Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 663-676, 2012.

VILLALOBOS L.F et al. Poly-thiosemicarbazide/gold nanoparticles catalytic membrane: In-situ growth of well-dispersed, uniform and stable gold nanoparticles in a polymeric membrane. **Journal Catalysis Today**, v. 236, p. 92-97, 2014.

WATTS, P.J. et al. Microencapsulation using emulsification/ solvent evaporation an overview of techniques and applications. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Sytems**, v. 7, n. 3, p. 235-259, 1990.

ZORTEA, D et al. Effects of Phonophoresis and Gold Nanoparticles in Experimental Model of Muscle Overuse: Role of Oxidative Stress. **Journal Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 41, p. 151-162, 2014.