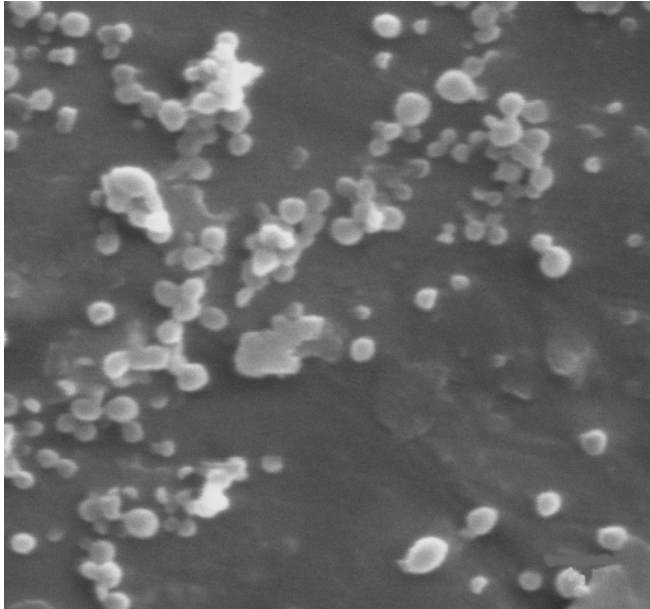


Foto: Celli Rodrigues Muniz



Preparação de Nanocápsulas Poliméricas para Visualização em Microscopia Eletrônica de Varredura

Kirley Marques Canuto¹
Náyra de Oliveira Frederico Pinto²
Celli Rodrigues Muniz³
Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo⁴

Introdução

Nanocápsulas poliméricas são sistemas carreadores de ingredientes ativos, sólidos ou líquidos, que apresentam diâmetro inferior a 1 μm , compostos de um núcleo oleoso revestido por uma parede polimérica ultrafina com elevada capacidade de carga (Figura 1) (BECK et al., 2011; SURASSMO et al., 2010). Desenvolvidos a partir de formulações cujas cápsulas se encontram em suspensão coloidal, os carreadores nanoencapsulados são estabilizados por agentes tensoativos de natureza lipofílica ou hidrofílica, sendo sua parede composta por materiais poliméricos biocompatíveis e biodegradáveis que, conjuntamente, devem garantir a formação do sistema de entrega do componente ativo (LARA, 2008).

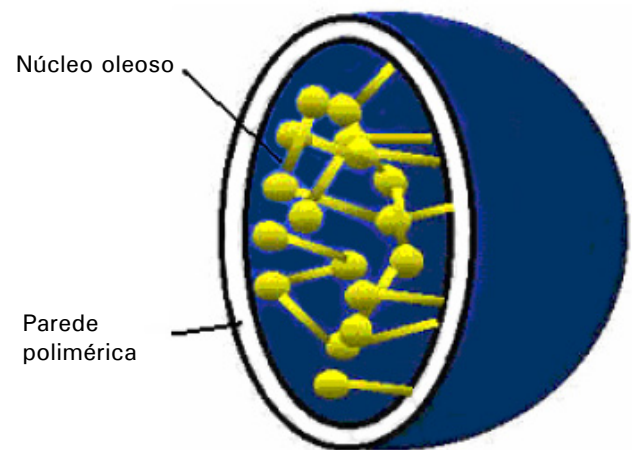


Figura 1. Representação esquemática de nanocápsulas poliméricas.

Fonte: Adaptado de Nanomedicina, 2014.

¹ Farmacêutico, D.Sc. em Química Orgânica, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, kirley.canuto@embrapa.br

² Engenheira de alimentos, M.Sc. em Engenharia Química pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, nnayrapinto@gmail.com

³ Bióloga, D.Sc. em Biotecnologia, analista da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, celli.muniz@embrapa.br

⁴ Engenheira de alimentos, D.Sc. em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, henriette.azeredo@embrapa.br

Utilizada principalmente como veículo para fármacos lipofílicos, a nanoencapsulação é uma técnica que tem sido empregada para melhorar as características de ingredientes ativos quanto à solubilidade em água, forma de armazenamento e estabilidade térmica, com possibilidade de liberação controlada em concentrações reduzidas (HABIB et al., 2012; FLORES et al., 2011). Essas características são conferidas devido ao seu tamanho submicrométrico, sendo a distribuição de tamanho um fator fundamental para garantir a sua qualidade nanotecnológica (BECK et al., 2011).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma importante ferramenta na caracterização morfológica das nanocápsulas, pois possibilita avaliar, além da forma e da superfície das cápsulas geradas, o tamanho e a sua distribuição, permitindo aumentos acima de 50.000 vezes e imagens tridimensionais de alta resolução (> 1 nm), o que torna essa técnica bastante versátil (DOMINGUES et al., 2008; DEDAVID et al., 2007).

A caracterização morfológica das nanocápsulas, porém, pode ser comprometida devido à sua natureza coloidal e à presença dos constituintes que compõem suas formulações, tornando-as aglomeradas e agrupadas, quando visualizadas no MEV, impedindo a observação individualizada dessas nanoestruturas. Faz-se necessária, portanto, preparação prévia das amostras a fim de que seja possível uma visualização eficiente. Dessa forma, propõe-se uma metodologia adaptada de Youm et al. (2011), descrita abaixo, que visa à recuperação e separação das nanocápsulas obtidas, mediante o uso de uma etapa de ultracentrifugação, que as separa do material em suspensão coloidal, cujo componente principal é um tensoativo. Para isso, foram empregadas nesta metodologia nanocápsulas poliméricas em suspensão, produzidas utilizando-se policaprolactona como polímero de revestimento e um tensoativo do tipo não iônico como agente estabilizante (PINTO et al., 2013).

Recuperação das nanocápsulas poliméricas para visualização em MEV

Para a recuperação das nanocápsulas, cerca de 35 mL da suspensão coloidal foram transferidos

para um tubo Falcon com tampa (50 mL). O tubo fechado contendo a amostra foi então levado à ultracentrífuga (Eppendorf, modelo 5810R) com programação de velocidade e temperatura de 12.000 rpm a 5 °C, respectivamente, durante 30 minutos. Após o primeiro ciclo de centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o tubo, completado com água deionizada em volume aproximado de 35 mL. O tubo fechado foi agitado manualmente para facilitar a retirada de tensoativo residual. Esse ciclo foi repetido por mais uma vez acompanhado de uma terceira centrifugação. O processo de recuperação foi finalizado com o último descarte de sobrenadante e a obtenção das nanocápsulas concentradas (Figura 2). Uma gota da amostra obtida foi retirada com o auxílio de uma pipeta de pasteur e diluída com água deionizada em um balão volumétrico de 50 mL. Gotas das nanocápsulas diluídas foram então depositadas sobre *stubs* (porta-amostras que entram no MEV), que foram submetidos à secagem em temperatura ambiente (~ 25 °C) sob abrigo de luz e vento. Após a secagem, as gotas depositadas formaram uma película que, em seguida, foi submetida ao recobrimento metálico para visualização em MEV.

Para efeito de comparação, amostras da suspensão de nanocápsulas não recuperadas também foram preparadas para visualização em MEV. Gotas da suspensão de nanocápsulas (0,5 μ L) diluída em água deionizada (50 mL) foram depositadas sobre os porta-amostras, submetidas à secagem em temperatura ambiente (~ 25 °C), sob abrigo de luz e vento e recobertas com o material metálico. Uma segunda amostra consistiu no gotejamento da suspensão de nanocápsulas não diluídas, seguindo os mesmos procedimentos para realização da análise.

Microscopia eletrônica de varredura

A análise morfológica foi realizada em instrumento de MEV Zeiss DSM, modelo 940A. A amostra seca foi recoberta com uma camada de platina de 60 nm de espessura em evaporadora EMS e observada a uma voltagem de aceleração de 15 kV. As fotomicrografias foram registradas com representatividade da área total da amostra depositada no *stub* e aumentos de imagens de 1.000 a 20.000 vezes.

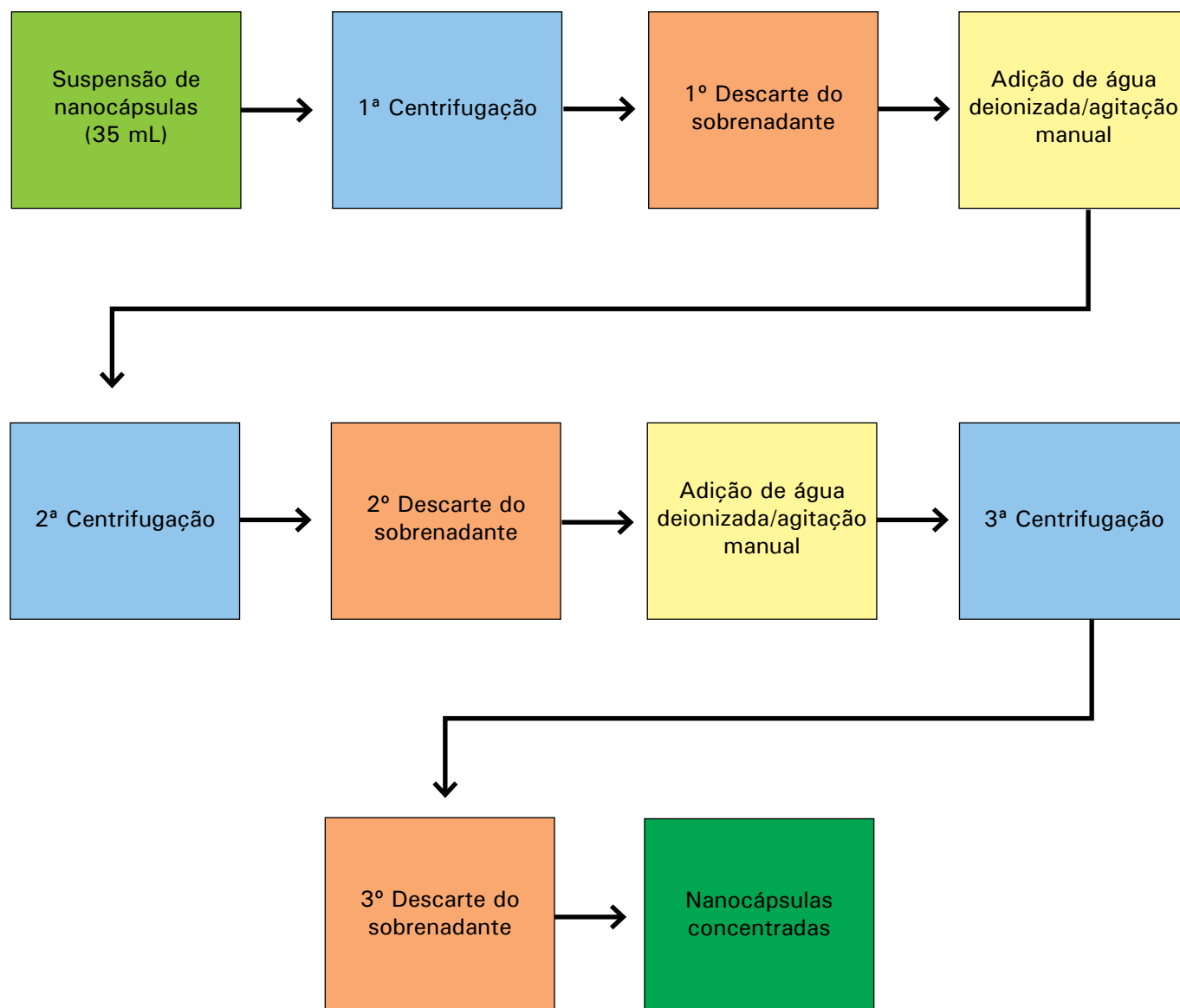


Figura 2. Fluxograma do processo de recuperação de nanocápsulas em suspensão coloidal.

As imagens referentes às amostras de nanocápsulas não recuperadas e não submetidas à metodologia aqui descrita estão mostradas na Figura 3 a, b, c, d. Nessas imagens, observa-se a compactação e agregação do material, impossibilitando a perfeita caracterização microscópica das amostras. A formação de aglomerado é frequentemente evidenciada em imagens obtidas por técnicas de microscopia de alta resolução em suspensões coloidais de nanocápsulas (HABIB et al., 2012; SURASSMO et al., 2010; CHOI et al., 2009), sendo particularmente difícil de separá-las para visualização em microscopia.

Por outro lado, a lavagem da suspensão de nanocápsulas seguida do processo de separação

por ultracentrifugação permitiu sua caracterização morfológica efetiva. Por meio das fotomicrografias da população de nanocápsulas recuperadas por ultracentrifugação (Figura 3 e, f, g, h), foi possível a visualização, em escala nanométrica, de cápsulas esféricas bem definidas, individualizadas e homogêneas. As nanocápsulas mantiveram-se mais separadas e menos agregadas, podendo-se perceber, assim, detalhes de suas estruturas, como, por exemplo, a ausência de fissuras na superfície das partículas, indicando a formação de filme contínuo na parede externa das cápsulas. Foi possível observar também que as partículas apresentaram diâmetros abaixo de 500 nm (Figura 3h), dentro da faixa característica de sistemas nanocapsulados (GOGOTSI, 2006).

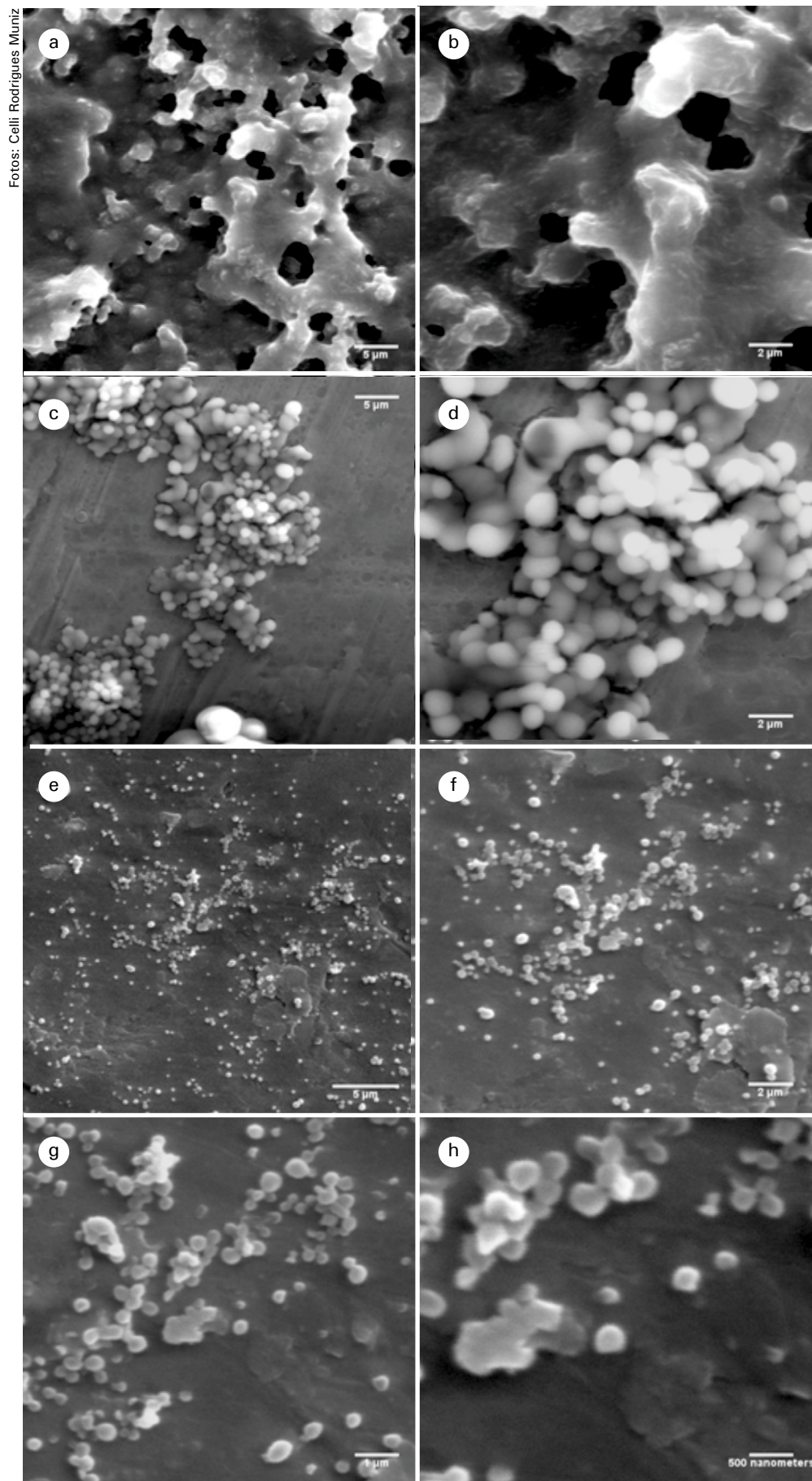


Figura 3. Nanocápsulas em suspensão concentrada (a, b); diluídas (c, d) e recuperadas por ultracentrifugação (e, f, g, h). As fotomicrografias foram obtidas por meio de MEV com aumento de 2.000x (a, c, e), 5.000x (b, d, f), 10.000x (g) e 20.000x (h).

Com base nas imagens obtidas, pode-se concluir que a metodologia aqui sugerida permite a visualização individualizada de nanocápsulas poliméricas em microscopia eletrônica de varredura, sob condições de ótima resolução, com visualização das nanocápsulas individualizadas e menos agregadas. Outras metodologias existentes, que procedem à visualização de nanocápsulas sem o preparo aqui descrito, resultaram em imagens de menor qualidade e sem definição das estruturas. Dessa forma, a metodologia empregada permite a obtenção de imagens de MEV de boa qualidade de suspensões de nanocápsulas contendo tensoativo, assegurando uma caracterização morfológica adequada para esse tipo de material.

Referências

- BECK, R.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. (Ed.). **Nanocosmetics and nanomedicines: new approaches for skin care**. Berlin: Springer, 2011. p. 369.
- CHOI, M.-J.; SOOTTITANTAWAT, A.; NUCHUCHUA, O.; MIN, S.-G.; RUKTANONCHAI, U. Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion-diffusion method. **Food Research International**, v. 42, p. 148-156, 2009.
- DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras – materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. p. 60.
- DOMINGUES, G. S.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. F. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**, v. 31, p. 1966-1972, 2008.
- GOGOTSI, Y. **Nanomaterials Handbook**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006.
- FLORES, F. C.; RIBEIRO, R. F.; OURIQUE, A. F.; ROLIM, C. M. B.; SILVA, C. B.; POHLMANN, A. R.; BECK, C. R.; GUTERRES, S. S. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 34, p. 968-972, 2011.
- HABIB, S.M.; AMR, A.S.; HAMADNEH, I.M. Nanoencapsulation of Alpha-linolenic Acid with Modified Emulsion Diffusion Method. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 89, p. 695-703, 2012.
- LARA, V. C. D. **Desenvolvimento de nanocápsulas contendo ácido retinóico para tratamento tópico da acne**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- NANOMEDICINA. **Farmacologia**. Disponível em: <<http://nanomedicina.webnode.pt/nanotecnologia-e-medicina/farmacologia/>>. Acesso em: 15 mar. 2014.
- PINTO, N. O. F.; AZEREDO, H. M. C.; RODRIGUES, T. H. S.; CANUTO, K. M. Desenvolvimento de nanoemulsão do óleo essencial de *Lippia sidoides*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 53., Rio de Janeiro, 2013. **Química: ampliando fronteiras – resumos**. Rio de Janeiro: ABQ, 2013.
- SURASSMO, S.; MIN, S.-G.; BEJRAPHA, P.; CHOI, M.-J. Effects of surfactants on the physical properties of capsicum oleoresin-loaded nanocapsules formulated through the emulsion-diffusion method. **Food Research International**. v. 43, p. 8-17, 2010.
- YOUM, I.; YANG, X.; MUROWCHICK, J. B.; YOUAN, B.-B. C. Encapsulation of docetaxel in oily core polyester nanocapsules intended for breast cancer therapy. **Nanoscale Research Letters**, v. 630, p. 1-12, 2011.

Comunicado Técnico, 212

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria Tropical

Endereço: Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici,
CEP 60511-110 Fortaleza, CE

Fone: (0xx85) 3391-7100

Fax: (0xx85) 3391-7109 / 3391-7141

E-mail: www.embrapa.br/fale-conosco

1ª edição (2015): disponibilizada on-line no
formato PDF

Comitê de Publicações

Presidente: Marlon Vagner Valentim Martins

Secretário-Executivo: Marcos Antônio Nakayama

Membros: José de Arimatéia Duarte de Freitas, Celli Rodrigues Muniz, Renato Manzini Bonfim, Rita de Cassia Costa Cid, Rubens Sonsol Gondim, Fábio Rodrigues de Miranda.

Expediente

Revisão de texto: Marcos Antônio Nakayama

Editoração eletrônica: Arilo Nobre de Oliveira

Normalização bibliográfica: Rita de Cassia Costa Cid