

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento tecnológico, estudo da fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea *in vitro* da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos

KARINA PAESE

PORTO ALEGRE, 2008.

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento tecnológico, estudo da fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea *in vitro* da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos

Dissertação apresentada por **Karina Paese**  
para obtenção do GRAU DE MESTRE em  
Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa Dra Sílvia Stanisçuaski Guterres

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 25 de abril de 2008, pela Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Édison Luis Santana Carvalho  
Universidade Luterana do Brasil

Prof. Dr. Helder Teixeira Ferreira  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

P126d Paese, Karina  
Desenvolvimento tecnológico, estudo da fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea in vitro da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos / Karina Paese – Porto Alegre : UFRGS, 2008. – xxvi, 185 p.: il., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Benzofenona-3. 2. Nanocápsulas. 3. Permeação cutânea. 4. Fotoestabilidade. 5. Formas farmacêuticas semi-sólidas. I. Guterres, Sílvia Stanisçuaski. II. Título.

CDU: 615.4

Bibliotecárias responsáveis:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Heloísa do Canto Canabarro – CRB 10/1036

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 405  
da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



Aos meus pais Zulmir e Teresina  
e aos meus irmãos Claudio e Jorge (*in memoriam*).





## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Sílvia Stanisçuaski Guterres pela orientação dedicada, paciência e confiança. Sobretudo pelos ensinamentos e oportunidades concedidas.

À Profa. Dra. Adriana Raffin Pohlmann pelas importantes contribuições no decorrer do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelas contribuições na minha formação profissional.

À UFRGS e ao PPGCF-UFRGS pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Valéria Weiss Angeli pelo incentivo constante e pela confiança em mim depositada.

À Marta Palma Alves pelos ensinamentos e pela paciência.

À Profa. Dra. Bartira Rossi-Bergmann e ao Dr. Eduardo Fonseca Pinto pela realização dos testes de alergenidade.

Ao abatedouro e frigorífico Araldi pelo fornecimento das membranas naturais, fundamentais para a realização deste estudo.

Às colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela amizade, apoio e momentos de descontração.

Aos colegas e amigos do laboratório 405 e do grupo de pesquisa pela amizade, paciência e auxílios prestados: Letícia Cruz, Letícia Sias, Letícia Colomé, Franceline Reynaud, Nataly Siqueira, Manuela França, Fernanda Poletto, Alessandra Badejo, Eliezer Jäger, Cristina Venturini, Ana Luiza Maurer da Silva, Irene Kulkämp, Thatiana Terroso, Lali Ronsoni, Sheila Schaffazick, Gislaine Domingues, Renata Raffin, Evelise Assumpção, Manoel Ortiz, Bruna Donida, Denise Jornada, Cristiane Hoffmeister, Ludmila Pinheiro, Ângelo Zanotto, Sandra Hass, Viviane Cattani, Bibiana Araújo, Rodrigo Freddo, Flávia de Toni Uchoa, Patrícia Severino, Cândice Felippi, Clarissa Bettoni, Daniela Conrado, Leandro Tasso, Francine Johansson,

Moacir Kaiser, Laura Oliveira, Cristófer Faria, Cristiane, Daniel Fasolo, Michelle Fraga, Giovanni Zorzi e, em especial, as bolsistas de iniciação científica que participaram diretamente no desenvolvimento deste trabalho: Luana Almeida Fiel e Renata Contri e ao Alessandro Jäger pela ajuda nos testes de fotoestabilidade.

Às amigas Nataly e Giovana, pela amizade, companheirismo e, sobretudo, paciência nos momentos mais difíceis.

Ao Vitor pelo companheirismo, paciência e, sobretudo, amor.

À minha família, em especial aos meus pais Zulmir e Teresina, pela formação que me propicionaram, pelo apoio incondicional, confiança e amor.

Ao CNPq, órgão financiador da bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho e à Rede Nanocosméticos CNPq/MCT pelo apoio financeiro recebido durante a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Objetivos</b> .....	<b>5</b>
2.1 Objetivo Geral .....	7
2.2 Objetivos Específicos .....	7
<b>3 Revisão da Literatura</b> .....	<b>9</b>
3.1 Pele e radiação solar .....	11
3.1.1 Pele .....	11
3.1.2 Radiação solar .....	12
3.1.3 Efeitos da radiação solar sobre a pele .....	13
3.2 Filtros solares .....	15
3.2.1 Benzofenona-3 .....	17
3.2.2 Fotoestabilidade de filtros solares químicos .....	19
3.3 Nanopartículas .....	20
3.4 Nanopartículas e a pele .....	23
3.5 Caracterização reológica de formulações farmacêuticas .....	28
<b>4 Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação da estabilidade de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo benzofenona-3</b> .....	<b>33</b>
4.1 Introdução .....	35
4.2 Materiais e Métodos .....	39
4.2.1 Materiais .....	41
4.2.1.1 Matérias-primas .....	41
4.2.1.2 Aparelhos e equipamentos .....	41
4.2.1.3 Solventes e outros materiais .....	41
4.2.2 Métodos .....	42

4.2.2.1 Teste de inchamento do polímero .....	42
4.2.2.2 Preparação das nanocápsulas .....	43
4.2.2.3 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas .....	44
4.2.2.3.1 Doseamento da BZ3 nas suspensões coloidais (taxa de recuperação) .....	44
4.2.2.3.2 Determinação das taxas de associação .....	45
4.2.2.3.3 Determinação do pH .....	45
4.2.2.3.4 Determinação do diâmetro de partícula e polidispersão .....	45
4.2.2.3.5 Potencial zeta .....	46
4.2.2.3.6 Avaliação da morfologia das nanocápsulas .....	46
4.2.2.3.7 Viscosidade .....	46
4.2.2.3.8 Análises de retroespalhamento de luz .....	47
4.2.2.4 Estabilidade frente ao armazenamento .....	47
4.2.2.5 Descarte de resíduos .....	47
4.3 Resultados e discussão .....	49
4.3.1 Teste de inchamento do polímero .....	51
4.3.2 Caracterização das suspensões de nanocápsulas de BZ3 após preparação .....	52
4.3.3 Morfologia das nanocápsulas (MET) .....	55
4.3.4 Estabilidade das suspensões de nanocápsulas nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias .....	56
4.3.5 Análises de retroespalhamento de luz .....	60
<b>5 Desenvolvimento de bases semi-sólidas contendo benzofenona-3 livre e nanoencapsulada: avaliação da penetração cutânea <i>in vitro</i> do filtro solar químico .....</b>	<b>65</b>
5.1 Introdução .....	67
5.2 Materiais e métodos .....	71
5.2.1 Materiais .....	73

5.2.1.1	Matérias-primas .....	73
5.2.1.2	Aparelhos e equipamentos .....	73
5.2.1.3	Solventes e outros materiais .....	74
5.2.2	Métodos .....	74
5.2.2.1	Preparação das suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo BZ3 .....	74
5.2.2.2	Caracterização da suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo BZ3 .....	75
5.2.2.3	Teste de inchamento do polímero .....	75
5.2.2.4	Preparação das bases semi-sólidas contendo nanocápsulas de BZ3 .....	76
5.2.2.4.1	Hidrogel (HGNCBZ3) .....	76
5.2.2.4.2	Creme-gel (CGNCBZ3) .....	77
5.2.2.4.3	Emulsão água em silicone (SNCBZ3) .....	77
5.2.2.5	Caracterização das bases semi-sólidas contendo nanocápsulas de BZ3 .....	79
5.2.2.5.1	Doseamento do ativo incorporado nas bases semi-sólidas ..	79
5.2.2.5.2	Determinação do diâmetro médio das partículas após incorporação nas bases semi-sólidas .....	80
5.2.2.5.3	Determinação do pH .....	81
5.2.2.5.4	Análise reológica das formulações semi-sólidas .....	81
5.2.2.5.5	Análises de retroespalhamento de luz .....	82
5.2.2.6	Avaliação da permeação <i>in vitro</i> da BZ3 .....	82
5.2.2.6.1	Preparação e estocagem das membranas .....	83
5.2.2.6.2	Célula de difusão <i>in vitro</i> .....	83
5.2.2.6.3	Técnica de <i>Tape stripping</i> .....	84
5.2.2.6.4	Técnica de retenção cutânea .....	85
5.2.2.7	Análise estatística .....	85
5.2.2.8	Descarte de resíduos .....	86

5.3 Resultados e discussão .....	87
5.3.1 Caracterização físico-química da suspensão de nanocápsulas incorporada nas formulações semi-sólidas .....	89
5.3.2 Teste de inchamento do polímero .....	89
5.3.3 Caracterização físico-química das formulações semi-sólidas .....	91
5.3.3.1 Características visuais .....	91
5.3.3.2 Valores de pH e teor de BZ3 nas formulações .....	91
5.3.3.3 Diâmetro médio de partícula .....	93
5.3.3.4 Comportamento reológico das formulações semi-sólidas .....	94
5.3.3.5 Análise de retroespalhamento de luz .....	103
5.3.4 Distribuição da BZ3 nas diferentes camadas da pele avaliada através de experimento <i>in vitro</i> .....	105
<b>6 Avaliação da fotoestabilidade e da alergenicidade da benzofenona-3 nanoencapsulada e incorporada em um hidrogel .....</b>	<b>115</b>
6.1 Introdução .....	117
6.2 Materiais e métodos .....	121
6.2.1 Materiais .....	123
6.2.1.1 Matérias-primas .....	123
6.2.1.2 Aparelhos e equipamentos .....	123
6.2.1.3 Solventes e outros materiais .....	124
6.2.2 Métodos .....	124
6.2.2.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo BZ3 .....	124
6.2.2.2 Preparação do hidrogel contendo nanocápsulas de BZ3 .....	125
6.2.2.3 Análise da presença de nanocápsulas de BZ3 incorporadas no hidrogel através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	126
6.2.2.4 Determinação da fotoestabilidade <i>in vitro</i> da BZ3 nanoencapsulada e livre .....	126
6.2.2.5 Avaliação da capacidade absorptiva da radiação UV pelas formulações HGNCBZ3, HGBZ3 e HGNCBr .....	127

6.2.2.6 Avaliação da alergenicidade da BZ3 nanoencapsulada e livre ..	128
6.2.2.6.1 Teste de alergenicidade por Ensaio do linfonodo local ( <i>local lymph node assay</i> – LLNA) .....	128
6.2.2.6.2 Teste de medida de edema de orelha ( <i>mouse ear swelling test</i> – MEST) .....	130
6.2.2.7 Análise estatística .....	131
6.2.2.8 Descarte de resíduos .....	131
6.3 Resultados e discussão .....	133
6.3.1 Análise da presença de nanocápsulas poliméricas incorporadas no hidrogel através de MEV .....	135
6.3.2 Avaliação da fotoestabilidade da BZ3 nanoencapsulada e livre .....	137
6.3.3 Avaliação da capacidade absorptiva da radiação UV pelas formulações HGNCBZ3, HGBZ3 e HGNCBr .....	138
6.3.4 Determinação da alergenicidade da BZ3 nanoencapsulada e livre ..	140
6.3.4.1 Teste de alergenicidade por Ensaio do linfonodo local ( <i>local lymph node assay</i> – LLNA) .....	140
6.3.4.2 Teste de medida de edema de orelha ( <i>mouse ear swelling test</i> – MEST) .....	142
<b>7 Conclusões .....</b>	<b>145</b>
<b>8 Referências bibliográficas .....</b>	<b>149</b>
<b>9 Anexos .....</b>	<b>163</b>





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Figura 1.1. Número de publicações indexadas considerando o cruzamento das palavras-chave <i>nano*</i> e <i>skin</i> (Source: Web of Sciences, accessed 17 March, 2008) .....	3
Figura 3.1. Fórmula estrutural da BZ3 .....	18
Figura 4.1. Massa de poli( $\epsilon$ -caprolactona) após imersão na mistura BZ3-Miglyol 810 <sup>®</sup> (150 mg/mL) por 45 dias .....	51
Figura 4.2. Reogramas referentes ao Miglyol 810 <sup>®</sup> e à mistura BZ3-Miglyol 810 <sup>®</sup> (150 mg/mL) .....	54
Figura 4.3. Reograma da suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo BZ3 (5 mg/mL) .....	55
Figura 4.4. Fotomicrografias, obtidas por MET, das suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo diferentes concentrações de BZ3 .....	56
Figura 4.5. Diâmetros médios das nanocápsulas contendo concentrações crescentes de BZ3 nos tempos de 0, 30, 60 e 90 dias de estocagem ao abrigo da luz e à temperatura ambiente .....	57
Figura 4.6. Polidispersão das partículas nos tempos de 0, 30, 60 e 90 dias de estocagem ao abrigo da luz e à temperatura ambiente .....	58
Figura 4.7. Recuperação de BZ3 nos tempos de 0, 30, 60 e 90 dias de estocagem ao abrigo da luz e à temperatura ambiente .....	59
Figura 4.8. Potencial zeta nos tempos de 0, 30, 60 e 90 dias de estocagem ao abrigo da luz e à temperatura ambiente .....	59
Figura 4.9. Valores de pH das suspensões de nanocápsulas com concentrações crescentes de BZ3, nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias de estocagem ao abrigo da luz e a temperatura ambiente .....	60
Figura 4.10. Representação esquemática do princípio de funcionamento do Turbiscan .....	61
Figura 4.11. Gráficos de variação do <i>backscattering</i> das suspensões de nanocápsulas contendo BZ3 .....	62
Figura 5.1. Massa de poli( $\epsilon$ -caprolactona) após imersão nos diferentes silicones por 45 dias .....	90
Figura 5.2. Distribuição do tamanho de partícula em relação à intensidade ...	93

Figura 5.3. Reogramas, de tensão de cisalhamento <i>versus</i> tensão de cisalhamento, referentes à série de hidrogel .....	98
Figura 5.4. Reogramas, de tensão de cisalhamento <i>versus</i> tensão de cisalhamento, referentes à série de creme-gel .....	99
Figura 5.5. Reogramas, de tensão de cisalhamento <i>versus</i> tensão de cisalhamento, referentes à série de emulsão água em silicone .....	100
Figura 5.6. Gráficos de variação do <i>backscattering</i> das formulações semi-sólidas contendo ou não nanocápsulas de BZ3 .....	104
Figura 5.7. Distribuição da BZ3 nas diferentes camadas da pele quando incorporada em hidrogel .....	107
Figura 5.8 Distribuição da BZ3 nas diferentes camadas do estrato córneo quando incorporada em hidrogel .....	107
Figura 5.9. Distribuição da BZ3 nas diferentes camadas da pele quando incorporada em creme-gel .....	108
Figura 5.10. Distribuição da BZ3 nas diferentes camadas do estrato córneo quando incorporada em creme-gel .....	109
Figura 5.11. Distribuição da BZ3 nas diferentes camadas da pele quando incorporada em emulsão água em silicone .....	110
Figura 5.12. Distribuição da BZ3 nas diferentes camadas do estrato córneo quando incorporada em emulsão água em silicone .....	110
Figura 5.13. Distribuição da BZ3 no estrato córneo quando liberada a partir das diferentes formulações semi-sólidas .....	112
Figura 5.14. Distribuição da BZ3 na epiderme viável e na derme quando liberada a partir das diferentes formulações semi-sólidas .....	112
Figura 6.1. Representação esquemática do teste de medida de edema de orelha .....	131
Figura 6.2. Fotomicrografias, obtidas por MEV, da superfície cutânea contendo HGNCBZ3 e HGBr .....	136
Figura 6.3. Área sob a curva da BZ3 (%) obtida através da varredura das amostras no espectro do UV .....	137
Figura 6.4. Recuperação da BZ3 (%) avaliada através da concentração de BZ3 .....	138
Figura 6.5. Varredura do HGBZ3, TCCBZ3, HGNCBr, HGNCBZ3. Todas as amostras contêm a mesma concentração de BZ3 (0,375 % p/p) .....	140

Figura 6.6. Índices de estimulação obtidos através do LLNA para as diferentes formulações testadas .....	141
Figura 6.7. DPM/grupo de tratamento obtidos através do LLNA para as diferentes formulações testadas .....	142



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Modelos de fluxo em função das curvas de tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento, equações e parâmetros .....	31
Tabela 4.1. Composição das suspensões de nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) contendo BZ3 .....	43
Tabela 4.2. Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas após preparação .....	53
Tabela 4.3. Recuperação de BZ3 (%) nas suspensões de nanocápsulas nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias .....	63
Tabela 5.1. Composição quali-quantitativa do hidrogel .....	76
Tabela 5.2. Composição quali-quantitativa do creme-gel .....	77
Tabela 5.3. Composição quali-quantitativa da emulsão água em silicone .....	78
Tabela 5.4. Soluções extratoras utilizadas na extração da BZ3 contida nas bases semi-sólidas em estudo .....	80
Tabela 5.5. Diferentes modelos matemáticos que descrevem fluídos não-newtonianos .....	82
Tabela 5.6. Teor e pH das formulações semi-sólidas contendo ou não nanocápsulas .....	92
Tabela 5.7. Coeficientes de regressão referentes aos modelos que descrevem, respectivamente, os comportamentos não-newtonianos plástico perfeito, plástico, pseudoplástico e pseudoplástico com valor de cedência da série de formulações de hidrogel, creme-gel e emulsão água em silicone .....	96
Tabela 5.8. Índice de fluxo e valor de consistência das formulações semi-sólidas contendo ou não nanocápsulas .....	102
Tabela 6.1. Percentagem do edema de orelha obtido por MEST, para as diferentes formulações estudadas .....	143



## LISTA DE ABREVIATURAS

BZ3: Benzofenona-3;

CGBr: Creme-gel branco;

CGBZ3: Creme-gel contendo benzofenona-3 livre;

CGNCBZ3: Creme-gel contendo benzofenona-3 nanoencapsulada;

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência;

CV: Coeficiente de variação;

DL: Dose letal;

DME: Dose eritematosa mínima;

DP: Desvio padrão;

DPM: Desintegrações por minuto;

FPS: Fator de proteção solar;

HGBr: Hidrogel branco;

HGBZ3: Hidrogel contendo benzofenona-3 livre;

HGNCBr: Hidrogel contendo nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) sem benzofenona-3;

HGNCBZ3: Hidrogel contendo benzofenona-3 nanoencapsulada;

HP- $\alpha$ -CD: Hidropropil- $\alpha$ -ciclodextrina;

LLNA: *Local lymph node assay*;

MCO: Metoxicinamato de octila;

MEST: *Mouse ear swelling test*;

SBE- $\beta$ -CD: sulfobutileter- $\beta$ -ciclodextrina;



SBr: Emulsão água em silicone branca;

SBZ3: Emulsão água em silicone contendo benzofenona-3 livre;

SNCBZ3: Emulsão água em silicone contendo benzofenona-3 nanoencapsulada;

TCCBZ3: Triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico contendo benzofenona-3;

UV: Ultravioleta.

## RESUMO

Nanocápsulas poliméricas têm sido propostas como carreadores para filtros solares com o objetivo de prolongar o tempo de resistência desses no estrato córneo. O presente trabalho teve por objetivo avaliar comparativamente a permeação cutânea *in vitro* da benzofenona-3 (BZ3) a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes formulações semi-sólidas. Primeiramente, suspensões de nanocápsulas contendo concentrações crescentes de BZ3 foram preparadas, caracterizadas físico-quimicamente e sua estabilidade foi determinada. A suspensão contendo 5 mg/mL de BZ3 apresentou diâmetro médio de  $247 \pm 4$  nm, potencial zeta de  $-9,50 \pm 1,02$  mV, pH de  $6,6 \pm 0,1$ , teor e taxa de associação próximos a 100 % e foi selecionada para a continuidade do estudo. Na segunda etapa do trabalho a suspensão de nanocápsulas contendo 5 mg/mL de BZ3 foi incorporada em diferentes formulações semi-sólidas, hidrogel (HGNCBZ3), creme-gel (CGNCBZ3) e emulsão água em silicone (SNCBZ3). Estas formulações semi-sólidas foram caracterizadas segundo teor, pH, diâmetro médio das nanocápsulas incorporadas e comportamento reológico. As formulações semi-sólidas apresentaram pH adequado para aplicação cutânea, teores experimentais próximos aos valores teóricos e comportamento reológico não-newtoniano pseudoplástico. A permeação cutânea do filtro solar foi avaliada através de células de difusão de Franz e as formulações contendo BZ3 nanoencapsulada apresentaram maior quantidade e tempo de resistência do filtro no estrato córneo, comparando com as formulações contendo o ativo livre. A SNCBZ3 apresentou maior quantidade da BZ3 no estrato córneo quando comparada ao HGNCBZ3 e ao CGNCBZ3. Em uma última etapa do trabalho avaliou-se a fotoestabilidade da BZ3 nanoencapsulada e livre frente à irradiação por UVA e concluiu-se que a nanoencapsulação aumenta a fotoestabilidade da BZ3. Também foi avaliada a alergenicidade do filtro solar químico e observou-se que, nem o filtro nanoencapsulado ou livre, nem as nanocápsulas sem o ativo, apresentaram sensibilização cutânea. Em conclusão, o conjunto dos resultados obtidos demonstra que estas formulações são sistemas promissores para a aplicação cutânea de filtros solares.

**Palavras-chaves:** benzofenona-3, nanocápsulas, formulações semi-sólidas, permeação cutânea, fotoestabilidade.



## ABSTRACT

Polymeric nanocapsules have been proposed as carriers for sunscreens in order to prolong the residence time of these substances in the stratum corneum. The aim of this work was to evaluate *in vitro* the skin permeation of benzophenone-3 (BZ3) from polymeric nanocapsules incorporated in different semi-solid formulations. Nanocapsule suspensions containing different concentrations of BZ3 were prepared, physico-chemically characterized and their stability was determined. The suspension containing 5 mg/mL of the BZ3 presented average size of  $247 \pm 4$  nm, zeta potential of  $-9,50 \pm 1,02$  mV and pH values of  $6,6 \pm 0,1$ . This sample showed an amount of BZ3 and drug entrapment of 100 %. The nanocapsule suspension containing 5 mg/mL was incorporated in different semi-solid formulations, hydrogel (HGNCBZ3), cream-gel (CGNCBZ3) and emulsion water in silicon (SNCBZ3). The amount of BZ3, pH, average size and rheological properties of these formulations were evaluated. The formulations presented pH adequate for skin application and content of BZ3 close to 100 %. All semi-solid formulations showed pseudoplastic rheological behavior. The skin permeation of BZ3 was evaluated by Franz diffusion cells and the formulation containing nanoencapsulated BZ3 showed an increase in the residence time of sunscreen in the stratum corneum and high amount of BZ3 compared to the formulations containing the free sunscreen. SNCBZ3 presented greater BZ3 quantity in the stratum corneum compared to HGNCBZ3 and CGNCBZ3. Finally, the photostability of free and nanoencapsulated BZ3 under UVA irradiation was evaluated and the results indicated that the nanoencapsulation increased the BZ3 photostability. The allergenicity of free and nanoencapsulated BZ3 was also determined. Nanoencapsulated or free BZ3, and empty nanocapsules, did not present skin sensitization. In conclusion, the results indicated that these formulations are promising delivery systems for the cutaneous applications of sunscreens.

**Key-words:** benzophenone-3, nanocapsules, semi-solid formulation, skin permeation, photostability.



## **1 APRESENTAÇÃO**

---



A presente dissertação de mestrado enquadra-se no âmbito das atividades da Rede de Pesquisa Nanocosméticos financiada pelo CNPq. A nanotecnologia aplicada a produtos cosméticos e dermatológicos é uma área de pesquisa e desenvolvimento tecnológico que vem crescendo significativamente nos últimos anos. Uma busca nos bancos de dados do ISI (THE THOMSON CORPORATIONS) mostra que a partir da década de 1990 há um aumento exponencial das publicações referentes a nanobiotecnologia no desenvolvimento de produtos cutâneos (Figura 1.1).

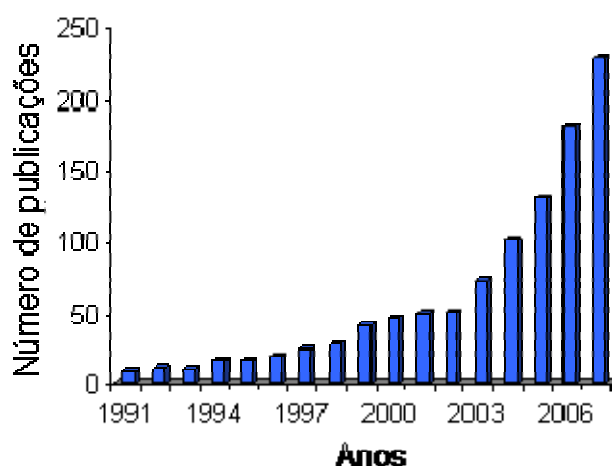


Figura 1.1. Número de publicações indexadas considerando o cruzamento das palavras-chave *nano\** e *skin* (Source: Web of Sciences, accessed 17 March, 2008).

Um nanocosmético pode ser definido com sendo uma formulação cosmética que veicula ativos ou outros ingredientes nanoestruturados e que apresenta propriedades superiores quanto a sua *performance* em comparação com produtos convencionais (FRONZA *et. al*, 2007). O presente trabalho está centrado no desenvolvimento de nanocosméticos para a área da fotoproteção. Para tal, a benzofenona-3, um filtro solar de amplo espectro, foi selecionada para a nanoencapsulação. Este filtro solar químico vem sendo estudado, por vários Grupos de Pesquisa vinculados à Rede Nanocosméticos e foi selecionado como *template* para estas atividades de pesquisa da rede devido aos requisitos que uma formulação fotoprotetora impõe, muitas vezes difíceis de serem obtidos com formulações convencionais, mas que podem ser alcançados com a nanotecnologia. Entre esses requisitos pode-se citar a liberação controlada do ativo, que diminui o risco de reações de sensibilização cutânea, o elevado tempo de retenção do ativo



nas camadas mais superficiais da pele, bem com a manutenção da estabilidade fotoquímica deste durante a utilização do produto.

Desta forma, a presente dissertação de mestrado versa sobre o desenvolvimento tecnológico e avaliação da permeação cutânea *in vitro* de nanocápsulas contendo benzofenona-3 incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos. As nanocápsulas foram escolhidas como vetores para a administração do filtro solar, pois em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa (ALVES *et al.*, 2007) foi experimentalmente demonstrada a superioridade destas em controlar a liberação de uma substância na pele, em comparação com as nanoesferas e nanoemulsão. Como abordagem inovadora desta dissertação, encontra-se a avaliação da influência do veículo semi-sólido no qual as nanoestruturas são incorporadas sobre a permeação do ativo na pele. Assim, os métodos empregados e os resultados obtidos na presente dissertação foram organizados em forma de capítulos divididos da seguinte forma:

Objetivos;

Revisão da literatura;

Capítulo 1: Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação da estabilidade de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo benzofenona-3;

Capítulo 2: Desenvolvimento de bases semi-sólidas contendo benzofenona-3 livre e nanoencapsulada: avaliação da permeação cutânea *in vitro* do filtro solar químico;

Capítulo 3: Avaliação da fotoestabilidade e da alergenicidade da benzofenona-3 nanoencapsulada e incorporada em hidrogel;

Conclusões;

Referências bibliográficas;

Anexos.

**2 OBJETIVOS**

---



## 2.1 Objetivo Geral

Avaliar comparativamente a permeação cutânea *in vitro* da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes formulações semi-sólidas e investigar a capacidade destes carreadores na fotoestabilização do filtro solar.

## 2.2 Objetivos específicos

- Preparar suspensões de nanocápsulas contendo o filtro solar benzofenona-3, avaliar suas características físico-químicas e sua estabilidade à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 90 dias;
- Incorporar estas suspensões em diferentes bases semi-sólidas (hidrogel, creme-gel e emulsão água em silicone) e avaliar as características reológicas das mesmas;
- Avaliar a penetração cutânea da benzofenona-3 a partir das nanocápsulas incorporadas nas diferentes formulações semi-sólidas, utilizando pele abdominal de porcos fêmeas como membrana de estudo;
- Avaliar a fotoestabilidade do filtro químico associado à nanocápsulas vinculadas no hidrogel;
- Avaliar comparativamente a alergenicidade da benzofenona-3 incorporada em hidrogel na forma livre e nanoencapsulada, bem como de nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) sem filtro solar.



### ***3 REVISÃO DE LITERATURA***

---



### 3.1 Pele e radiação solar

#### 3.1.1 Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, composta por três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme (camada mais interna de tecido adiposo). Ela atua como uma barreira protetora do organismo, prevenindo a perda de água e bloqueando a entrada de agentes exógenos, além de apresentar funções sensoriais e imunológicas. A pele representa uma via atrativa e acessível para administração de substâncias, devido aos problemas associados com outras rotas de administração, como a via oral e parenteral. A via cutânea apresenta como vantagens o mínimo efeito sistêmico e a possibilidade de vetorização somente para as áreas afetadas pela patologia, quando o efeito tópico é desejado (ASBILL; MICHNIAK, 2000; FOLDVARI, 2000; GUTERRES *et al.*, 2007).

A epiderme é constituída por várias camadas de queratinócitos em diferentes estágios de diferenciação celular, além de conter melanócitos, células de Langerhans (importantes na resposta imune) e células de Merkel (envolvidas na percepção sensorial) (ASBILL; MICHNIAK, 2000; FOLDVARI, 2000). As camadas que formam a epiderme são conhecidas como basal (mais interna delas), espinhosa, granulosa e córnea (RIBEIRO, 2006).

Na camada basal é onde se encontra o maior número de células em divisão e é ela que realiza a ligação da epiderme com a derme através dos hemidesmossomas (complexos juncionais especializados). Acima da camada basal se encontra a camada espinhosa, formada por várias fileiras de células, sendo as mais profundas poliédricas e as superficiais mais achatadas, todas elas coesas entre si pelos desmossomas. A camada granulosa é a responsável pela formação da bicamada lipídica presente entre as fileiras de células corneificadas que formam a camada córnea. Esta camada previne a desidratação das camadas adjacentes da



epiderme e oferece resistência à absorção percutânea (RIBEIRO, 2006; FOLDVARI, 2000).

O estrato córneo é a camada mais externa da epiderme, sendo formado por 10-15 camadas de corneócitos envolvidos por lipídios extracelulares apresentando uma espessura que varia entre 10-20  $\mu\text{m}$ . Devido a sua elevada organização estrutural e hidrofobicidade o estrato córneo atua como a principal barreira para a penetração de substâncias aplicadas topicamente, mas também atua como um reservatório para formulações aplicadas por esta via (FERNANDEZ *et al.*, 2000; FOLDVARI, 2000).

A derme é um tecido resistente e elástico que proporciona resistência física ao corpo frente à agressões e fornece nutrientes à epiderme (RIBEIRO, 2006). A composição da derme envolve tecido conjuntivo denso composto por células, como fibroblastos, granulócitos e macrófagos; e também por macromoléculas sintetizadas pelos fibroblastos e que constituem a matriz extracelular, formada por colágeno, elastina, glicosaminoglicanos e glicoproteínas de estrutura. Também fazem parte da derme inúmeros vasos sanguíneos, linfáticos e terminações nervosas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; FOLDVARI, 2000).

### **3.1.2 Radiação solar**

A radiação solar consiste de um espectro de comprimentos de onda que vão desde o infravermelho, passando pela luz visível até a radiação ultravioleta (UV). Os comprimentos de onda da radiação infravermelha são superiores a 770 nm, da luz visível situam-se entre 400 e 770 nm e da radiação ultravioleta entre 290 e 400 nm, sendo que a parte da radiação que interessa clinicamente à fotoproteção é a compreendida entre 290 e 400 nm (WILKINSON; MOORE, 1982; GUTERRES, 2004). A radiação infravermelha é percebida sob a forma de calor, a radiação visível através das diferentes cores detectadas pelo sistema óptico e a radiação UV através de reações fotoquímicas (FLOR *et al.*, 2007). Da radiação solar que atinge a terra, 38,9 % consiste de luz visível, 54,3 % são raios infravermelhos e o restante,

---

radiação ultravioleta, desta aproximadamente 5 % é UVB e 95 % UVA (MAIER; KORTING, 2054). Da radiação UV que é absorvida pela pele podendo atingir a camada basal, 15 % corresponde ao UVB e 50 % ao UVA (RIBEIRO, 2006).

A radiação ultravioleta pode causar danos agudos ou crônicos à pele humana, os danos agudos são causados mais freqüentemente pela radiação UVB e os danos crônicos pela radiação UVA (MAIER; KORTING, 2005). A radiação UVC (< 280 nm) é considerada letal (germicida) e é filtrada pela camada de ozônio, não é efetiva na estimulação da pigmentação da pele e pode causar eritema. A radiação UVB (290-320 nm) que incide na atmosfera também é absorvida pelo ozônio, porém parte dessa radiação atinge a pele sendo nociva por ser a causadora da resposta eritematosa da pele, além do espessamento da camada mais superficial da pele, envelhecimento precoce, podendo levar ao desenvolvimento de câncer de pele. A redução na camada de ozônio tem levado a um aumento da radiação UVB na superfície da Terra, ocasionando maior incidência de queimaduras e, conseqüentemente, câncer de pele. Os raios UVA (320-400 nm) possuem uma energia muito menor que os UVB. A radiação UVA, quando comparada à UVB, possui capacidade em induzir eritema na pele humana aproximadamente mil vezes menor, porém penetra mais profundamente na derme. Seus efeitos biológicos são cumulativos (efeitos a longo prazo) interferindo nos fenômenos do fotoenvelhecimento e na gênese de certos cânceres, estes efeitos que são decorrentes da exposição freqüente e prolongada ao sol, realizada de forma inadequada (WILKINSON; MOORE, 1982; GUTERRES, 2004; FLOR *et al.*, 2007).

### 3.1.3 Efeitos da radiação solar sobre a pele

Quando a radiação UV atinge a pele, parte é refletida e dispersada, parte é absorvida pelo estrato córneo e parte é transmitida para as demais camadas da pele (RIBEIRO, 2006). A resposta cutânea à radiação solar se caracteriza fundamentalmente pelo desenvolvimento de eritema, melanogênese, aumento do número de queratinócitos e espessamento da camada córnea (VIGLIOGLIA; RUBIN, 1979). Entretanto, a exposição excessiva e prolongada à radiação solar pode levar

ao envelhecimento cutâneo e, muitas vezes, ao desenvolvimento de câncer de pele (MARTINDALE, 1999).

A radiação UVA é menos energética, porém mais penetrante, chegando até a derme, devido a isto se torna a principal responsável pelo fotoenvelhecimento. Apesar de menos penetrante, a radiação UVB também pode alcançar a derme e participar do processo de fotoenvelhecimento (RIBEIRO, 2006).

Células mutantes, passíveis de originar câncer de pele, surgem quando o DNA celular é alterado pelas radiações UVA e UVB, e não ocorre reparo do mesmo ou apoptose celular. Nesse caso as radiações UVA curta e UVB atuam como mutagênicos diretos, por serem absorvidos pelo DNA. Entretanto, a radiação UVA longa é pobremente absorvida pelo DNA, porém é absorvida por cromóforos endógenos formando espécies reativas de oxigênio que podem atacar o DNA (WILKINSON; MOORE, 1982; RIBEIRO, 2006).

O eritema solar é um processo inflamatório que se manifesta pela vermelhidão cutânea. É uma resposta normal e transitória que se deve a radiações situadas entre 254 e 320 nm e que varia de acordo com as diferentes raças e indivíduos, apresentando-se como o mais simples dentre os acidentes provocados pelo sol (VIGLIOGLIA; RUBIN, 1979; RIBEIRO, 2006).

Além do eritema e da pigmentação, a radiação solar pode causar diminuição do pH cutâneo provocando, como consequência, a desidratação, xerodermia, descamação, hiperqueratose e hipertricose da pele (VIGLIOGLIA; RUBIN, 1979). Após períodos de exposição à radiação UV pode haver aumento da perda transepidermal de água, devido à anormalidade no arranjo dos lipídeos extracelulares do estrato córneo (RIBEIRO, 2006).

---

### 3.2 Filtros solares

Os filtros solares têm sido utilizados por muitos anos para proteger a pele humana contra efeitos adversos, agudos e crônicos, da radiação solar (CHISVERT *et al.*, 2001; YESUDIAN, 2002; GONZALEZ *et al.*, 2006).

O primeiro filtro solar foi desenvolvido em 1920. Inicialmente os filtros eram empregados somente para proteger a pele contra o desenvolvimento de resposta eritematosa, mas, durante a última década, protetores solares também têm sido utilizados para proteger a pele humana do fotoenvelhecimento precoce, fotossensibilidade, câncer de pele e danos causados por radicais livres (CHISVERT *et al.*, 2001; SCHULZ *et al.*, 2002; GONZALEZ *et al.*, 2006).

Os filtros solares modernos visam proteger a pele de ambas as radiações, tanto UVA quanto UVB, com o objetivo de diminuir os efeitos maléficos das mesmas sobre a pele, portanto, um protetor solar eficiente deve prevenir não apenas uma possível queimadura, mas também reduzir o acúmulo de todas as lesões induzidas pela radiação UV, que podem aumentar o risco de alterações fatais (FLOR *et al.*, 2007). Esta classe de substâncias pode ser dividida em dois tipos, os filtros físicos, que são agentes geralmente opacos que refletem a maioria da radiação UV e os filtros químicos, que devido à presença de grupos cromóforos em sua estrutura química absorvem uma faixa específica de comprimento de onda do espectro UV. Os filtros solares são utilizados topicamente e efeitos adversos como fotossensibilidade e irritação cutânea podem ocorrer com a utilização de filtros químicos (MARTINDALE, 1999; SCHULZ *et al.*, 2002).

Os filtros físicos refletem e espalham radiação UV e visível devido a formação de um filme opaco sobre a pele, são representados por dois óxidos, ZnO e TiO<sub>2</sub>. Dependendo do tamanho da partícula eles protegem contra a radiação UV refletindo ou absorvendo energia. Um ponto negativo na utilização desses filtros é a tendência em deixar uma película branca sobre a pele, que pode ser esteticamente desagradável, diminuindo a aceitabilidade do usuário. Preparações farmacêuticas modernas utilizam as versões microparticuladas desses filtros, cujas partículas são reduzidas durante o processo de obtenção até dimensões que não absorvem e

espalhem radiação visível, mas apenas radiação UV, permitindo que os produtos não formem uma película perceptível sobre a pele, aumentando a aceitabilidade do mesmo (LAUTENSCHLAGER *et al.*, 2007; FLOR *et al.*, 2007).

Filtros químicos atuam absorvendo radiação UV e transformando-a em radiações com energias menores, como calor e radiação fluorescente, e inofensivas ao organismo humano. São representados, essencialmente, por substâncias aromáticas com grupos carboxílicos que, geralmente apresentam um grupo doador de elétrons, como uma amina ou um grupo metoxila, na posição orto ou para do anel aromático. Para ser efetivo o filtro deve ser fotoquimicamente estável quando exposto a luz solar, dissolver ou dispersar facilmente e permanentemente no veículo, e permanecer na pele após transpiração ou natação. Adicionalmente, não devem ser tóxicos ou causar irritação ou alergia de contato. Os filtros UVB são comumente utilizados há décadas, entretanto, filtros UVA ou de amplo espectro tem sido desenvolvidos recentemente, devido ao maior interesse que a radiação UVA vem despertando (LAUTENSCHLAGER *et al.*, 2007; FLOR *et al.*, 2007).

A eficácia de um filtro solar é indicada através do Fator de Proteção Solar (FPS) que expressa a capacidade de proteger a pele contra a queimadura causada pela radiação UVB. O FPS informa quantas vezes mais um indivíduo pode ficar exposto ao sol com filtro, em relação ao tempo que queimaria sem filtro. O FPS de um fotoprotetor é obtido através da razão de tempo requerido para que uma determinada irradiação produza um mínimo eritema perceptível (dose eritematosa mínima; DEM) com a pele protegida pelo filtro em relação à DEM sem a proteção. Como o FPS refere-se à radiação UVB é possível encontrar um produto com FPS baixo ou moderado que não oferece nenhuma proteção contra os raios UVA (WILKINSON; MOORE, 1982; GUTERRES, 2004).

Maior atenção vem sendo dada à radiação UVA nos últimos anos, por esta também apresentar diversos efeitos deletérios sobre o organismo humano. Em vista disso, métodos para avaliar formulações fotoprotetoras com relação ao nível de proteção contra os raios UVA vindo sendo desenvolvidos, dentre eles destaca-se a quantificação da proteção UVA através da medida do eritema provocado por aplicação de alta dose desta radiação na pele. A formação do eritema mínimo induzido pelo UVA é determinada em indivíduos expostos a quantidades

significativas de UVA sem e com o protetor solar em teste, a partir dos valores encontrados calcula-se o fator de proteção no UVA (FPS<sub>A</sub>), semelhantemente à determinação do FPS (RIBEIRO, 2006).

Formulações contendo filtros solares são aplicadas em amplas áreas do corpo e, muito freqüentemente, visto que a aplicação deve ser repetida sempre após contato com água, utilizam-se grandes quantidades de protetor solar, o que facilita a ocorrência de reações alérgicas desencadeadas pela ação dos filtros solares contidos nas formulações (YESUDIAN, 2002; GONZALEZ *et al.*, 2006).

### 3.2.1 Benzofenona-3

Os derivados de benzofenonas são cetonas aromáticas sólidas e de difícil solubilização em água, e vêm sendo utilizados por mais de 30 anos, não apenas como filtros solares em formulações de uso tópico, mas também na proteção de preparações cosméticas frente à descoloração sofrida pela exposição à luz solar (YESUDIAN, 2002; MAIER; KORTING, 2005).

A benzofenona-3 (BZ3) (2-hidroxi-4-metoxibenzofenona), também conhecida como oxibenzona, Eusolex 4360<sup>®</sup>, metanona e difenilcetona, é um derivado benzofenônico utilizado em aplicações tópicas como filtro solar químico. Efetivamente absorve luz UVB (290 a 320 nm) e também parte da luz UVA (320 a 360 nm) e pouca luz UVC (250 a 290 nm). Possui massa molar de 228,2 g/mol, ponto de fusão entre 62 e 64 °C, dose letal (DL<sub>50</sub>) (oral) menor que 5 g/kg e sua fórmula estrutural está representada na Figura 1 (MARTINDALE, 1999; YESUDIAN, 2002; FLOR *et al.*, 2007).

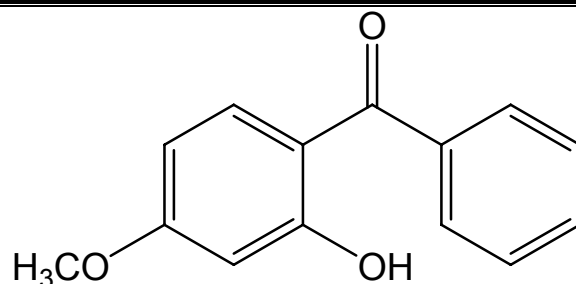


Figura 3.1. Fórmula estrutural da BZ3.

As benzofenonas são conhecidas por causar alergias de contato e fotocontato, entretanto, a ocorrência de urticária de contato causada por BZ3 é rara (YESUDIAN, 2002). Estudos têm demonstrado que a BZ3 pode penetrar através da barreira epidérmica após sua aplicação por fricção na superfície do corpo e, posteriormente, ser detectada na urina. Devido a isto, a extensão da área de superfície corporal em que a BZ3 é aplicada, bem como a quantidade e o número de aplicações de formulações contendo este filtro torna-se importante na determinação da severidade de possíveis reações alérgicas (YESUDIAN, 2002; GONZALEZ *et al.*, 2006). Estudos têm demonstrado que 0,5 % da quantidade total de BZ3 aplicada topicamente sobre a pele é detectada na urina de voluntários humanos após 48 horas da aplicação (GONZALEZ *et al.*, 2002). Em experimentos com ratos, a BZ3 foi detectada em diferentes órgãos após sua aplicação por via tópica, no fígado, rim, baço, coração, músculo estriado e testículos (OKEREKE *et al.*, 1995). O mesmo grupo de pesquisa (2006) detectou a presença de BZ3 na urina de voluntários que utilizaram preparações tópicas contendo o filtro a 4 % durante cinco dias, sendo que as quantidades encontradas foram em média 3,7 % da quantidade total aplicada. A BZ3 foi detectada na urina até cinco dias após a última aplicação, sua acumulação provavelmente se deve a suas características lipofílicas.

Gupta e colaboradores (1999) avaliaram a absorção percutânea da BZ3 e do metoxicinamato de octila (MCO) e observaram que as quantidades de BZ3 que penetraram nas camadas mais profundas da pele foram superiores que as quantidades de MCO e que o oposto aconteceu no estrato córneo, maiores quantidades de MCO permaneceram retidas na camada mais superficial da pele quando comparadas as quantidades de BZ3, a maior retenção no estrato córneo do MCO se deve, provavelmente, ao seu superior coeficiente de partição octanol/água, 5,65, quando comparado ao coeficiente de partição octanol/água da BZ3, 2,63,

demonstrando a maior lipofilicidade do MCO e indicando que o estrato córneo estaria exercendo um efeito barreira para a permeação do MCO.

### 3.2.2 Fotoestabilidade de filtros solares químicos

Para garantir uma constante eficácia durante o período de exposição, os filtros químicos UV utilizados não podem ser alterados quando irradiados pela luz solar. A fotoestabilidade de um filtro solar é a manutenção da capacidade fotoprotetora após a absorção da radiação UV, sendo que os filtros químicos apresentam maior instabilidade quando comparados aos filtros físicos em virtude de seu mecanismo de ação envolver absorção da radiação UV, onde a molécula é convertida de um estado fundamental para um estado excitado. A molécula excitada retorna ao estado fundamental, dissipando a energia absorvida por diversas vias como: na forma de calor, luz, fluorescência ou transferindo essa energia para moléculas vizinhas. A fotoestabilidade dos filtros UV está estritamente ligada a sua capacidade de liberar a energia absorvida para o ambiente sem sofrer alterações estruturais. Caso a molécula excitada não consiga dissipar a energia, pode sofrer rearranjo, fragmentar ou gerar radicais livres (PERUGINI *et al.*, 2002; MAIER *et al.*, 2005).

A diminuição da capacidade absorptiva em decorrência da instabilidade dos filtros UV químicos resulta no aumento da quantidade de radiação que incide direto sobre a pele e, conseqüentemente, aumenta o poder deletério dos raios solares sobre o organismo humano (SERPONE *et al.*, 2002; GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006; HUONG *et al.*, 2007).

Dentre os filtros solares químicos a classe das benzofenonas, é considerada fotoquimicamente mais estável quando exposta à radiação UV e comparada aos demais filtros químicos. Aproximadamente 50 % da fotoproteção conferida pela BZ3 é perdida após uma irradiação de 260 min, o que inclui este filtro dentro de um restrito grupo de agentes orgânicos fotoestáveis. No entanto, em um estudo a estabilidade das benzofenonas foi questionada em razão da provável oxidação da



BZ3 na presença de luz UV (MAIER *et al.*, 2001). Desta forma estudos são necessários para avaliar o perfil fotoquímico das benzofenonas.

### 3.3 Nanopartículas

Carreadores coloidais de fármacos, incluindo nanoemulsões, nanoesferas, nanocápsulas, lipossomas e complexos lipídicos, apresentam-se como veículos interessantes para administração intravenosa de fármacos lipofílicos, bem como para administração via oral e cutânea, possibilitando a otimização da velocidade de cedência e do regime de dosagem das substâncias. As nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, possuem vantagens em relação aos lipossomas devido às suas potencialidades terapêuticas, à maior estabilidade *in vivo* e durante o armazenamento (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; WISSING; MÜLLER, 2003).

Estes sistemas nanométricos apresentam elevada área superficial, sendo considerados vetores para a administração de substâncias lipofílicas, possibilitando uma liberação homogênea e, muitas vezes, controlada de fármacos, aumentando assim a resposta terapêutica no sítio de ação por tempo prolongado. A vetorização em órgãos, tecidos ou células específicos também apresenta como vantagem a diminuição de efeitos adversos apresentados sistemicamente pelo fármaco vetorizado (GUTERRES *et al.*, 2007).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetros entre 10 e 1000 nm. Dependendo do processo de preparação das nanopartículas podem-se obter nanocápsulas ou nanoesferas que diferem entre si segundo sua composição e organização estrutural (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). A utilização de materiais poliméricos para a encapsulação de fármacos ou ativos cosméticos é uma alternativa interessante para mascarar as propriedades físico-químicas intrínsecas da substância, melhorar sua interação com membranas e facilitar sua absorção ou penetração cutânea. Dentre os polímeros utilizados a poli( $\epsilon$ -caprolactona) se destaca devido sua

biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas, pois é um polímero semi-cristalino que apresenta degradação mais lenta quando comparado aos polímeros amorfos (GUTERRES *et al.*, 2007).

As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Entretanto, as nanoesferas não apresentam óleo em sua composição e são formadas por um núcleo sólido formado por uma rede polimérica sendo caracterizadas por possuírem uma estrutura matricial, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (WEISS, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Existem vários métodos para preparação de nanopartículas descritos na literatura, dentre os quais se destaca o método de deposição do polímero pré-formado proposto por Fessi e colaboradores (1989), no qual o polímero biodegradável é dissolvido em um solvente orgânico juntamente com o componente oleoso, o tensoativo lipofílico e o fármaco ou ativo a encapsular. Esta fase oleosa é injetada, sob agitação moderada, sobre a fase aquosa, a qual é composta de água e o tensoativo hidrofílico. Esta mistura origina, de forma espontânea, as nanocápsulas, com diâmetros médios situados entre 200 e 500 nm. A vantagem de utilização deste método é a obtenção espontânea, simples, eficiente e reprodutível de pequenas partículas com elevada capacidade de encapsulação de fármacos (WEISS, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES *et al.*, 2007). A obtenção de partículas com diferentes diâmetros é dependente de vários fatores, tais como: concentração do polímero e fármaco, quantidade de tensoativo, concentração de óleo na fase orgânica e velocidade de difusão da fase orgânica na aquosa (COUVREUR *et al.*, 2002).

Algumas características físico-químicas são fundamentais para a estabilidade dos sistemas, como o tamanho de partícula. Este é um parâmetro importante utilizado no controle de qualidade, pois a estabilidade física das dispersões depende do tamanho da partícula e de sua distribuição (MÜLLER-GOYMANN, 2004). A tendência à sedimentação de uma suspensão de nanocápsulas a longo-prazo, assim como estudos de estabilidade podem ser monitorados através da determinação do tamanho médio de partícula e da sua distribuição. Este parâmetro é determinado utilizando-se a técnica de espalhamento de luz dinâmico, que mede o

movimento browniano das partículas em suspensão e o correlaciona com o seu tamanho (MAGENHEIM; BENITA, 1991). Por sua vez, o potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. É um parâmetro importante para avaliar a estabilidade física das suspensões, a efetividade de mecanismos de revestimento de superfície ou adsorção de fármacos na superfície das nanopartículas. Valores elevados, em módulo, de potencial zeta indicam suspensões de nanocápsulas mais estáveis pois a repulsão entre as partículas previne a agregação. Este parâmetro é determinado utilizando-se técnicas de eletroforese (COUVRER *et al.*, 2002; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES *et al.*, 2007).

O pH também é uma característica físico-química importante a ser avaliada, pois alterações de seus valores podem estar associados à degradação do polímero ou de outros componentes pertencentes à formulação, sendo sua determinação também útil no monitoramento da estabilidade de suspensões coloidais poliméricas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; GUTERRES *et al.*, 2007).

Quanto aos mecanismos de encapsulação, o fármaco ou ativo pode estar encapsulado, disperso, dissolvido ou adsorvido nas nanopartículas (CRUZ *et al.*, 2006). A determinação da concentração total de ativo associado às nanopartículas é fundamental, para tanto se utiliza uma técnica que permite a separação do ativo livre do associado. A técnica mais comumente utilizada é a ultrafiltração-centrifugação, na qual o ativo livre é determinado no ultrafiltrado, enquanto o ativo total é medido após completa dissolução das nanopartículas em um solvente apropriado. O conteúdo de ativo no interior das nanocápsulas é determinado em função da diferença entre o total de ativo contido na suspensão e a quantidade de ativo livre na suspensão (WEISS, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

---

### 3.4 Nanopartículas e a pele

Os sistemas carreadores nanoestruturados têm sido extensivamente estudados para administração oral e parenteral, podendo também ser utilizados para liberação de vários fármacos através da pele (JALÓN *et al.*, 2001). Estes sistemas modulam a difusão transepidérmica, podendo alterar a farmacocinética e biodistribuição através da pele (CECV, 2004).

Estes sistemas possuem características vantajosas que fazem deles promissores veículos para aplicações cosméticas, dentre as quais se destacam a capacidade de proteção a compostos lábeis contra degradação química, a possibilidade de controlar a liberação dos componentes ativos, a atuação como agentes oclusivos, permitindo um aumento no conteúdo de água na pele, e a potencial ação como bloqueadores das radiações UV, atuando como filtros físicos, podendo ser combinados a filtros químicos melhorando a fotoproteção (WISSING; MÜLLER, 2003). Nanocarreadores apresentam tamanho reduzido possibilitando um aumento do contato de moléculas ativas com o estrato córneo, além de facilitar sua formulação em produtos dermatológicos e propiciar confortável aplicação cutânea (ALVES *et al.*, 2007; GUTERRES *et al.*, 2007).

Os mecanismos de permeação de nanopartículas poliméricas preparadas com poli( $\epsilon$ -caprolactona)-*b*-poli(etilenoglicol) contendo minoxidil e o efeito do tamanho das nanopartículas sobre a taxa de permeação do fármaco foram avaliados por Shim e colaboradores (2004). Foram preparadas nanopartículas com diâmetros médios de 40 e 130 nm, que foram avaliadas através de célula de difusão de Franz utilizando-se como membrana de estudo a pele de “porcos da Índia” com e sem pêlos. Os resultados sugeriram que, para as membranas com pêlos, as partículas de menor tamanho facilitaram amplamente a permeação do minoxidil para o compartimento receptor, aumentando 1,5 vezes a quantidade permeada até a epiderme e 1,7 vezes a quantidade no fluido receptor, quando comparadas às partículas maiores. No entanto, para as membranas sem pêlos, a permeação do fármaco não foi dependente do tamanho de partícula, sugerindo que a liberação do

minoxidil a partir das nanopartículas pode acontecer, principalmente, nos folículos pilosos.

Luengo e colaboradores (2006) avaliaram a penetração cutânea do ácido flufenâmico a partir de nanopartículas de ácido poli(lático-co-glicólico) incorporadas em hidrogéis de Natrosol<sup>®</sup> (hidroxi-etil-celulose). A penetração cutânea do fármaco foi analisada através do modelo de Saarbrücken, neste modelo a pele atua como um compartimento receptor, e a permeação do mesmo através de células de difusão de Franz. Os autores utilizaram microscopia de força atômica para avaliar a integridade das nanopartículas incorporadas ao hidrogel e concluíram que o hidrogel de Natrosol<sup>®</sup> não modificou a forma e a distribuição do tamanho das partículas, confirmando a presença das mesmas no hidrogel. Os ensaios de penetração não apresentaram diferenças significativas na quantidade de ácido flufenâmico acumulado no estrato córneo, em todos os tempos de incubação, quando se comparou o fármaco encapsulado e livre. Nos experimentos de permeação observou-se diferença na quantidade de fármaco nas camadas mais internas da pele. Para os menores tempos de incubação (< 12 horas) não houve diferença significativa apesar da acumulação de fármaco ser ligeiramente menor para o encapsulado quando comparado ao livre. Após longa incubação (> 12 horas), o transporte do fármaco foi aumentado para o ácido flufenâmico nanoencapsulado quando comparado ao livre.

Alves e colaboradores (2007) avaliaram a penetração cutânea, através de célula de difusão de Franz, do anti-inflamatório não-esteróide nimesulida incorporado em diferentes sistemas coloidais, nanoesferas, nanocápsulas e nanoemulsões, contidos em hidrogéis, com o objetivo de estudar a influência da composição e do tipo de carreador na penetração cutânea do fármaco modelo. Os hidrogéis contendo nanocarreadores apresentaram liberação do fármaco nas camadas viáveis da pele. Os carreadores contendo o polímero poli( $\epsilon$ -caprolactona), nanocápsulas e nanoesferas, apresentaram retenção do fármaco no estrato córneo, o que não foi observado com a nanoemulsão (polímero ausente), onde o fármaco foi encontrado somente na derme, demonstrando a afinidade do polímero pela camada mais externa da epiderme. A concentração de nimesulida nas camadas mais

profundas da pele foi significativamente maior para as nanocápsulas, quando comparada às formulações de nanoesferas e nanoemulsão.

Nanopartículas estão sendo propostas como veículos tópicos, especialmente para bloqueadores UV, com o propósito de prolongar o tempo de resistência dos filtros solares no estrato córneo (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004; JIMÉNEZ *et al.*, 2004).

Alvarez-Román e colaboradores (2001) desenvolveram um estudo objetivando preparar nanocápsulas contendo metoxicinamato de octila (MCO) e avaliar o perfil de liberação das mesmas incorporadas em um gel, bem como sua habilidade em proteger a pele de porco contra a radiação UVB. Os perfis de liberação da formulação contendo nanocápsulas de MCO e da formulação contendo MCO não encapsulado foram semelhantes, em ambos os casos os perfis de liberação foram moderados. Este fenômeno pode ser explicado pela alta hidrofobicidade e cristalinidade do polímero utilizado [poli( $\epsilon$ -caprolactona)] e pela alta lipofilicidade do ativo, que contribui para a diminuição da sua difusão para o meio receptor. A baixa difusão apresentada sugere que o MCO encontra-se encapsulado e não adsorvido na superfície externa das nanocápsulas. No que diz respeito à eficiência de proteção contra o eritema induzido por radiação UV, a formulação contendo nanocápsulas de MCO apresentou uma eficácia de proteção significativamente maior quando comparada ao gel contendo MCO livre. O aumento na eficácia indica que o filtro solar aderiu à pele formando um filme protetor. Os resultados demonstram que nanopartículas podem ser utilizadas com o objetivo de aumentar a inibição da indução de eritema por radiação UV.

Em outro estudo desenvolvido por Alvarez-Román e colaboradores (2004) avaliou-se a retenção do MCO no estrato córneo de pele suína através da técnica de *tape stripping in vitro*. A quantidade de filtro solar químico retida no estrato córneo foi 3,4 vezes maior quando vinculado a nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) do que na forma livre. Após 6 horas de experimento o filtro solar não foi detectado no compartimento receptor. Neste mesmo estudo avaliou-se, através de microscopia confocal, a distribuição de uma sonda fluorescente nanoencapsulada e livre. Observou-se uma melhora na distribuição da sonda quando liberada a partir das

nanopartículas, porém os autores afirmam que as imagens não possibilitam definir se a sonda, melhor distribuída, é originalmente nanoencapsulada ou livre.

Variando a natureza química do polímero usado para formular nanopartículas poliméricas, diferentes propriedades físico-químicas e funcionais podem ser obtidas (GUTERRES *et al.*, 2007). Em vista disto Luppi e colaboradores (2003) estudaram a permeação, através de célula de difusão de Franz, da BZ3 nanoencapsulada, utilizando como polímero o álcool polivinílico ligado a diferentes ácidos graxos com dois graus de substituição (40 e 80 %), visando otimizar uma formulação que limite a permeação do ativo através da pele até a circulação sistêmica. A natureza dos substituintes e o grau de substituição influenciaram no tamanho de partícula e na habilidade de interação do ativo com a pele. As nanopartículas obtidas com baixo grau de substituição apresentaram melhor localização do ativo na epiderme, entretanto às obtidas com alto grau de substituição preveniram a absorção percutânea da BZ3.

Em estudo realizado por Jiménez e colaboradores (2004) verificou-se a influência da encapsulação sobre a absorção percutânea *in vitro* do MCO. A penetração do MCO a partir de emulsões O/A e A/O com este filtro solar encapsulado e livre foi comparada. Para avaliação *in vitro* da absorção cutânea foi empregado o modelo de difusão de células de Franz utilizando como membrana a pele de porco. As formulações contendo nanocápsulas de MCO apresentaram menor penetração no estrato córneo quando comparadas às mesmas emulsões contendo o ativo livre, evidenciando a importância do efeito de encapsulação sobre a penetração cutânea deste filtro solar. De acordo com os autores, a formação de um filme protetor sobre a superfície da pele contribuiu para a penetração diferenciada.

O método de obtenção de nanocápsulas e sua penetração cutânea foram avaliados em 2005 por Olvera-Martínez e colaboradores. Neste estudo os autores obtiveram nanocápsulas de MCO através do método de emulsificação-difusão com diâmetros entre 400 e 615 nm e nanoemulsão com aproximadamente 160 nm. Após caracterização dos nanocarreadores a penetração cutânea do filtro solar foi avaliada, a partir das nanocápsulas, nanoemulsão e emulsão convencional, através da técnica de *tape stripping in vivo*, determinando a quantidade de MCO retida no estrato córneo. A incorporação do MCO em nanoemulsão aumentou sua penetração

quando comparada ao ativo incorporado em nanocápsulas ou na emulsão convencional. Os autores atribuem o aumento da penetração do ativo incorporado na nanoemulsão ao tamanho das gotículas e a flexibilidade das mesmas quando comparadas às nanocápsulas, que apresentaram diâmetro médio maior além de serem estruturas mais rígidas.

Para avaliar o local de liberação do MCO a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em um gel de hidroxietilcelulose e sua penetração cutânea, Weiss-Angeli (2007), desenvolveu um novo sistema de extração do ativo retirado na pele nos experimentos de penetração cutânea utilizando célula de difusão de Franz. Neste trabalho dois protocolos foram empregados, no primeiro o MCO foi extraído das diferentes camadas da pele em estudo utilizando um solvente de extração convencional, acetonitrila, possibilitando o doseamento do ativo livre e encapsulado, pois este solvente dissolve as nanocápsulas. O segundo protocolo empregado utilizou como solvente de extração o miristato de isopropila, que não solubiliza o polímero, mas solubiliza o filtro solar livre, e posterior ultracentrifugação, separando as nanocápsulas presentes no sistema e possibilitando o doseamento do ativo livre. Os resultados demonstram não haver diferença entre as quantidades doseadas através dos dois protocolos nas camadas mais profundas da pele. Entretanto, na superfície cutânea houve uma diferença significativa entre a quantidade de filtro livre e total, indicando haver liberação do ativo a partir das nanocápsulas acumuladas nesta camada da pele. Os autores concluem que esse efeito pode ser explicado pelo reduzido tamanho das nanocápsulas e pela hidrofobicidade do polímero, poli( $\epsilon$ -caprolactona), ambos fatores que contribuem para o acúmulo de nanocápsulas na superfície da pele.

Além da incorporação de filtros solares em sistemas nanoestruturados, outras estratégias estão sendo estudadas no intuito de diminuir a absorção percutânea de filtros solares químicos, incluindo a avaliação de diferentes tipos de veículos, aumento da viscosidade das formulações ou complexação com ciclodextrinas. Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos com uma superfície externa hidrofílica e um núcleo não-polar que podem abrigar componentes hidrofóbicos em sua cavidade formando complexos de inclusão não-covalentes. A inclusão da molécula hospedeira pela ciclodextrina pode modificar a liberação de substâncias aplicadas topicamente,



tanto melhorando (através do aumento da solubilidade aparente) quanto diminuindo (pela formação de complexos de inclusão altamente estáveis) sua absorção percutânea. Em vista disto, Simeoni e colaboradores (2006) estudaram a influência da complexação da BZ3 com hidropropil- $\alpha$ -ciclodextrina (HP- $\alpha$ -CD) e sulfobutileter- $\beta$ -ciclodextrina (SBE- $\beta$ -CD) na penetração cutânea do filtro químico. Os estudos de penetração foram conduzidos em células de difusão de Franz. Os resultados demonstram que a complexação da BZ3 em HP- $\alpha$ -CD não alterou seu perfil de penetração, porém a complexação com SBE- $\beta$ -CD reduziu significativamente a penetração percutânea (quantidade detectada tanto no estrato córneo, quanto epiderme e derme), minimizando assim o contato do filtro solar com a pele e os riscos toxicológicos associados a ele. Segundo os autores este aspecto é particularmente importante em preparações comerciais contendo BZ3, visto que estas contém elevadas concentrações do filtro solar e são aplicadas repetidas vezes em grandes extensões de pele permanecendo por um longo período de tempo.

### 3.5 Caracterização reológica de formulações farmacêuticas

A reologia, do grego *rheos* que significa escoamento, *logos* que significa conhecimento, consiste no estudo do escoamento ou deformação do material em estudo, quando submetido a uma tensão (LACHMAN, 2001). No desenvolvimento de produtos farmacêuticos, cosméticos ou de higiene pessoal, a otimização das características reológicas é de fundamental importância, pois estão associadas a aspectos de absorção e biodisponibilidade de um fármaco, bem como à escolha correta dos equipamentos a serem usados na sua produção (NETZ; ORTEGA, 2002).

A viscosidade de uma substância é a expressão da resistência ao fluxo quando submetida a uma tensão; quanto maior a viscosidade, maior a resistência (MARTIN *et al.*, 1993). As deformações sofridas por um determinado material podem ser classificadas como elástica, se o material readquire a sua forma inicial após a força ser retirada, ou plástica, se a deformação permanecer (LACHMAN, 2001).

Para determinar o comportamento reológico de um material alguns conceitos devem ser conhecidos. A taxa de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ) indica a taxa com que um material escoar quando uma determinada força é aplicada e a tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) indica a pressão aplicada sobre o material (MARTIN *et al.*, 1993).

Segundo a lei de Newton, para os líquidos ideais a tensão de cisalhamento é diretamente proporcional à velocidade de cisalhamento. A viscosidade é independente da velocidade de deformação, o que só é verdadeiro para líquidos ideais como os designados fluidos newtonianos (ALMEIDA; BAHIA, 2003). Portanto, o fluxo newtoniano caracteriza-se por apresentar viscosidade constante, independente da taxa de cisalhamento. Fluidos não-newtonianos são aqueles em que não se verifica uma relação linear direta entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento aplicadas, como é o caso da maioria dos sistemas com interesse no setor farmacêutico e cosmético, tais como suspensões, suspensões coloidais, emulsões, pomadas e géis (LACHMAN, 2001).

Diferentes tipos de comportamentos não-newtonianos podem ser reconhecidos. Dentre eles destacam-se os fluxos plástico, pseudoplástico e dilatante. Materiais que apresentam-se sólidos quando em repouso, devido à associação interpartícula e que apresentam escoamento a partir de uma tensão mínima apresentam comportamento plástico. A força exercida sobre o sistema deve ultrapassar as forças internas (interparticulares) e destruir a estrutura do material, essa força (tensão de cisalhamento) denomina-se valor ou tensão de cedência, acima deste valor o material se comporta como um líquido newtoniano. O valor de cedência apresenta grande importância em formulações em que se pretende manter a forma original até atingir a tensão suficiente para que as mesmas possam ser espalhadas sobre a pele (ALMEIDA; BAHIA, 2003; AULTON, 2005).

O comportamento pseudoplástico apresenta diminuição da resistência do material ao escoamento com o aumento da taxa de cisalhamento. Este comportamento obedece o modelo de Ostwald (lei das potências) com  $n$  (índice de fluxo) inferior a 1 (ALMEIDA; BAHIA, 2003). O índice de fluxo indica o grau de pseudoplasticidade de uma formulação semi-sólida, quanto mais próximo de 0 mais pseudoplástica.

---

O fluxo dilatante é oposto à pseudoplasticidade, no qual a viscosidade cresce com o aumento da velocidade de cisalhamento. A equação que representa este modelo é semelhante a que descreve o comportamento pseudoplástico, porém o valor de  $n$  é maior que 1 e aumenta com o aumento da dilatância. Esse tipo de comportamento é menos comum que o fluxo plástico ou pseudoplástico, mas pode ocorrer com dispersões com alta concentração de partículas pequenas (> 50 %) (LACHMAN, 2001; AULTON, 2005).

Modelos matemáticos são propostos para determinar os diferentes tipos de comportamentos não-newtonianos (Tabela 1.1). O comportamento plástico perfeito é representado pelo modelo de Bingham (Eq. 1, Tabela 1.1) plotando-se os valores de tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento. No modelo de Casson (Eq. 2, Tabela 1.1) a raiz quadrada da tensão de cisalhamento é representada em função da raiz quadrada da taxa de cisalhamento. O modelo de Ostwald (Eq. 3, Tabela 1.1) representa o comportamento pseudoplástico, para valores de  $n < 1$ , e é obtido plotando-se o log da tensão de cisalhamento *versus* log da taxa de cisalhamento. Através deste modelo, que segue a lei das potências, obtêm-se valores de consistência e índice de escoamento. O modelo de Herschel-Bulkley (Eq. 4, Tabela 1.1) apresenta um valor de cedência, mas após este valor, segue a lei da potência (ALMEIDA; BAHIA, 2003; KIM *et al.*, 2003; ALVES, 2006).

Os hidrogéis representam uma classe de formulações semi-sólidas bastante utilizada, tanto em produtos dermatológicos quanto cosméticos, e de forma geral, apresentam comportamento não-newtoniano com características pseudoplásticas. As curvas de fluxo destes géis, normalmente, são ajustadas pelos modelos de Ostwald e Herschel-Bulkley (KIM *et al.*, 2003). Emulsões e suspensões são sistemas complexos, compostos por tensoativos, polímeros e outros excipientes, apresentando propriedades reológicas de acordo com o sistema reticular formado entre os constituintes (ALVES, 2006).

Tabela 1.1. Modelos de fluxo em função das curvas de tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento, equações e parâmetros (KIM *et al.*, 2003; ALVES, 2006).

Modelo	Equação		Parâmetros
<b>Bingham</b>	$\tau = \tau_o + \eta\dot{\gamma}$ (1)	$\tau_o$	Tensão de cisalhamento limite (Pa)
		$\eta$	Viscosidade (Pa.s)
<b>Casson</b>	$\tau^{0.5} = \tau_o^{0.5} + \eta^{0.5}\dot{\gamma}^{0.5}$ (2)	$\tau_o$	Tensão de cisalhamento limite (Pa)
		$\eta$	Viscosidade (Pa.s)
<b>Ostwald</b>	$\tau = K\dot{\gamma}^n$ (3)	$K$	Consistência (Pa.s <sup>n</sup> )
		$n$	Índice da lei da potência
<b>Herschel-Bulkley</b>	$\tau = \tau_o + K\dot{\gamma}^n$ (4)	$\tau_o$	Tensão de cisalhamento limite (Pa)
		$K$	Consistência (Pa.s <sup>n</sup> )
		$n$	Índice da lei da potência

Gaspar e Maia Campos (2003) estudaram a influência do comportamento reológico de formulações contendo filtros solares. Os autores afirmam que o FPS depende do comportamento reológico da formulação em que os filtros estão incorporados, pois formulações solares com fluxo pseudoplástico produzem um filme protetor que recobre a superfície cutânea e distribui o filtro uniformemente com a espessura ideal para propiciar um aumento no FPS.

O comportamento reológico de formulações semi-sólidas contendo nanocápsulas poliméricas foi estudado por Alves e colaboradores (2005). Neste estudo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões foram incorporados em hidrogéis de Carbopol 940<sup>®</sup>. Inicialmente os géis se enquadraram ao modelo do Ostwald com  $n < 1$ , caracterizando comportamento não-newtoniano pseudoplástico. Os mesmos sistemas semi-sólidos contendo nanoestruturas, também apresentaram comportamento não-newtoniano pseudoplástico, indicando que a adição de nanocarreadores à hidrogéis não implicou em mudanças das características reológicas dos mesmos.



**4 DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E  
AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE SUSPENSÕES DE  
NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS CONTENDO BENZOFENONA-3**

---

---



## **4.1 INTRODUÇÃO**

---





A resposta cutânea primária à radiação solar UV apresenta-se como eritema, melanogênese, aumento do número de queratinócitos e espessamento da camada córnea. Entretanto, a exposição excessiva e prolongada à radiação solar leva ao envelhecimento cutâneo e, muitas vezes, ao desenvolvimento de câncer de pele (VIGLIOGLIA; RUBIN, 1979; MARTINDALE, 1999). Os filtros solares foram desenvolvidos para proteger a pele humana contra estes efeitos adversos, agudos e crônicos, provocados pela radiação solar (CHISVERT *et al.*, 2001; YESUDIAN, 2002; GONZALEZ *et al.*, 2006).

A eficácia de um filtro solar requer que ele esteja aderido à pele como um filme protetor, apresentando uma alta afinidade pelo estrato córneo. Portanto, o meio ideal em que o ativo é incorporado necessita fornecer não somente meios para a sua solubilização, mas também manter o contato entre o ativo e a pele (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2001; JIMÉNEZ *et al.*, 2004).

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores que apresentam diâmetros inferiores a 1  $\mu\text{m}$  e diferem entre si, de acordo com a composição e organização estrutural. As nanopartículas podem consistir de uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido, não apresentando óleo na sua composição (nanoesferas), ou de um invólucro polimérico, contendo um sistema reservatório oleoso (nanocápsulas), podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica (SOPPIMATH *et al.*, 2001; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; ÁLVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004).

Estes sistemas coloidais apresentam vantagens em relação à proteção que oferecem às substâncias neles associados, e à capacidade de provocarem uma liberação controlada das mesmas em sítios específicos. Estas características estão condicionadas à natureza do polímero utilizado, ao tipo de partícula e ao campo de aplicação a que se destinam (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998). Recentemente, as nanopartículas poliméricas têm sido propostas como carreadores para filtros solares, com o objetivo de prolongar o tempo de resistência desses filtros no estrato córneo (ÁLVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2001; JIMÉNEZ *et al.*, 2004). Em trabalho prévio (ALVES *et al.*, 2007) foi demonstrado que as nanocápsulas poliméricas propiciam elevada penetração da nimesulida, um antiinflamatório não

esteróide, em camadas mais profundas da pele quando comparadas com outros carreadores (nanoesferas e nanoemulsão).

A primeira etapa no desenvolvimento tecnológico de novas formulações é a sua caracterização físico-química e o estudo de sua estabilidade. Portanto, neste capítulo serão apresentados os resultados acerca do desenvolvimento de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo concentrações crescentes de benzofenona-3 (BZ3), um filtro solar químico considerado de amplo espectro, bem como o estudo da estabilidade das formulações armazenadas à temperatura ambiente, visando-se obter um novo sistema nanoestruturado para aplicação da BZ3 que aumente seu tempo de retenção na superfície cutânea.

## ***4.2 MATERIAIS E MÉTODOS***

---



## 4.2.1 Materiais

### 4.2.1.1 Matérias-primas

- Benzofenona-3 (BZ3) – Delaware;
- Poli( $\epsilon$ -caprolactona)  $\overline{M}_w = 65000$  – Sigma;
- Monoestearato de sorbitano (Span 60) – Sigma;
- Polissorbato 80 (Tween 80) – Henrifarma;
- Triglicerídios de ácidos cáprico/caprílico (Miglyol 810<sup>®</sup>) – Brasquin.

### 4.2.1.2 Aparelhos e equipamentos

- Balança analítica – APX-200, Denver Instrument;
- Centrífuga Eppendorff – Centrifuge 5417R;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência – Perkin Elmer Series 200;
- Evaporador rotatório – Büchi;
- Viscosímetro rotacional – LVDV-II+ Pro, Brookfield;
- Potenciômetro – Ultra-Basic, Denver Instrument;
- Zetasizer<sup>®</sup> – nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern;
- Turbiscan<sup>®</sup> – modelo *LAB*, Formulaction;
- Microscópio eletrônico de transmissão – JEM-1200, Exll.

### 4.2.1.3 Solventes e outros materiais

- Acetonitrila grau CLAE – Merck;

- Metanol grau CLAE – Merck;
- Acetona – Nuclear;
- Ácido acético – Synth;
- Água MilliQ;
- Membrana 0,45  $\mu\text{m}$  – Millipore;
- Coluna (LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18, 250 mm, 4,0 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) – Merck;
- Perclorato de tetrabutílamônio – Sigma Aldrich;
- Filtros Microcon<sup>®</sup> – Millipore;
- *Grids* de cobre com revestimento de formvar/carbono – Electron Microscopy Sciences.

## 4.2.2 Métodos

### 4.2.2.1 Teste de inchamento do polímero

Filmes de poli( $\epsilon$ -caprolactona) foram obtidos através de dissolução completa do polímero em clorofórmio e subsequente evaporação total do solvente orgânico. Filmes com cerca de 250 mg foram imersos em uma solução de BZ3 em triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico em concentração equivalente a suspensão de nanocápsulas de BZ3, que contém 5 mg/mL do filtro solar numa concentração final de 150 mg/mL de BZ3 em Miglyol 810<sup>®</sup>, e armazenados em frasco âmbar. Os filmes foram afastados do contato com óleo, secos suavemente com papel absorvente e pesados em balança analítica nos tempos 0, 2, 4, 6, 14, 21, 28, 35 e 42 dias. O teste foi conduzido em triplicata.

#### 4.2.2.2 Preparação das nanocápsulas

As suspensões de nanocápsulas contendo BZ3 foram preparadas segundo método de deposição interfacial de polímero pré-formado (FESSI *et al.*, 1989) empregando-se a composição geral descrita na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Composição das suspensões de nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) contendo BZ3.

Fase orgânica	Fase aquosa
Triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico.....3,30 mL	Polissorbato 80.....766 mg
Monoestearato de sorbitano.....766 mg	Água ultrapura.....533 mL
Poli( $\epsilon$ -caprolactona).....1000 mg	
Acetona.....267 mL	
BZ3 ..... x	

Os componentes da fase orgânica foram mantidos sob agitação magnética em banho-maria à temperatura de 40 °C até completa dissolução de todos os componentes. A fase orgânica homogênea foi injetada, com auxílio de um funil, na fase aquosa, também mantida sob agitação magnética, contendo o tensoativo de elevado EHL (polissorbato 80).

Após, a suspensão foi mantida sob agitação moderada durante 10 minutos e então, concentrada a um volume final de 100 mL, em evaporador rotatório para eliminação do solvente orgânico e ajuste da concentração final de BZ3. As suspensões de nanocápsulas foram obtidas variando-se a concentração final de BZ3, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 e 25 mg/mL, para posterior estudo de estabilidade. Foram preparadas, para fins comparativos, suspensões de nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) sem conter o filtro solar.



---

#### 4.2.2.3 Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas

Cada suspensão de nanocápsulas foi caracterizada quanto ao seu teor de ativo, taxa de associação, diâmetro médio de partícula, polidispersão, potencial zeta, pH, viscosidade e morfologia.

##### 4.2.2.3.1 Doseamento da BZ3 nas suspensões coloidais (taxa de recuperação) (GUTERRES *et al.*, 1995)

As suspensões coloidais foram tratadas com acetonitrila ocasionando a dissolução parcial do polímero e a liberação e dissolução do ativo contido no interior das nanocápsulas. Para os estudos de estabilidade uma alíquota de suspensão foi coletada sem agitação prévia, possibilitando o doseamento do ativo associado às nanocápsulas e não do ativo eventualmente sedimentado ou aderido à superfície interna do frasco de armazenamento.

O doseamento da BZ3 foi realizado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo metodologia descrita por Sarveiya e colaboradores (2004), modificada.

As análises foram realizadas em cromatógrafo Perkin Elmer Series 200, utilizando-se detector ultravioleta visível 289 nm, coluna LiChrospher 100 RP-18 (5µm, 250 x 4 mm), pré-coluna do mesmo material (5 µm) e fase móvel isocrática de metanol e água em uma proporção 95:5 (v/v), com pH aparente igual a 4,0, fluxo de 1,0 mL por minuto, e, como agente de pareamento iônico, perclorato de tetrabutylamônio (4 mg/%).

O método foi validado segundo Resolução nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003) e Internacional Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use (ICH,

1996) em termos de: especificidade, linearidade, precisão, limite de quantificação e exatidão (Anexo 1).

#### **4.2.2.3.2 Determinação das taxas de associação (GUTERRES *et al.*, 1995)**

A concentração de ativo associado às nanocápsulas foi determinada por CLAE, levando em consideração a diferença entre a concentração total de BZ3 na formulação e a concentração presente na fase aquosa da suspensão. A concentração total foi determinada segundo item 4.2.2.3.1. A determinação do ativo livre, presente na fase aquosa da suspensão, foi realizada através de ultrafiltração-centrifugação das suspensões com a utilização de membranas Microcon<sup>®</sup>, MC Millipore 10,000 Da, durante 5 minutos a 5000 rpm repetitivamente, até obter-se 40 µL de ultrafiltrado, no qual a BZ3 não associada (livre) foi quantificada, empregando-se metodologia analítica descrita anteriormente.

#### **4.2.2.3.3 Determinação de pH**

A determinação de pH foi realizada em potenciômetro calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0, diretamente nas suspensões coloidais, após a preparação. Os resultados representam a média de três determinações.

#### **4.2.2.3.4 Determinação do diâmetro de partícula e polidispersão**

As determinações do diâmetro e da polidispersão das nanopartículas em suspensão foram realizadas através de espalhamento de luz dinâmico. As amostras foram diluídas 500 vezes (v:v) em água ultrapura filtrada através de membrana 0,45

$\mu\text{m}$ , à temperatura ambiente e os resultados determinados através da média de três repetições.

#### **4.2.2.3.5 Potencial zeta**

O potencial zeta das suspensões de nanocápsulas foi obtido através de eletroforese. Essa determinação foi realizada após diluição de 500 vezes (v:v) das suspensões de nanocápsulas em solução de NaCl 10 mM previamente filtrada através de membrana 0,45  $\mu\text{m}$ . Os resultados foram obtidos através da média de três determinações.

#### **4.2.2.3.6 Avaliação da morfologia das nanocápsulas**

A morfologia das nanocápsulas poliméricas foi avaliada através de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para tanto as suspensões foram diluídas em água na proporção de 1:10 (suspensão:água ultrapura) e depositadas sobre *grids* de cobre (400 *mesh*) com revestimento de formvar/carbono (Electron Microscopy Sciences), sendo utilizado como contraste negativo o acetato de uranila em solução aquosa (2 %). As amostras foram mantidas em dessecador à vácuo até a realização da microscopia em microscópio eletrônico de transmissão operando a 80 Kv, no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

#### **4.2.2.3.7 Viscosidade**

A viscosidade da suspensão de 5 mg/mL, bem como do núcleo oleoso das nanocápsulas, foi determinada em viscosímetro rotacional Brookfield provido de

*spidle* ULA. Para a determinação a amostra foi acondicionada em dispositivo Brookfield acoplado a banho de água termostatizado circulante a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.2.3.8 Análises de retroespalhamento de luz**

As suspensões de nanocápsulas, nas concentrações de 1, 5, 10, 15 e 25 mg/mL de filtro químico, foram preparadas segundo método de deposição interfacial do polímero pré-formado e imediatamente analisadas através de Turbiscan *LAB*<sup>®</sup> por 6 horas à temperatura de  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com varreduras a cada 2 min, possibilitando a identificação e o estudo dos fenômenos de instabilidade das mesmas. Para cada análise utilizou-se 20 mL das suspensões de nanocápsulas contendo diferentes concentrações de BZ3.

#### **4.2.2.4 Estabilidade frente ao armazenamento**

As suspensões de nanocápsulas contendo BZ3 em concentrações crescentes (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 15 mg/mL) foram avaliadas quanto a sua estabilidade à temperatura ambiente. O teor, o pH, o diâmetro médio de partícula e o potencial zeta destas suspensões, armazenadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foram determinados nos tempos 0, 30, 60, 90 dias. Todas as suspensões foram obtidas e analisadas em triplicata.

#### **4.2.2.5 Descarte de resíduos**

Todos os resíduos químicos gerados durante a preparação e caracterização de nanocápsulas, foram segregados, acondicionados e identificados segundo

normas do Plano de Gerenciamento de Resíduos implementado pela Resolução COSAT 01/07, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## ***4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO***

---



#### 4.3.1 Teste de inchamento do polímero

Com o objetivo de verificar se o polímero selecionado para a formulação das nanocápsulas, a poli( $\epsilon$ -caprolactona), seria afetado pela mistura BZ3 e Miglyol 810<sup>®</sup>, constituinte do núcleo das vesículas, no sentido de haver seu inchamento ou dissolução pelos componentes do núcleo oleoso, foi conduzido o teste de inchamento do polímero. A Figura 4.1 mostra as variações de massa do polímero após diferentes tempos de contato com a mistura BZ3-Miglyol 810<sup>®</sup>.

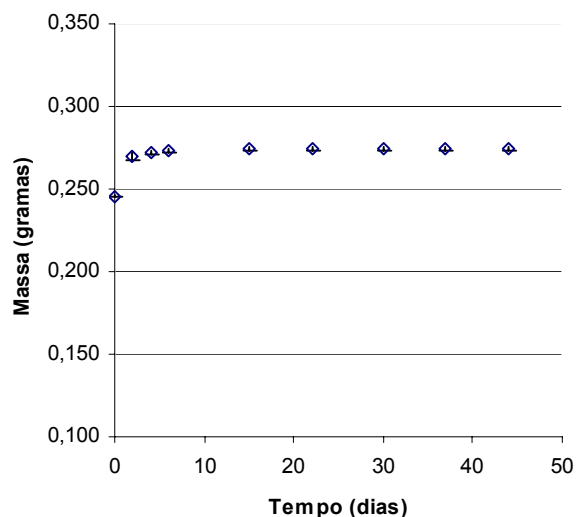


Figura 4.1. Massa de poli( $\epsilon$ -caprolactona) após imersão na mistura BZ3-Miglyol 810<sup>®</sup> (150 mg/mL) por 45 dias (n=3).

A determinação do inchamento do polímero pelos componentes do núcleo oleoso foi proposta pela primeira vez por Guterres e colaboradores (2000) como metodologia para avaliação da adequabilidade das matérias-primas (polímeros e óleos) para a formulação de nanocápsulas. Neste estudo pioneiro o inchamento de filmes de poli( $\epsilon$ -caprolactona) e poli(ácido láctico) frente aos óleos benzoato de benzila e Miglyol 810<sup>®</sup>, constituintes do núcleo das nanocápsulas foi avaliado. Após 48 horas foi observada a total dissolução dos polímeros em benzoato de benzila, entretanto, para o Miglyol 810<sup>®</sup> as massas dos polímeros permaneceram constantes por 13 dias indicando a não dissolução dos polímeros. Esse resultado indicou que o benzoato de benzila dissolve os polímeros em estudo formando dispersões coloidais



micelares, não sendo, portanto, indicado para a formulação estas nanocápsulas. No presente trabalho, empregando-se a mesma metodologia deste estudo (GUTERRES *et al.*, 2000), foi verificado que a massa de filmes de poli( $\epsilon$ -caprolactona) em Miglyol<sup>®</sup> e BZ3 não variou. Nos primeiros dois dias de estudo as massas dos filmes poliméricos sofreram um incremento discreto (9,85 %) (Figura 4.1), porém não significativo, pois foi devido a quantidade residual de óleo aderido ao filme que não pode ser completamente retirado com papel absorvente. A partir da segunda pesagem as massas dos filmes de polímero permaneceram constantes, indicando que o núcleo oleoso utilizado nas nanocápsulas em estudo não dissolve o polímero, o que possibilita em hipótese, a formação de uma parede polimérica em torno do núcleo oleoso das nanocápsulas.

#### **4.3.2 Caracterização das suspensões de nanocápsulas de BZ3 após preparação**

A Tabela 4.2 relaciona as características de diâmetro médio, polidispersão, potencial zeta, pH, teor e taxa de associação das formulações de nanocápsulas preparadas com concentrações crescentes de BZ3.

Todas as suspensões apresentaram diâmetros médios próximos a 250 nm e índices de polidispersão inferiores a 0,30, indicando a homogeneidade na distribuição de tamanho de partícula das amostras. O aumento da concentração de BZ3 não ocasionou alteração do diâmetro das nanocápsulas.

O potencial zeta para todas as amostras foi de aproximadamente -10 mV, valor este considerado adequado para manter o sistema sem agregação e precipitação das nanoestruturas, devido a repulsão eletrostática que as mesmas apresentam, resultante da densidade de carga de superfície. Assim como para o diâmetro de partículas, o aumento da concentração de BZ3 não causou alteração do potencial zeta.

Tabela 4.2. Características físico-químicas das suspensões de nanocápsulas após preparação (n=3).

BZ3 (mg/mL)	Ø (nm) ± DP	PDI ± DP	Potencial $\xi$ (mV) ± DP	pH ± DP	Teor (mg/mL) ± DP	Taxa de associação (%)
0	246 ± 4	0,18 ± 0,02	-8,13 ± 0,50	6,51 ± 0,1	-	-
1	225 ± 9	0,16 ± 0,03	-9,05 ± 0,81	6,3 ± 0,1	1,02 ± 0,03	99,87
2	254 ± 15	0,20 ± 0,01	-9,30 ± 0,73	6,4 ± 0,2	1,99 ± 0,03	99,98
3	245 ± 5	0,19 ± 0,01	-10,47 ± 0,86	6,6 ± 0,1	3,12 ± 0,09	99,96
4	238 ± 14	0,14 ± 0,01	-9,64 ± 1,07	6,4 ± 0,1	3,93 ± 0,08	99,96
5	247 ± 4	0,15 ± 0,01	-9,50 ± 1,02	6,6 ± 0,1	4,85 ± 0,04	99,97
6	252 ± 11	0,21 ± 0,01	-9,07 ± 0,43	6,5 ± 0,1	5,83 ± 0,10	99,97
7	263 ± 31	0,22 ± 0,02	-7,99 ± 0,59	6,6 ± 0,1	6,80 ± 0,17	99,99
8	264 ± 40	0,17 ± 0,02	-8,21 ± 1,35	6,6 ± 0,1	7,88 ± 0,13	99,97
9	252 ± 23	0,19 ± 0,03	-8,28 ± 0,51	6,6 ± 0,2	8,65 ± 0,07	99,98
10	283 ± 8	0,23 ± 0,02	-10,29 ± 1,20	6,7 ± 0,1	9,75 ± 0,08	99,96
15	235	0,185	-9,83	6,7	14,50	99,99

Ø: diâmetro médio de partícula (nm); potencial  $\xi$ : potencial zeta (mV).

O pH em torno de 6,5, para todas as formulações, é condizente com o método de preparação e matérias-primas utilizados no estudo. A literatura relata que suspensões de nanocápsulas preparadas pelo método de nanoprecipitação e com poliésteres apresentam valores de pH em torno de 6,0 (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Os valores de pH levemente ácidos apresentados pelas suspensões coloidais são adequados para o uso tópico destas formulações, posteriormente incorporadas em sistemas semi-sólidos (ALVES *et al.*, 2007).

Os teores experimentais obtidos foram próximos as concentrações teóricas para todas as formulações. As taxas de associação foram superiores a 99 % para todas as nanocápsulas, independentemente da concentração de BZ3. As taxas de associação indicam elevada capacidade de encapsulação da BZ3 pelos sistemas, provavelmente devido a alta solubilidade da BZ3 em Miglyol 810<sup>®</sup> (210 mg/mL), determinada experimentalmente. Em trabalhos prévios desenvolvidos pelo grupo de pesquisa a capacidade máxima de encapsulação de compostos lipofílicos em nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona), mantendo-se diâmetros médios nanométricos, foi inferior a obtida para a BZ3 (5 mg/mL), como, por exemplo, os observados para a

melatonina (1 mg/mL) e para a nimesulida (1,5 mg/mL) (ALVES *et al.*, 2007; SCHAFFAZICK *et al.*, 2007).

Nanocápsulas brancas, sem BZ3 no núcleo oleoso, também foram preparadas e caracterizadas. O diâmetro médio obtido foi de  $246 \pm 4$  nm com polidispersão inferior a 0,20, o potencial zeta foi igual a  $-8,13 \pm 0,50$  mV e o pH das foi de  $6,51 \pm 0,09$ . Estes resultados indicam que a presença de BZ3 no nanossistema polimérico em estudo não modifica as características físico-químicas analisadas.

O reograma apresentado pelo Miglyol 810<sup>®</sup>, óleo utilizado no núcleo oleoso demonstrou o seu comportamento newtoniano. Este comportamento é característico de soluções, pois os valores de viscosidade se mantêm constantes com o aumento da taxa de cisalhamento e os valores de tensão e taxa de cisalhamento apresentam-se diretamente proporcionais (Figura 4.2-a). Comportamento similar foi demonstrado pela mistura de BZ3-Miglyol 810<sup>®</sup> na concentração de 150 mg/mL, equivalente à concentração presente na suspensão de nanocápsulas contendo 5 mg/mL de BZ3 (Figura 4.2-b). Entretanto, a adição da BZ3 ao Miglyol 810<sup>®</sup> aumentou a viscosidade do sistema de 27 cP para 38 cP, fato explicado pelas interações intermoleculares entre a BZ3 dissolvida e o Miglyol 810<sup>®</sup>.

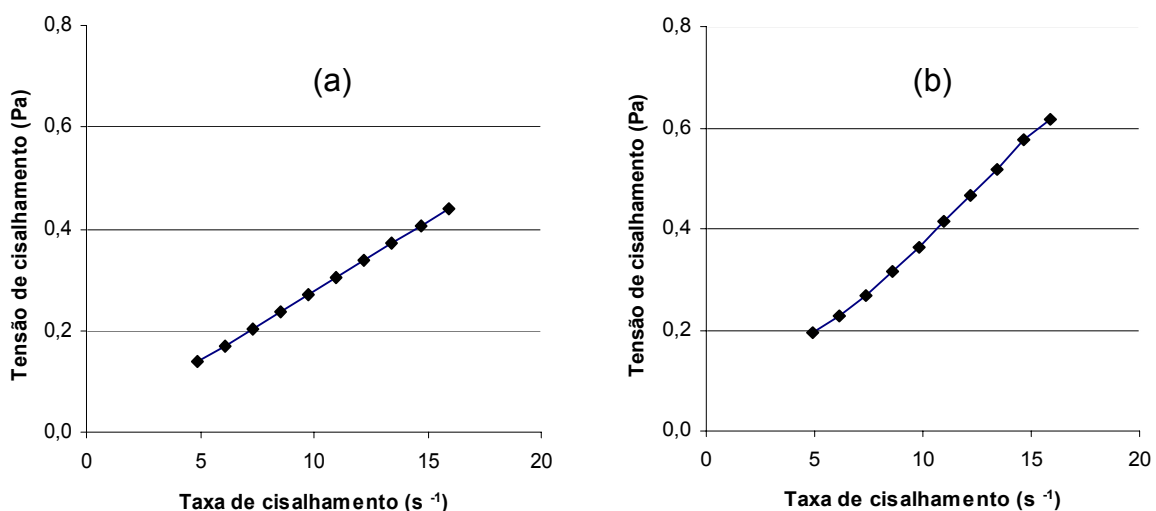


Figura 4.2. Reogramas referentes ao Miglyol 810<sup>®</sup> (a) e à mistura BZ3-Miglyol 810<sup>®</sup> (150 mg/mL) (b).

A suspensão de nanocápsulas contendo 5 mg/mL de BZ3 apresentou comportamento reológico newtoniano (Figura 4.3), semelhantemente ao óleo isolado e a mistura. Sistemas coloidais clássicos normalmente apresentam comportamento não-newtoniano por não serem fluídos simples (AULTON, 2006), porém no caso em estudo as suspensões de nanocápsulas poliméricas apresentam-se altamente diluídas (em relação massa/volume), isto é, com baixa fase interna, além de estáveis, o que justifica seu comportamento newtoniano (CASTAING *et al.*, 1999; MÜLLER-GOYMANN, 2004) e comprova a elevada organização desses sistemas. Por se tratar de um comportamento newtoniano os valores de viscosidade mantiveram-se constantes e foram de 1,33 cP. No caso de suspensões coloidais poliméricas muito diluídas, a mudança de comportamento reológico, de newtoniano para não-newtoniano, pode indicar desestabilização do sistema por agregação de partículas.

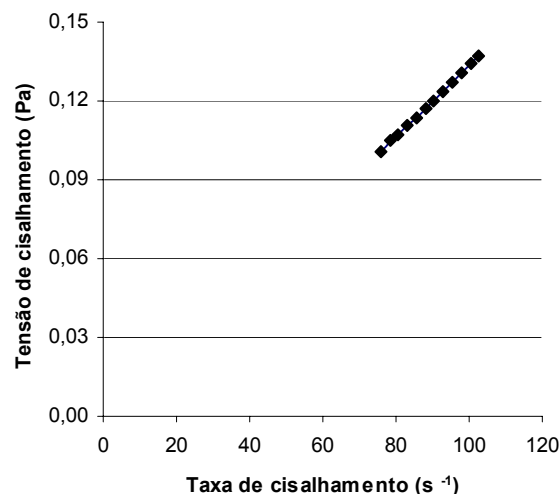


Figura 4.3. Reograma da suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo BZ3 (5 mg/mL).

#### 4.3.3 Morfologia das nanocápsulas (MET)

Nas fotomicrografias obtidas a partir das suspensões de nanocápsulas contendo 1 e 5 mg/mL de BZ3 observa-se a presença de estruturas esféricas com diâmetro médio de partícula em torno de 220 nm (Figura 4.4), similares entre si, indicando baixa polidispersão do sistema. Os diâmetros obtidos através da técnica

de espalhamento de luz dinâmico foram ligeiramente superiores, devido à técnica empregada, visto que nesta última foi determinado o raio hidrodinâmico da partícula. Em trabalho desenvolvido por Guinebretière e colaboradores em 2002, nanocápsulas poliméricas tiveram sua morfologia esférica confirmada através de microscopia eletrônica de transmissão, a técnica também foi utilizada para determinar o tamanho médio das partículas.

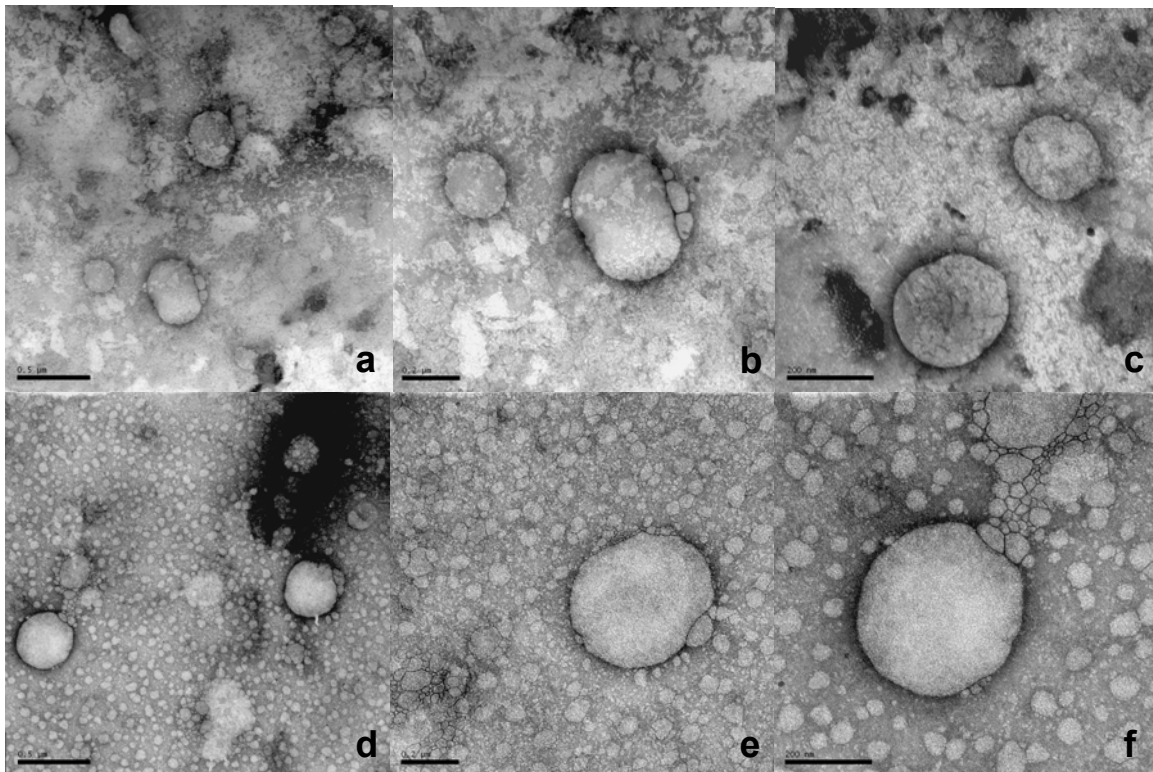


Figura 4.4. Fotomicrografias obtidas por MET, das suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo diferentes concentrações de BZ3 (a: 1 mg/mL, 50.000 X; b: 1 mg/mL, 100.000 X; c: 1 mg/mL, 150.000 X; d: 5 mg/mL, 50.000 X; e: 5 mg/mL, 100.000 X; f: 5 mg/mL, 150.000 X).

#### 4.3.4 Estabilidade das suspensões de nanocápsulas nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias

Após a caracterização físico-química das suspensões contendo nanocápsulas de BZ3 os estudos de estabilidade à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, nos tempos 30, 60 e 90 dias, foram conduzidos, a fim de averiguar o comportamento desses sistemas.

Os diâmetros médios de partículas apresentaram-se em torno de 250 nm, não havendo aumento com o passar do tempo de estocagem (Figura 4.5). Este resultado indica que todas as formulações testadas não apresentam tendência a floculação ou agregação, mesmo com o aumento da concentração de BZ3 empregada. O tamanho de partícula é um importante parâmetro a ser avaliado para controlar o processo de obtenção e, particularmente, assegurar a qualidade da formulação, porque a estabilidade física de dispersões vesiculares depende do tamanho de partícula e da distribuição do tamanho (MÜLLER-GOYMANN, 2004).

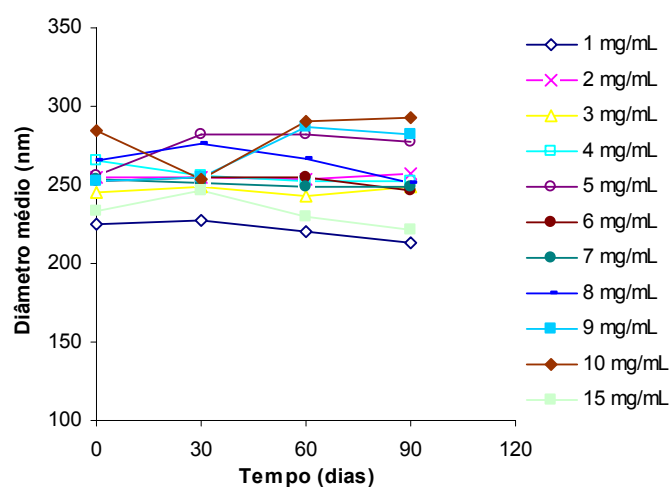


Figura 4.5. Diâmetros médios das nanocápsulas contendo concentrações crescentes de BZ3 nos tempos de 0, 30, 60 e 90 dias de estocagem ao abrigo da luz e à temperatura ambiente (n=3).

Assim como observado para os diâmetros médios, a polidispersão não variou com o tempo de estocagem, permanecendo entre 0,15 e 0,25 (Figura 4.6), indicando que não houve agregação das nanocápsulas com o passar do tempo, corroborando a estabilidade dos sistemas, evidenciada pela medida de tamanho de partícula em função do tempo de armazenamento (Figura 4.5).

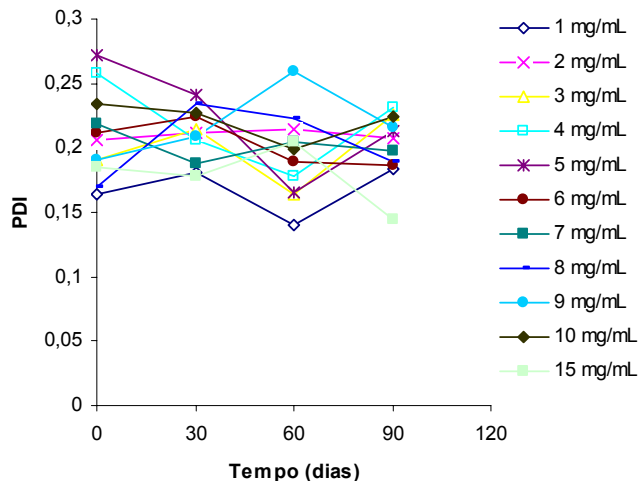


Figura 4.6. Polidispersão das partículas nos tempos de 0, 30, 60 e 90 dias de estocagem ao abrigo da luz e a temperatura ambiente (n=3).

Para determinação da recuperação de BZ3 contida nas formulações, as alíquotas foram coletadas sem prévia agitação do frasco de armazenagem, possibilitando a detecção indireta, da presença concomitante de nanocristais precipitados (GUTERRES, 1995), através da observação da eventual diminuição da quantidade de ativo recuperada com o passar do tempo, especialmente no caso das amostras contendo elevada concentração de ativo. Estes nanocristais não são quantificados no ultrafiltrado obtido na técnica de ultracentrifugação-filtração, provavelmente por serem maiores que o ponto de corte da membrana utilizada (10,000 Da).

Os valores de recuperação de BZ3 contida nas suspensões com menores concentrações de ativo (1 a 8 mg/mL) mantiveram-se constantes nos 90 dias de análise, já as suspensões com maiores concentrações (9, 10 e 15 mg/mL) apresentaram um decréscimo nos valores de recuperação da BZ3 nos primeiros 30 dias de estocagem (Figura 4.7), indicando que parte da BZ3 incorporada na suspensão não está nanoencapsulada, mas sim formando nanocristais que tendem a sedimentar com o tempo, diminuindo assim a concentração de filtro solar nas suspensões. A maior concentração estudada (15 mg/mL) apresentou um decréscimo na recuperação, para valores abaixo de 90 %, após 30 dias de análise.

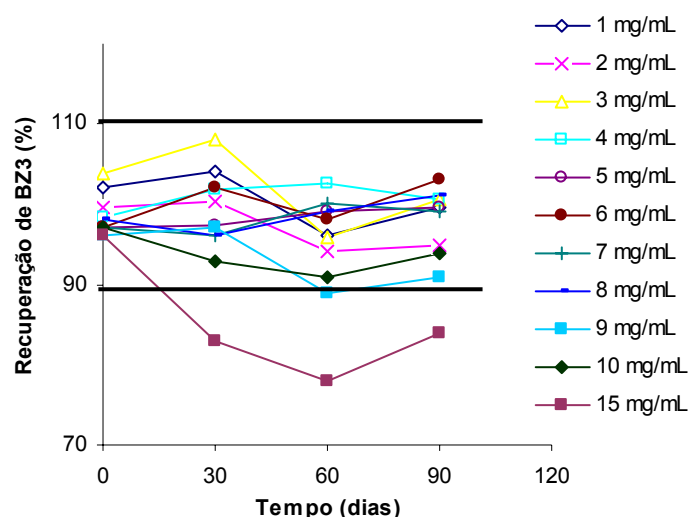


Figura 4.7. Recuperação de BZ3 nos tempos de 0, 30, 60 e 90 dias de estocagem ao abrigo da luz e a temperatura ambiente (n=3).

Os valores de potencial zeta mantiveram-se constantes durante os 90 dias para a maioria das formulações, corroborando os resultados de diâmetro e PDI, que demonstram estabilidade dos sistemas, visto que os mesmos mantêm-se sem agregação devido aos elevados valores (entre  $-7$  e  $-13$  mV), em módulo, possibilitando a repulsão das nanocápsulas (Figura 4.8).

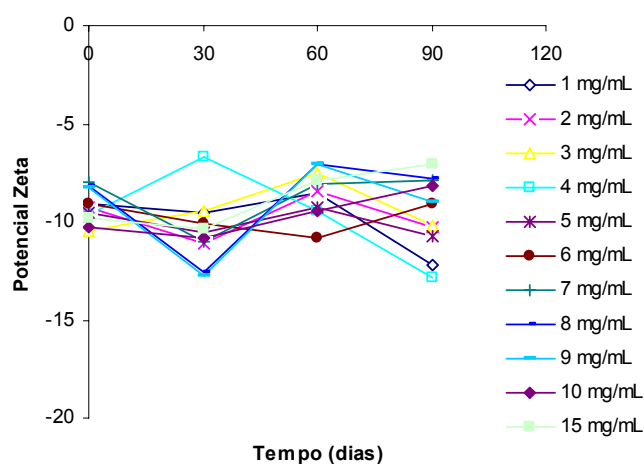


Figura 4.8. Potencial zeta nos tempos de 0, 30, 60 e 90 dias de estocagem ao abrigo da luz e à temperatura ambiente (n=3).

Os valores de pH diminuíram a partir do primeiro mês de estocagem para todas as suspensões (Figura 4.9), indicando possivelmente a parcial hidrólise do polímero presente na interface partícula/água, originando ácido capróico (CALVO *et al.*, 1996), diminuindo assim o pH do meio. Com o passar do tempo de análise os



valores de pH estabilizam, pode-se observar também que o aumento da concentração de BZ3 nos sistemas não modifica os valores de pH.

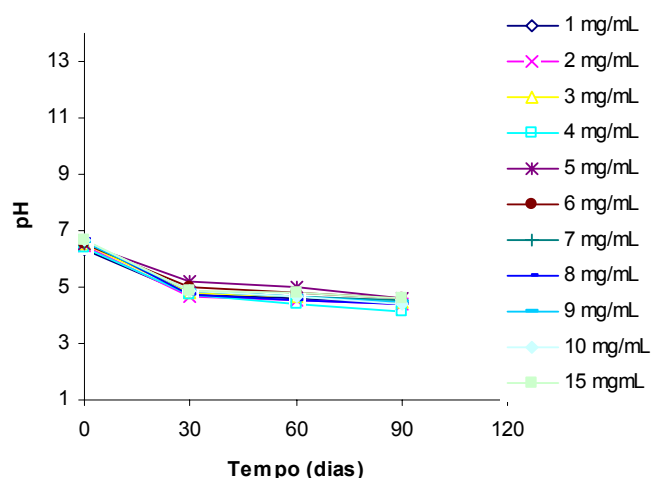


Figura 4.9. Valores de pH das suspensões de nanocápsulas com concentrações crescentes de BZ3, nos tempos de 0, 30, 60 e 90 dias de estocagem ao abrigo da luz e a temperatura ambiente (n=3).

#### 4.3.5 Análises de retroespalhamento de luz

O Turbiscan *LAB*<sup>®</sup> avalia a transmissão e o *backscattering*, utilizando uma fonte de infravermelho próximo (850 nm) e detectores que medem a quantidade de luz que é refletida (a 45° do feixe incidente) ou transmitida (a 180° do feixe incidente) através da amostra em análise. O princípio da análise é baseado na variação da fração volumétrica da gotícula/partícula, resultando na variação da transmissão e do *backscattering* (Figura 4.10). Através desta análise é possível identificar fenômenos de migração de gotícula/partícula como cremagem e sedimentação, e fenômenos de alteração no diâmetro como floculação e coalescência. A maior vantagem na utilização do Turbiscan *LAB*<sup>®</sup> é a detecção dos fenômenos de instabilidade em emulsões, suspensões ou espumas não diluídas, muito antes que estes fenômenos sejam detectados por observação visual do analista, especialmente no caso de sistemas opacos e concentrados (MENGUAL *et al.*, 1999; LEMARCHAND *et al.*, 2003).

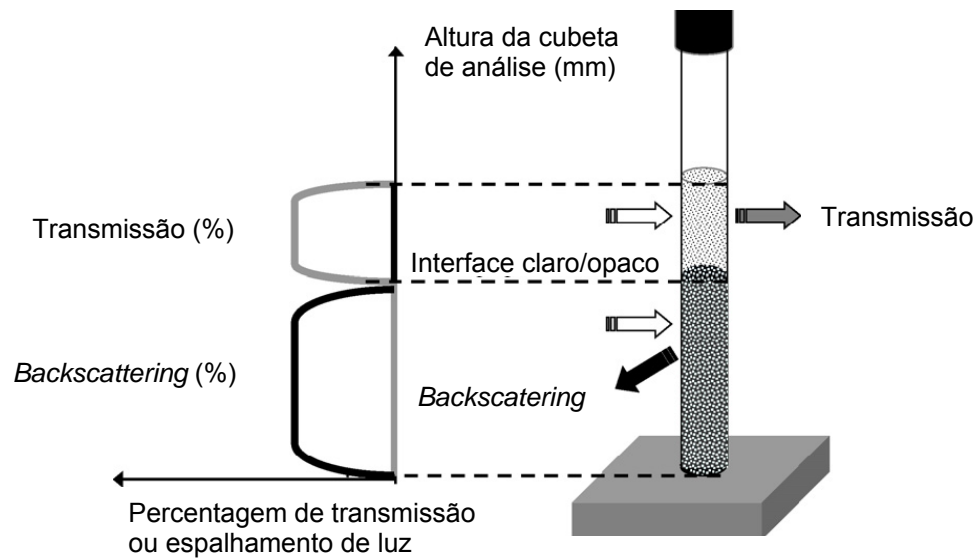


Figura 4.10. Representação esquemática do princípio de funcionamento do Turbiscan (Adaptado de DAOUD-MAHAMMED *et al.*, 2007).

A identificação dos fenômenos de instabilidade que uma determinada amostra apresenta possibilita prever o comportamento da mesma frente a testes de estabilidade convencionais (bancada e estufa), bem como determinar mudanças eficazes em sua constituição quali-quantitativa para torná-la estável. Essa análise também é útil no controle de qualidade de formulações, a partir da obtenção de formulações estáveis e conhecimento dos seus perfis, pois estes podem ser utilizados como padrões para as demais formulações em estudo.

A Figura 4.11 apresenta os gráficos referentes à variação de *backscattering* das suspensões de nanocápsulas contendo BZ3 em concentrações crescentes (1, 5, 10, 15 e 25 mg/mL). Segundo o manual do equipamento, podem ser analisados os gráficos de variação de *backscattering* caso os valores de variação de transmissão sejam inferiores à 0,2 %, visto isso, somente os gráficos de variação de *backscattering* são apresentados, pois todos os valores da variação da transmissão foram inferiores a 0,2 %.

Em cada gráfico, a parte esquerda refere-se à base da cubeta de análise e a direita ao topo da mesma. Os fenômenos de instabilidade, como cremagem, floculação, sedimentação e coalescência, são demonstrados na base, no topo, ou no

centro da cubeta, observando-se o aumento ou a diminuição na variação de *backscattering*.

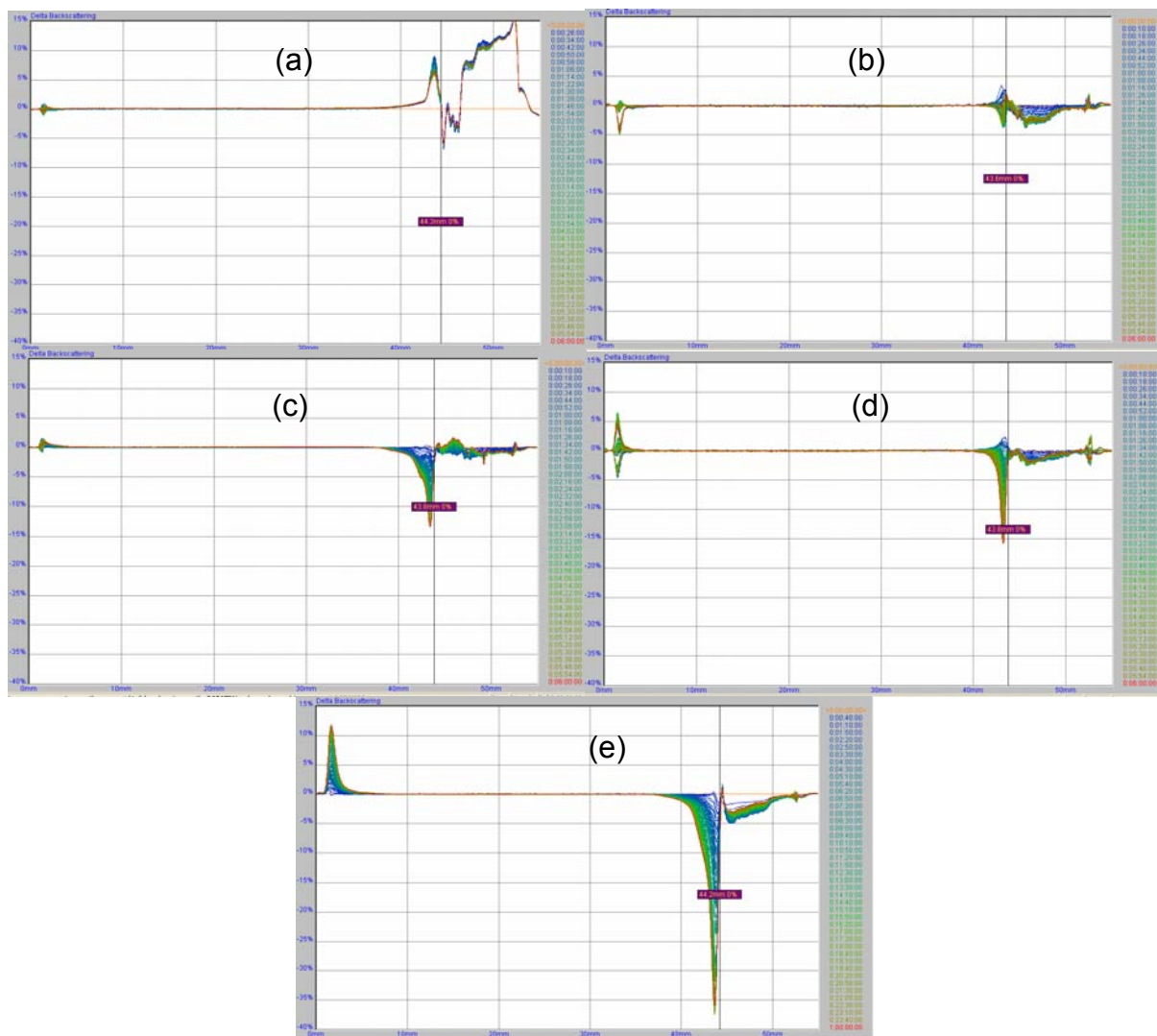


Figura 4.11. Gráficos de variação do *backscattering* das suspensões de nanocápsulas contendo BZ3 (a: 1 mg/mL; b: 5 mg/mL; c: 10 mg/mL; d: 15 mg/mL; e: 25 mg/mL).

Aumentos na variação do *backscattering* na base das cubetas de análise e diminuições do *backscattering*, no topo das cubetas, próximo ao menisco foram observados para as formulações contendo concentrações de 10, 15 e 25 mg/mL de BZ3 (Figuras 4.11-c; 4.11-d; 4.11-e), indicando fenômeno de migração de partículas do topo para a base das cubetas, sugerindo possível fenômeno de sedimentação, como descrito em trabalho de Mengual e colaboradores (1999). Este resultado é condizente à diminuição nos valores de recuperação de BZ3 nas formulações de 10 e 15 mg/mL analisadas por 90 dias (Tabela 4.3), indicando possível sedimentação de nanocristais contidos nas amostras. Por outro lado, as formulações de 1 e 5 mg/mL de BZ3 (Figuras 4.11-a; 4.11-b) apresentaram teor estável nos 90 dias do

estudo de estabilidade e não apresentaram sedimentação e clarificação significativos nas análises por Turbiscan *LAB*<sup>®</sup>.

Fenômenos detectados através da variação no diâmetro das partículas, como floculação ou coalescência, não foram observados nas análises por Turbiscan *LAB*<sup>®</sup>, corroborando os resultados obtidos através da análise convencional de estabilidade. Nesta última, não foram encontradas variações nos diâmetros de partícula das suspensões de nanocápsulas avaliadas nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias.

Tabela 4.3. Recuperação de BZ3 (%) nas suspensões de nanocápsulas nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias.

Concentração teórica (mg/mL)	Recuperação de BZ3 (%)			
	0 (dias)	30 (dias)	60 (dias)	90 (dias)
1	102	104	96	99
5	97	97	99	99
10	97	93	91	94
15	96	83	76	84

A formulação de 25 mg/mL apresentou fenômenos de clarificação e sedimentação mais intensos (Figura 4.11-e), visualizados pelos valores de variação do *backscattering* na base (10 %) e no topo (- 37 %) da cubeta de análise. Esta formulação apresentou-se visivelmente instável, o sedimentado foi detectado após 3 horas do preparo da suspensão. Para esta formulação, devido à sedimentação logo após a preparo, o estudo convencional de estabilidade não foi realizado.

Diante dos resultados aqui expostos, que representam o estudo da estabilidade em tempo real das suspensões de nanocápsulas contendo crescentes concentrações de BZ3 e, principalmente, dos resultados das análises de retroespalhamento de luz, a suspensão contendo 5 mg/mL de BZ3 foi selecionada para a continuidade dos estudos, por sua estabilidade.



**5 DESENVOLVIMENTO DE BASES SEMI-SÓLIDAS CONTENDO  
BENZOFENONA-3 LIVRE E NANOENCAPSULADA: AVALIAÇÃO  
DA PENETRAÇÃO CUTÂNEA IN VITRO DO FILTRO SOLAR  
QUÍMICO**

---



## **5.1 INTRODUÇÃO**

---





A eficácia de um produto aplicado topicamente depende do coeficiente de permeabilidade através do estrato córneo e das características químicas do fármaco ou ativo. Portanto, o grau de absorção de um fármaco através da estrutura cutânea é influenciada pelas características físico-químicas da molécula ou do veículo (GUTERRES *et al.*, 2007).

Os diferentes veículos semi-sólidos utilizados para a incorporação de ativos cosméticos agem de maneira diferente no que diz respeito à liberação desses ativos e, conseqüentemente, sua penetração através da pele. Sabe-se também que a incorporação de substâncias ativas em nanocápsulas também modifica o perfil de penetração dos ativos, como demonstrado em estudo desenvolvido por Jiménez e colaboradores (2004). Os autores estudaram a influência da encapsulação sobre a absorção percutânea *in vitro* do metoxicinamato de octila, comparando a penetração a partir de emulsões O/A e A/O contendo este filtro nanoencapsulado e livre. As formulações contendo o metoxicinamato de octila nanoencapsulado apresentaram menor penetração no estrato córneo quando comparadas às mesmas emulsões contendo o ativo livre, evidenciando a importância do efeito de encapsulação sobre a penetração cutânea.

No caso específico de filtros solares químicos o ativo incorporado a nanocápsulas também tem demonstrado um aumento na inibição da indução de eritema por radiação UV, como descrito por Alvarez-Román e colaboradores (2001). Neste estudo os autores avaliaram o perfil de liberação do metoxicinamato de octila incorporado a nanocápsulas e posteriormente vinculadas em um hidrogel, bem como sua capacidade em proteger a pele de porco contra a radiação. Foram verificados perfis de liberação moderados, tanto para a formulação contendo metoxicinamato de octila nanoencapsulado quanto para a formulação com o filtro químico na forma livre.

Até o presente momento, não há relatos na literatura sobre a influência dos veículos semi-sólidos, nos quais as nanocápsulas estão incorporadas, sobre a permeação cutânea de ativos. Entretanto, é razoável formular a hipótese de que os diferentes veículos podem ocasionar diferenças na permeação de compostos devido suas interações com estruturas da pele, decorrentes de sua estruturação em nível molecular e grau de lipofilia. Adicionalmente, as características reológicas de

formulações semi-sólidas, tanto hidrogéis quanto emulsões, também apresentam importância em estudos de liberação e permeação de fármacos, podendo influenciar a consistência, a espalhabilidade, a retenção no sítio de aplicação, os atributos sensoriais e a liberação de fármacos (WOOLFSON *et al.*, 2000).

Neste capítulo serão apresentados os resultados acerca do desenvolvimento e caracterização físico-química de formulações semi-sólidas contendo nanocápsulas de BZ3. A permeação cutânea do ativo, na forma livre e nanoencapsulada, também foi estudada, avaliando-se a influência de diferentes formulações semi-sólidas (hidrogel, creme-gel e emulsão água em silicone), as quais as nanocápsulas contendo BZ3 foram incorporadas, sobre a permeação cutânea do filtro solar, empregando pele abdominal de porcos fêmeas como membrana biológica.

## ***5.2 MATERIAIS E MÉTODOS***

---



## 5.2.1 Materiais

### 5.2.1.1 Matérias-primas

- Benzofenona-3 (BZ3) – Delaware;
- Poli( $\epsilon$ -caprolactona)  $\overline{M}_w = 65000$  – Sigma;
- Monoestearato de sorbitano (Span 60) – Sigma;
- Polissorbato 80 (Tween 80) – Henrifarma;
- Triglicerídios de ácidos cáprico/caprílico (Miglyol 810<sup>®</sup>) – Brasquin;
- Carbopol 940<sup>®</sup> (polímero de ácido acrílico) – BFGoodrich;
- Trietanolamina – Delaware;
- Salcare SC91<sup>®</sup> – Brasquim;
- Diazolinidil uréia – Sarfam;
- Silicone DC 5225<sup>®</sup> – Sarfam;
- Ciclometicone – Sarfam;
- Dimeticone – Sarfam;
- Cloreto de sódio – Merck;
- Fita adesiva – Scotch 3 M;
- Membrana natural – pele suína – abatedouro e frigorífico Araldi.

### 5.2.1.2 Aparelhos e equipamentos

- Balança analítica – APX-200, Denver Instrument;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência – Perkin Elmer Series 200;
- Evaporador rotatório – Büchi;
- Viscosímetro rotacional – LVDV-II+ Pro, Brookfield;
- Potenciômetro – Ultra-Basic, Denver Instrument;

- Zetasizer<sup>®</sup> – nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern;
- Medidor de espessura – Dial Thickness Cage, Mitutoyo;
- Vortex – Certomat MV, B. Braun Biotech International;
- Ultrasson – Transsonic T460, Elma;
- Turbiscan<sup>®</sup> – modelo *LAb*, Formulaction;
- Aparato vertical de célula de Franz – Fabricação própria.

### **5.2.1.3 Solventes e outros materiais**

- Acetonitrila grau CLAE – Merck;
- Metanol grau CLAE – Merck;
- Acetona – Nuclear;
- Ácido acético – Synth;
- Água MilliQ;
- Membrana 0,45  $\mu\text{m}$  – Millipore;
- Coluna (LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18, 250 mm, 4,0 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) – Merck;
- Perclorato de tetrabutílamônio – Sigma Aldrich.

## **5.2.2 Métodos**

### **5.2.2.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo BZ3**

As nanocápsulas poliméricas contendo BZ3 foram preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado. A fase orgânica homogênea, composta por 1000 mg de poli( $\epsilon$ -caprolactona), 766 mg de monoestearato de sorbitano, 3,33 mL de triglicérides de ácidos cáprico e caprílico, 500 mg de BZ3 e

270 mL de acetona foi injetada na fase aquosa composta por 766 mg de polissorbato 80 e 530 mL de água ultrapura, sob agitação. Após a formação das nanocápsulas a suspensão foi mantida sob agitação moderada durante 10 minutos e, então, a acetona e parte da água foram eliminadas em rotaevaporador para ajuste final da concentração de BZ3 (5 mg/mL) em 100 mL de suspensão.

#### **5.2.2.2 Caracterização da suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo BZ3**

As suspensões de nanocápsulas incorporadas nas formulações semi-sólidas foram caracterizadas quanto diâmetro médio de partícula, polidispersão e potencial zeta (Zetasizer<sup>®</sup> – nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern), pH (Potenciômetro – Ultra-Basic, Denver Instrument), teor e taxa de associação, através de ultrafiltração-centrifugação (CLAE – Perkin Elmer Series 200).

#### **5.2.2.3 Teste de inchamento do polímero**

Após a seleção dos silicones utilizados no preparo da emulsão água em silicone (A/S) e previamente ao desenvolvimento das mesmas procedeu-se o teste de inchamento do polímero, poli( $\epsilon$ -caprolactona), com os três silicones selecionados. Para tanto, filmes de poli( $\epsilon$ -caprolactona) foram obtidos através de dissolução completa do polímero em clorofórmio e subsequente evaporação total do solvente orgânico. Filmes com cerca de 250 mg foram imersos em dimeticone, ciclometicone e Silicone DC5225<sup>®</sup>, separadamente. Os filmes foram afastados do contato com os silicones, secos suavemente com papel absorvente e pesados em balança analítica nos tempos 0, 2, 4, 6, 14, 21, 30 e 45 dias. Os testes foram conduzidos em triplicata.



### 5.2.2.4 Preparação das bases semi-sólidas contendo nanocápsulas de BZ3

Foram preparadas três séries de formas farmacêuticas semi-sólidas, hidrogel, creme-gel e emulsão água em silicone para posterior incorporação das suspensões de nanocápsulas. Todas as formulações foram preparadas em triplicata. O hidrogel contendo as nanocápsulas de BZ3 foi designado pela abreviatura HGNCBZ3, o creme-gel por CGNCBZ3 e a emulsão água em silicone por SNCBZ3, as três formulações contendo o ativo livre foram designadas HGBZ3, CGBZ3 e SBZ3 para o hidrogel, creme-gel e emulsão água em silicone, respectivamente. As formulações semi-sólidas também foram preparadas sem conter o ativo livre ou nanoencapsulado e foram designadas HGBr, CGBr e SBr.

#### 5.2.2.4.1 Hidrogel (HGNCBZ3)

Os componentes que foram utilizados na preparação do hidrogel estão relacionados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Composição quali-quantitativa do hidrogel.

Componentes	Quantidades
Carbopol 940 <sup>®</sup>	0,25 g
Diazolinidil uréia	0,3 g
Trietanolamina 99% q.s	pH 7,0
Suspensão de nanocápsulas contendo BZ3 (5 mg/mL)	75 mL
Água ultrapura q.s.p.	100 g

O gel hidrofílico foi preparado seguindo a técnica usual, substituindo parte da água do preparo pela suspensão aquosa de nanocápsulas, dispersando o Carbopol 940<sup>®</sup> na suspensão de nanocápsulas contendo BZ3. A esta dispersão foi adicionado o conservante, diazolinidil uréia, e o restante em água para completar o peso final da formulação. Na seqüência, o produto foi neutralizado com trietanolamina até

aproximadamente pH 7,0. A concentração de BZ3 no produto final foi de 0,375 % (m/m).

#### 5.2.2.4.2 Creme-gel (CGNCBZ3)

Os componentes utilizados na preparação do creme-gel são apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Composição quali-quantitativa do creme-gel.

Componentes	Quantidades
Salcare SC91 <sup>®</sup> (Copolímeros acrilato de sódio, óleo mineral e PPG-4 trideceth-6)	1,5 g
Diazolinidil uréia	0,3 g
Suspensão de nanocápsulas contendo BZ3 (5 mg/mL)	75 mL
Água ultrapura q.s.p.	100 g

O conservante diazolinidil uréia foi solubilizado em 23 mL de água. Após, a suspensão de nanocápsulas e a solução aquosa de conservante foram adicionadas lentamente sobre o Salcare SC91<sup>®</sup> sob agitação constante até total homogeneização da formulação. A concentração de BZ3 no produto final foi de 0,375 % (PM/m).

#### 5.2.2.4.3 Emulsão água em silicone (SNCBZ3)

Os componentes utilizados na preparação da emulsão água em silicone estão listados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Composição quali-quantitativa da emulsão água em silicone.

Componentes	Quantidades
Silicone DC 5225C <sup>®</sup> (ciclopentasiloxano e dimeticone copoliol)	15 g
Dimeticone	1,5 g
Ciclometicone	7 g
Diazolidinil uréia	0,3 g
Cloreto de sódio	1 g
Suspensão de nanocápsulas contendo BZ3 (5 mg/mL)	75 mL
Água ultrapura q.s.p.	100 g

A emulsão água em silicone foi preparada com agitador de hélice. Primeiramente, o cloreto de sódio e o conservante foram solubilizados na suspensão de nanocápsulas, após, a mesma foi adicionada lentamente na fase siliconada, esta mantida sob agitação vigorosa (1300 rpm).

Para cada série estudada foram obtidas também formulações brancas, sem conter ativo ou nanocápsulas, e formulações com BZ3 livre, incorporada aos sistemas na concentração de 0,375 % (m/m).

Para o preparo das formulações contendo BZ3 livre, o ativo lipofílico foi previamente homogeneizado com polissorbato 80, posteriormente disperso na água e adicionado nas formulações semi-sólidas. A concentração de polissorbato 80 foi equivalente à encontrada nas formulações semi-sólidas contendo nanocápsulas de BZ3 (0,575 % m/m).

Todas as formulações semi-sólidas foram preparadas e caracterizadas em triplicata de lote.

---

### **5.2.2.5 Caracterização das bases semi-sólidas contendo nanocápsulas de BZ3**

As bases semi-sólidas foram caracterizadas quanto ao doseamento do ativo, diâmetro médio de partícula, pH, comportamento reológico e análise de retroespalhamento de luz. As análises foram realizadas em triplicata de lote.

#### **5.2.2.5.1 Doseamento do ativo incorporado nas bases semi-sólidas**

Previamente ao doseamento, a BZ3 foi extraída das bases semi-sólidas. Para tanto cerca de 200 mg de cada formulação semi-sólida foram colocadas em erlenmeyer com 10 mL do solvente de extração (Tabela 5.4) e mantidas sob agitação magnética em banho-maria à 37 °C por 2 horas. Após decorrido o tempo de extração, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e filtradas através de papel filtro para balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com acetonitrila. Uma segunda diluição foi realizada, onde 1 mL da solução extratora filtrada foi transferida para balão volumétrico de 5 mL, e o volume completado com acetonitrila. Em seguida as amostras foram filtradas através de membrana (0,45 µm, Millipore), e analisadas através de CLAE em cromatógrafo Perkin Elmer Series 200, utilizando-se detector ultravioleta visível 289 nm, coluna LiChrospher 100 RP-18 (5µm, 250 x 4 mm), pré-coluna do mesmo material (5 µm) e fase móvel isocrática de metanol e água em uma proporção 95:5 (v/v), com pH aparente igual à 4,0, fluxo de 1,0 mL por minuto, e, como agente de pareamento iônico, perclorato de tetrabutylamônio (4 mg/%).

Tabela 5.4. Soluções extratoras utilizadas na extração da BZ3 contida nas bases semi-sólidas em estudo.

	<b>Primeira hora de extração</b>	<b>Segunda hora de extração</b>
<b>Hidrogel</b>	7 mL de água	3 mL de acetonitrila
<b>Creme-gel</b>	7 mL de água	3 mL de acetonitrila
<b>Emulsão água em silicone</b>	10 mL de acetonitrila	-

A especificidade, a exatidão e a precisão no doseamento da BZ3 contida nas bases semi-sólidas foram determinadas (Anexo 2).

#### **5.2.2.5.2 Determinação do diâmetro médio das partículas após incorporação nas bases semi-sólidas**

A determinação do diâmetro e da polidispersão das nanocápsulas contidas nos veículos semi-sólidos foi realizada através de espalhamento de luz dinâmico (Zetasizer® nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern, EUA). As amostras de HNCBZ3 foram diluídas 500 vezes (m:v) em água ultrapura filtrada através de membrana 0,45 µm à temperatura ambiente e as amostras de CGNCBZ3 foram diluídas 2000 vezes (m:v) nas mesmas condições. As soluções obtidas foram filtradas através de membrana 1,2 µm, para eliminar partículas com diâmetro superior que poderiam interferir na análise. Para determinar se as formulações não interferem nas medidas de diâmetro amostras de HGBr e CGBr foram tratadas como descrito anteriormente e submetidas a análise de diâmetro. Os resultados foram obtidos através da média de três repetições.

---

### 5.2.2.5.3 Determinação de pH

As formas farmacêuticas semi-sólidas foram diluídas a 10 % (m/v) em água ultrapura, e as determinações do pH foram efetuadas utilizando-se potenciômetro calibrado com soluções-tampão pH 4,0 e 7,0. As determinações foram obtidas em triplicata.

### 5.2.2.5.4 Análise reológica das formulações semi-sólidas

As características reológicas das formulações semi-sólidas foram avaliadas com auxílio de viscosímetro rotacional Brookfield, modelo LVDV-II+ provido de *spindle* SC4-25 e adaptador SSA. Para as determinações, as amostras foram acondicionadas em dispositivo Brookfield para avaliação de pequenas quantidades de amostra, acoplado a banho de água termostaticado circulante a  $25 \pm 1$  °C.

As velocidades de rotação do *spindle* foram selecionadas com base em determinações preliminares, respeitando os limites nos valores de torque (superiores a 10 % e inferiores a 100 %). Um minuto após o ajuste de cada velocidade de rotação do *spindle* foi efetuada a leitura das viscosidades, das tensões de cisalhamento e das velocidades de cisalhamento. A partir desses valores, obtidos no *software* do equipamento (Rheocalc<sup>®</sup>), construíram-se os reogramas através da representação gráfica das velocidades de cisalhamento em função das tensões de cisalhamento. Os comportamentos reológicos foram determinados testando-se os quatro modelos matemáticos propostos para fluidos não-newtonianos: Bingham, Casson, Ostwald e Herschel-Bulkley (Tabela 5.5) e o modelo com maior coeficiente de correlação foi considerado o de escolha para descrever o comportamento das formulações semi-sólidas.

Tabela 5.5. Diferentes modelos matemáticos que descrevem fluídos não-newtonianos (KIM *et al.*, 2003).

Modelo	Equação	Comportamento
Bingham	$\tau = \tau_o + \eta\dot{\gamma}$	Fluxo plástico perfeito
Casson	$\tau^{0.5} = \tau_o^{0.5} + \eta^{0.5}\dot{\gamma}^{0.5}$	Fluxo plástico
Ostwald	$\tau = K\dot{\gamma}^n$	Fluxo pseudoplástico ( $n < 1$ )
Herschel-Bulkley	$\tau = \tau_o + K\dot{\gamma}^n$	Fluxo pseudoplástico com valor de cedência

#### 5.2.2.5.5 Análises de retroespalhamento de luz

As formulações HGNCBZ3, CGNCBZ3, SNCBZ3, HGBZ3, CGBZ3, SBZ3, HGBr, CGBr e SBr foram analisadas, logo após preparação, através de Turbiscan *LAB*® por 24 horas à temperatura de 40 °C, com varreduras a cada 10 min, possibilitando a identificação e o estudo dos fenômenos de instabilidade das mesmas.

#### 5.2.2.6 Avaliação da permeação *in vitro* da BZ3

A permeação *in vitro* da BZ3 foi avaliada a partir das bases semi-sólidas com o ativo incorporado na forma livre e nanoencapsulada.

---

#### 5.2.2.6.1 Preparação e estocagem das membranas

Os estudos de permeação *in vitro* foram realizados utilizando pele de abdômen de porcos fêmeas como membrana. Imediatamente após o sacrifício dos animais a pele do abdômen foi retirada e armazenada sob refrigeração até o momento da limpeza. Para tanto, os pêlos e o tecido adiposo subcutâneo foram retirados, após, a superfície interna foi limpa com algodão embebido em éter de petróleo, para retirada da maior quantidade possível de tecido adiposo (hipoderme), e a superfície externa foi limpa com algodão embebido em uma solução de lauril sulfato de sódio a 2 %. As peles foram então lavadas em água corrente e posteriormente com água ultrapura. Após secagem, discos foram recortados na pele e sua espessura determinada com um medidor de espessura. Para a realização dos experimentos de permeação foram utilizadas membranas com espessura média de 1,0 a 2,0 mm.

Após a determinação da espessura de cada disco, o mesmo foi embalado individualmente em papel alumínio e congelado à  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da utilização. As membranas foram mantidas sob refrigeração por, no máximo, 3 meses.

#### 5.2.2.6.2 Célula de difusão *in vitro*

Os estudos de permeação *in vitro* foram conduzidos em células de difusão vertical de *Franz* modificadas, possuindo um compartimento receptor com capacidade em torno de 5,0 mL e uma área de difusão de  $2,3\text{ cm}^2$  (FRANZ, 1975; VENTER *et al.*, 2001).

A membrana natural foi mantida em contato com uma solução receptora de tampão fosfato pH 7,4 com 5 % de polissorbato 80 em temperatura de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), sendo o compartimento inferior constantemente agitado com uma barra



magnética. A solução receptora foi selecionada através da determinação da concentração de saturação da BZ3 em diferentes candidatas a solução receptora.

As amostras das formulações semi-sólidas (15 mg) contendo nanocápsulas de BZ3 ou o ativo livre foram aplicadas sobre a membrana natural e permaneceram em contato com a mesma por um período de 8 horas. As coletas foram efetuadas nos tempos de 2, 4 e 8 horas. A cada tempo de coleta as células de difusão foram desmontadas e cada membrana exposta às amostras foi analisada quanto ao conteúdo de ativo remanescente no compartimento doador, retido no estrato córneo, na epiderme, na derme e localizado na solução receptora. Todos os doseamentos foram realizados por CLAE em cromatógrafo Perkin Elmer Series 200, utilizando-se detector ultravioleta visível 289 nm, coluna LiChrospher 100 RP-18 (5µm, 250 x 4 mm), pré-coluna do mesmo material (5 µm) e fase móvel isocrática de metanol e água em uma proporção 90:10 (v/v), agente de pareamento iônico perclorato de tetrabutilamônio (4 mg/%), com pH aparente igual à 4,0 e fluxo de 0,9 mL por minuto. As determinações foram realizadas utilizando-se 5 repetições para cada formulação testada.

A taxa de recuperação e a especificidade do método analítico foram determinadas (Anexo 3).

#### **5.2.2.6.3 Técnica de *Tape Stripping***

Esta técnica foi empregada com o objetivo de retirar o estrato córneo das membranas naturais possibilitando o doseamento do ativo retido nesta camada.

Consecutivas camadas de estrato córneo foram retiradas, aderindo fitas adesivas na área previamente exposta às amostras semi-sólidas. Foram utilizados 19 pedaços de fita adesiva Schoth 3M medindo 25 x 25 mm para extração do estrato córneo. A primeira fita retirada foi tratada separadamente por se tratar da quantidade de ativo ainda restante no compartimento doador. As demais, 18 fitas, foram separadas em grupos de 3 fitas, totalizando 6 grupos (T1 a T6), e acondicionadas em tubos de ensaio contendo 4 mL do solvente extrator, acetonitrila. Após o término

do experimento as fitas foram submetidas ao processo de extração do ativo, primeiramente agitadas em vortex durante 2 minutos e após sonicadas por 15 minutos. Após a extração as amostras foram filtradas através de membrana de 0,45 µm e submetidas a doseamento por CLAE. A especificidade do método analítico foi determinada e é apresentada no anexo 3. As determinações foram realizadas utilizando-se as 5 repetições utilizadas no teste de permeação cutânea (5.2.2.6.2).

#### **5.2.2.6.4 Técnica de retenção cutânea**

Após a retirada do estrato córneo, a epiderme foi separada da derme, submergindo a pele em água ultrapura a 65 °C por 45 segundos. Após esse procedimento a epiderme foi retirada com auxílio de uma espátula e acondicionada em tubo de ensaio para posterior processo de extração, utilizando-se 1 mL de solvente extrator, acetonitrila.

A derme foi picotada e acondicionada em tubo de ensaio com 2 mL de acetonitrila. As amostras de epiderme e derme foram submetidas a agitação em vórtex durante 2 minutos e sonicação por 15 minutos para total extração do ativo. Após este procedimento, as amostras foram filtradas, através de membrana com 0,45 µm, sendo o filtrado submetido ao doseamento por método analítico previamente descrito.

#### **5.2.2.7 Análise estatística**

Os resultados do experimento de permeação cutânea foram avaliados através de Análise de Variância (ANOVA) e teste “t” de Student, considerando-se um nível de significância de 0,05. Os testes foram realizados no programa SigmaStat 3.5.

#### **5.2.2.8 Descarte de resíduos**

Todos os resíduos químicos, bem como aqueles oriundos de material biológico, gerados durante a preparação e caracterização de nanocápsulas, foram segregados, acondicionados e identificados segundo normas do Plano de Gerenciamento de Resíduos implementado pela Resolução COSAT 01/07, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### ***5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO***

---



### 5.3.1 Caracterização físico-química da suspensão de nanocápsulas incorporadas nas formulações semi-sólidas

Após caracterização físico-química e estudo da estabilidade de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo concentrações crescentes de BZ3, selecionou-se a suspensão contendo 5 mg/mL do ativo para ser incorporada nos veículos semi-sólidos. Esta formulação foi selecionada, pois se apresentou estável durante 90 dias de armazenamento à temperatura ambiente, bem como nos estudos de retroespalhamento de luz (Turbiscan *LAb*<sup>®</sup>) por 6 horas.

A suspensão de nanocápsulas de BZ3 contendo 5 mg/mL de ativo apresentou diâmetro médio de  $247 \pm 4$  nm e índice de polidispersão de  $0,15 \pm 0,01$ . Os diâmetros foram adequados para aplicação tópica visto que os tamanhos de partícula recomendados para este objetivo são os inferiores a 600 nm e que partículas com diâmetro médio em torno de 300 nm são capazes de liberar seu conteúdo nas camadas mais profundas da pele (VERMA *et al.*, 2003). Os índices de polidispersão abaixo de 0,20 indicam uma distribuição restrita do tamanho de partícula, conseqüentemente, adequada homogeneidade do sistema (ALVES *et al.*, 2007). O valor de pH foi condizente com o método de preparação e matérias-primas constituintes da suspensão,  $6,6 \pm 0,1$  (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O teor total bem como a taxa de associação do ativo às nanocápsulas foram próximos a 100 % (97,09 % e 99,97 %, respectivamente).

### 5.3.2 Teste de inchamento do polímero

Para verificar se o polímero selecionado para a formulação das nanocápsulas, a poli( $\epsilon$ -caprolactona), seria afetado pelos diferentes silicones utilizados na composição da emulsão água em silicone (uma das três formulações semi-sólidas estudadas), no sentido de seu inchamento ou dissolução e, conseqüente desestruturação das nanocápsulas, foi conduzido o teste de inchamento do polímero. A Figura 5.1 (a, b, c) mostra as variações de massa do polímero após

diferentes tempos de contato com os silicones DC5225<sup>®</sup>, dimeticone e ciclometicone, respectivamente.

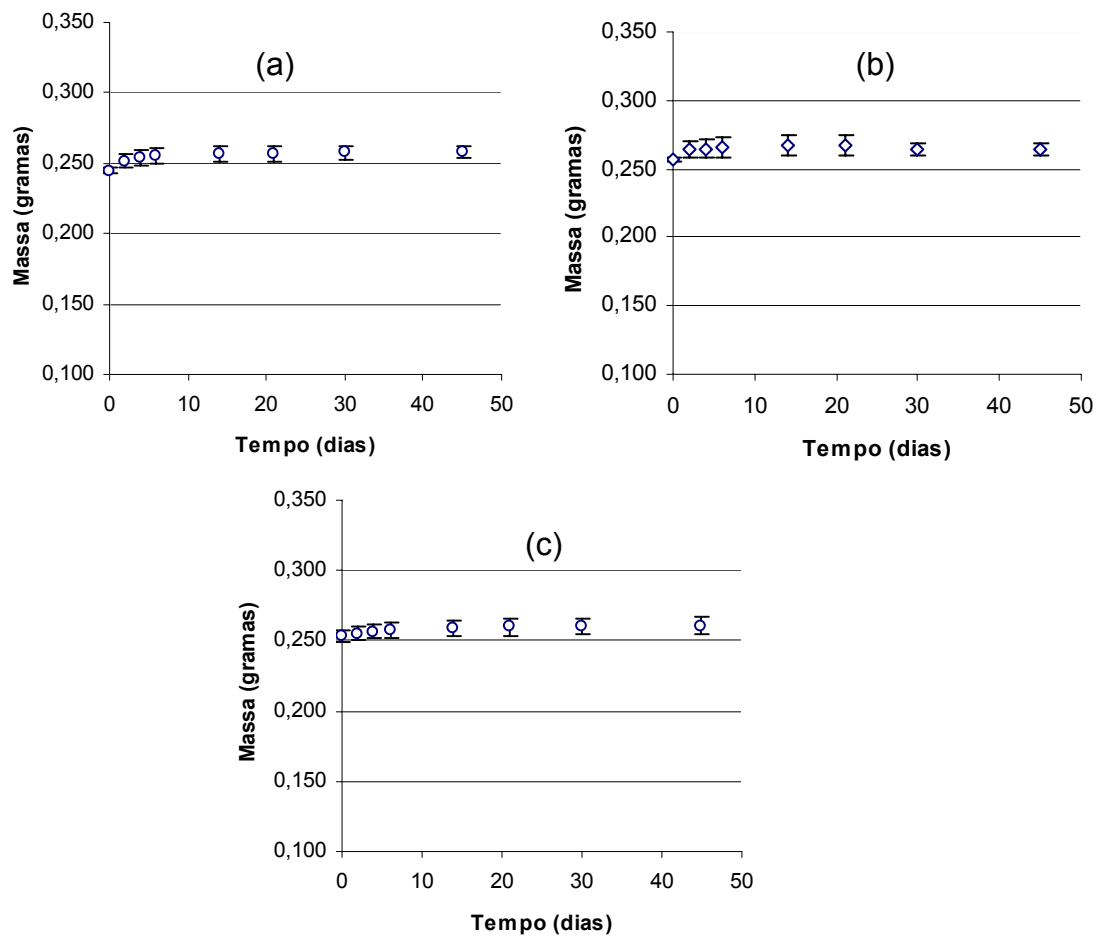


Figura 5.1. Massa de poli( $\epsilon$ -caprolactona) após imersão nos diferentes silicones por 45 dias (a: silicone DC 5225<sup>®</sup>; b: dimeticone; c: ciclometicone) (n=3).

Nos primeiros dois dias de estudo as massas dos filmes poliméricos sofreram um incremento discreto (2,76 %, 2,98 % e 0,83 %, respectivamente) (Figura 5.1), porém não significativo, pois ocorreu devido a quantidade residual de silicone aderido ao filme que não pode ser completamente retirado com papel absorvente. A partir da segunda pesagem as massas dos filmes poliméricos permaneceram constantes, indicando que a fase externa da emulsão em estudo não dissolve o polímero, o que garante em hipótese, a integridade da parede polimérica das nanocápsulas incorporadas na formulação (GUTERRES *et al.*, 2000).

---

### 5.3.3 Caracterização físico-química das formulações semi-sólidas

As formulações semi-sólidas foram caracterizadas quanto ao seu aspecto visual, teor de BZ3, pH, diâmetro médio das nanocápsulas incorporadas as formulações semi-sólidas e propriedades reológicas.

#### 5.3.3.1 Características visuais

O hidrogel controle (HGBr), sem BZ3 livre ou nanoencapsulada, apresentou-se transparente e o hidrogel contendo BZ3 livre (HGBZ3) apresentou-se levemente esbranquiçado e opaco, devido à prévia dispersão da BZ3 em polissorbato 80. Por sua vez, o hidrogel contendo as nanocápsulas (HGNCBZ3) apresentou-se branco, brilhoso e homogêneo devido à presença de partículas pouco polidispersas com diâmetros nanométricos que espalham luz. O creme-gel contendo nanocápsulas de BZ3 (CGNCBZ3) apresentou-se branco, devido à inclusão da suspensão de nanocápsulas na formulação, além de brilhoso e homogêneo. Já as formulações de creme-gel contendo o ativo na forma livre (CGBZ3) e o creme-gel controle (CGBr) apresentaram-se esbranquiçados. Nas formulações da série emulsão água em silicone não houve alteração de cor e/ou aspecto nas formulações, já que a emulsão sem o ativo (SBr) é opaca, igual às formulações contendo BZ3 livre (SBZ3) e encapsulada (SNCBZ3).

#### 5.3.3.2 Valores de pH e teor de BZ3 nas formulações

Os valores de pH para a série de formulações de hidrogel (HGBr, HGBZ3 e HGNCBZ3) permaneceram entre 7,8 e 8,0, valores semelhantes foram verificados na série de formulações de creme-gel (CGBr, CGBZ3 e CGNCBZ3). Para as formulações da série emulsão água em silicone (SBr, SBZ3 e SNCBZ3) os valores



de pH foram inferiores, em torno de 6,7 (Tabela 5.6). Não se observou diferença nos valores de pH quando as nanocápsulas foram adicionadas às formulações semi-sólidas. Todos os valores de pH foram ideais para aplicação cutânea, ressaltando que valores de pH de 3 a 10 não interferem nas características de permeação de moléculas lipofílicas, como é o caso da BZ3 (SZNITOWSKA *et al.*, 2001).

A concentração final de BZ3 incorporada nas formulações semi-sólidas ficou limitada ao volume aquoso das formulações e à concentração de BZ3 na suspensão de nanocápsulas (5 mg/mL). Deste modo, as formas farmacêuticas semi-sólidas contendo BZ3 apresentaram concentração final de aproximadamente 0,375 % (m/m).

Os teores obtidos para as formulações semi-sólidas contendo o ativo na forma livre ou nanoencapsulada foram superiores a 95 % (Tabela 5.6), exceto para a formulação SNCBZ3 (93,92 ± 0,16 %), provavelmente devido à fase contínua da formulação ser siliconada, dificultando o processo de extração.

Tabela 5.6. Teor e pH das formulações semi-sólidas contendo ou não nanocápsulas.

Formulação	pH	Teor
<b>HGNCBZ3</b>	8,0 ± 0,1	97,00 ± 0,28
<b>HGBZ3</b>	7,9 ± 0,1	98,75 ± 0,28
<b>HGBr</b>	7,8 ± 0,2	-
<b>CGNCBZ3</b>	7,7 ± 0,1	97,40 ± 1,76
<b>CGBZ3</b>	7,9 ± 0,1	96,38 ± 1,08
<b>CGBr</b>	7,9 ± 0,1	-
<b>SNCBZ3</b>	6,7 ± 0,1	93,92 ± 0,16
<b>SBZ3</b>	6,7 ± 0,1	100,51 ± 0,76
<b>SBr</b>	6,7 ± 0,2	-

HGNCBZ3: hidrogel contendo nanocápsulas de BZ3; HGBZ3: hidrogel contendo BZ3 livre; HGBr: hidrogel branco; CGNCBZ3: creme-gel contendo nanocápsulas de BZ3; CGBZ3: creme-gel contendo BZ3 livre; CGBr: creme-gel branco; SNCBZ3: emulsão água em silicone contendo nanocápsulas de BZ3; SBZ3: emulsão água em silicone contendo BZ3 livre; SBr: emulsão água em silicone branco (n=3).

### 5.3.3.3 Diâmetro médio de partícula

A distribuição dos diâmetros médios das nanocápsulas obtidos nas análises das formulações semi-sólidas (Figuras 5.2-b e 5.2-c) demonstra similaridade à distribuição do tamanho de partícula da suspensão de nanocápsulas antes da incorporação às bases semi-sólidas (Figura 5.2-a). A distribuição do diâmetro das formulações brancas não se sobrepôs à distribuição dos diâmetros verificados para as formulações contendo nanocápsulas, indicando a manutenção de nanocápsulas incorporadas nas formulações HGNCBZ3 (213 nm) e CGNCBZ3 (241 nm) com diâmetros semelhantes aos observados na suspensão de nanocápsulas (230 nm) antes da incorporação às bases semi-sólidas.

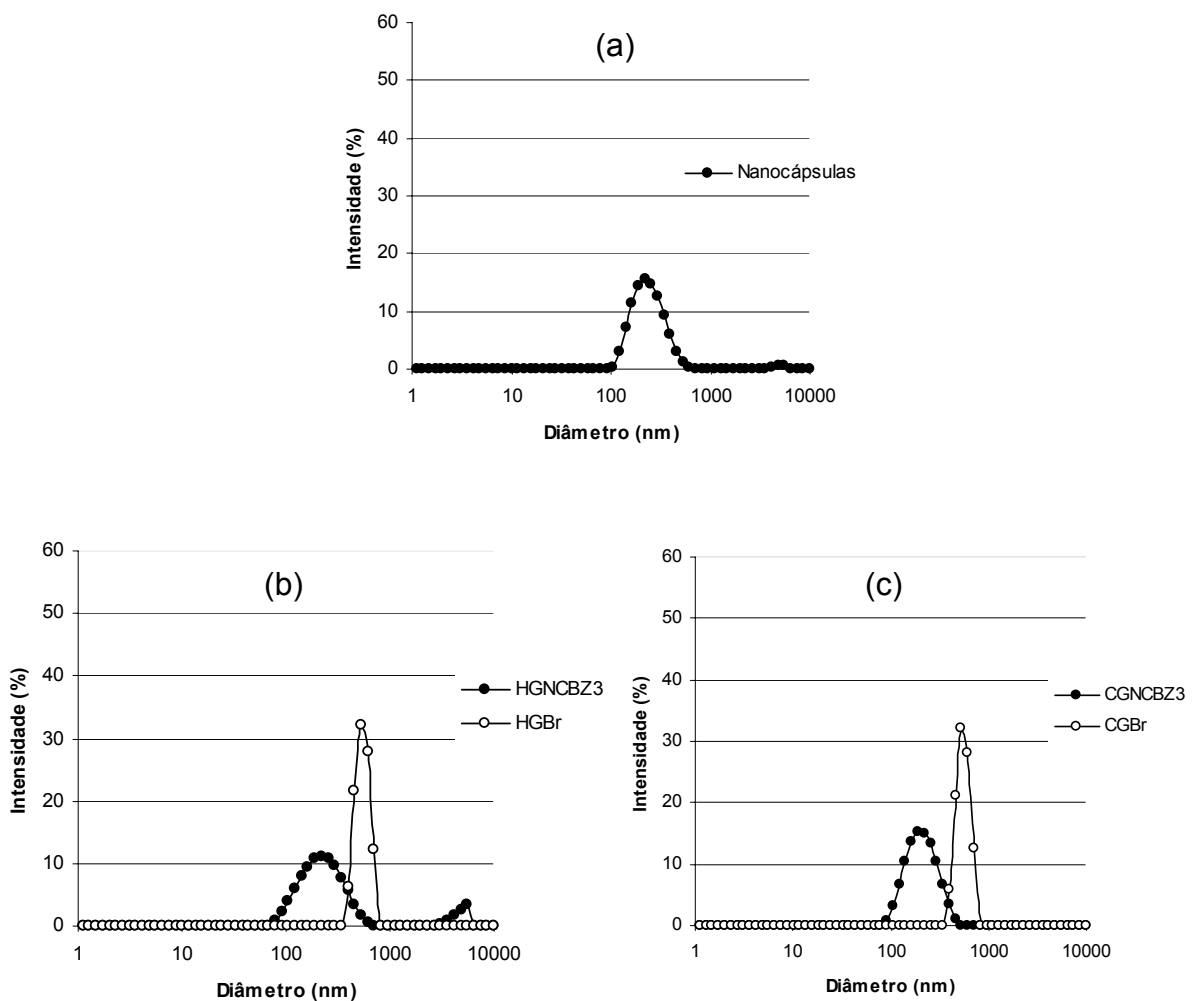


Figura 5.2. Distribuição do tamanho de partícula em relação à intensidade (a: suspensão de nanocápsulas de BZ3 (5 mg/mL); b: HGNCBZ3 e HGBr; c: CGNCBZ3 e CGBr).

Novamente, ressalta-se que os diâmetros das nanocápsulas, contidas nas formulações semi-sólidas, foram adequados para aplicação de produtos tópicos, visto que os diâmetros recomendados para este objetivo são inferiores a 600 nm (VERMA *et al.*, 2003).

A determinação do diâmetro médio de partícula das nanocápsulas incorporadas na emulsão água em silicone (SNCBZ3) não foi realizada. Não foi possível dissolver a formulação em água para realizar as análises de diâmetro, pois a fase externa da mesma é formada por diferentes silicones.

#### **5.3.3.4 Comportamento reológico das formulações semi-sólidas**

A avaliação das características reológicas de formulações semi-sólidas para uso tópico, tanto cosmético quanto dermatológico, é de fundamental importância para avaliar efeitos da formulação, bem como para o processamento da mesma, seu controle de qualidade e estabilidade. Estas características de uma formulação semi-sólida estão relacionadas ao enchimento e retirada da formulação de seu material de acondicionamento, com sua espalhabilidade e aderência sobre a pele, com sua aceitabilidade pelo paciente, estabilidade física do produto vinculado à formulação, liberação do fármaco/ativo da base e, conseqüentemente, com a biodisponibilidade biológica (LACHMAN, 2001; MILÃO, 2001).

As características reológicas das formulações contendo BZ3 (livre ou nanoencapsulada) e das formulações brancas (sem conter o ativo) foram avaliadas com viscosímetro rotacional Brookfield LV. Os reogramas das formulações semi-sólidas avaliadas demonstram não existir relação linear entre os valores das tensões de cisalhamento e os das velocidades de cisalhamento, denotando o caráter não-newtoniano de todas as formulações estudadas.

Na Tabela 5.7 são apresentados os coeficientes de regressão e os respectivos desvios-padrão dos modelos matemáticos que descrevem os comportamentos não-newtonianos plástico perfeito, plástico, pseudoplástico e pseudoplástico com valor de cedência. Para todas as formulações o modelo que

melhor se adequou foi o modelo de Ostwald que descreve o comportamento pseudoplástico, comportamento este ideal para formulações farmacêuticas para uso tópico (LACHMAN, 2001). A adição de nanocápsulas contendo BZ3 às formulações não alterou o comportamento reológico que permaneceu sendo pseudoplástico.

Tabela 5.7. Coeficientes de regressão referentes aos modelos que descrevem, respectivamente, os comportamentos não-newtonianos plástico perfeito, plástico, pseudoplástico e pseudoplástico com valor de cedência da série de formulações de hidrogel, creme-gel e emulsão água em silicone.

Formulação	Binham	Casson	Ostwald	Herschel-Bukley
<b>HGNCBZ3</b>	0,8856 ± 0,0136	0,9289 ± 0,0100	<b>0,9673 ± 0,0064</b>	0,8326 ± 0,0262
<b>HGBZ3</b>	0,9459 ± 0,0022	0,9700 ± 0,0013	<b>0,9875 ± 0,0004</b>	0,9018 ± 0,0244
<b>HGBr</b>	0,9745 ± 0,0019	0,9886 ± 0,0018	<b>0,9929 ± 0,0024</b>	0,9746 ± 0,0049
<b>CGNCBZ3</b>	0,9603 ± 0,0064	0,9879 ± 0,0032	<b>0,9995 ± 0,0002</b>	0,8411 ± 0,0545
<b>CGBZ3</b>	0,9675 ± 0,0086	0,9899 ± 0,0045	<b>0,9994 ± 0,0005</b>	0,9557 ± 0,1920
<b>CGBr</b>	0,9582 ± 0,0085	0,9854 ± 0,0056	<b>0,9987 ± 0,0012</b>	0,9435 ± 0,0173
<b>SNCBZ3</b>	0,9720 ± 0,0026	0,9906 ± 0,0015	<b>0,9998 ± 0,0001</b>	0,9125 ± 0,0162
<b>SBZ3</b>	0,9718 ± 0,0056	0,9934 ± 0,0018	<b>0,9986 ± 0,0009</b>	0,9095 ± 0,0094
<b>SBr</b>	0,9706 ± 0,0067	0,9923 ± 0,0033	<b>0,9993 ± 0,0008</b>	0,9052 ± 0,0288

HGNCBZ3: hidrogel contendo nanocápsulas de BZ3; HGBZ3: hidrogel contendo BZ3 livre; HGBr: hidrogel branco; CGNCBZ3: creme-gel contendo nanocápsulas de BZ3; CGBZ3: creme-gel contendo BZ3 livre; CGBr: creme-gel branco; SNCBZ3: emulsão água em silicone contendo nanocápsulas de BZ3; SBZ3: emulsão água em silicone contendo BZ3 livre; SBr: emulsão água em silicone branco (n=3).

Hidrogéis são formulações semi-sólidas muito utilizadas em produtos cosméticos e dermatológicos, pois apresentam fácil espalhamento, não são gordurosos e podem veicular princípios ativos hidrossolúveis e nanocarreadores, como os lipossomas (CORRÊA *et al.*, 2005). Dentre as matérias primas utilizadas destacam-se os ácidos carboxivinílicos (resinas do tipo Carbopol<sup>®</sup>), que são considerados doadores de viscosidade à formulação.

Em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa avaliou-se o comportamento reológico de hidrogéis à base de Carbopol 940<sup>®</sup> contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão com nimesulida, tendo sido identificado comportamento pseudoplástico para todas as formulações. Os hidrogéis contendo os diferentes nanocarreadores (nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsão) não apresentaram alteração no comportamento reológico (ALVES *et al.*, 2005). Similarmente, os resultados obtidos para as formulações semi-sólidas contendo BZ3 indicam que todas as formulações da série hidrogel (HGBr, HGBZ3 e HGNCBZ3) adequaram-se ao modelo de Ostwald, apresentando comportamento não-newtoniano pseudoplástico.

Na Figura 5.3 observa-se os reogramas da série hidrogel. O coeficiente de regressão do HGBr (Figura 5.3-c) para o modelo de Ostwald foi de  $0,9929 \pm 0,0024$ , superior aos demais modelos estudados, indicando o comportamento não-newtoniano pseudoplástico desta formulação. De fato, hidrogéis são conhecidos por apresentarem comportamento pseudoplástico (DOLZ, *et al.* 1998). Em estudo realizado por Kim e colaboradores (2003) avaliou-se a concentração do polímero utilizado para formação do gel e em todas as concentrações estudadas o comportamento reológico obtido foi pseudoplástico, corroborando os resultados obtidos neste estudo.

A adição de BZ3 na forma livre (Figura 5.3-b) e nanoencapsulada (Figura 5.3-a) não modificou o comportamento reológico das formulações (HGBZ3 e HGNCBZ3) que apresentaram coeficientes de regressão para o modelo de Ostwald de  $0,9875 \pm 0,0004$  e  $0,9673 \pm 0,0064$ , respectivamente, sendo superiores aos coeficientes de regressão obtidos para os demais modelos.

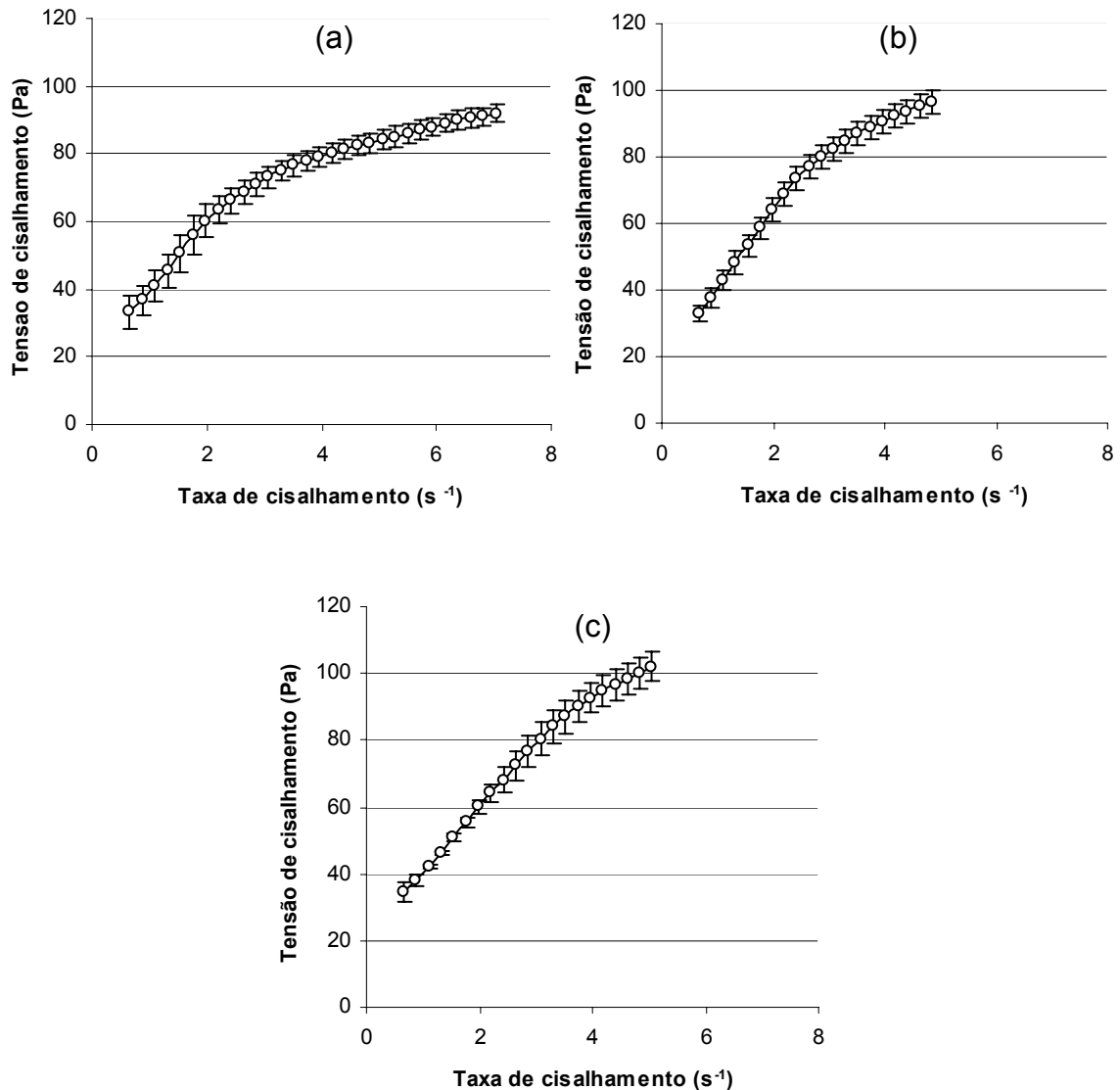


Figura 5.3. Reogramas, de tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento, referentes à série de hidrogel (a: HGNCBZ3; b: HGBZ3; c: HGBr) (n=3).

Similarmente à série de hidrogel, a série de creme-gel também apresentou comportamento não-newtoniano pseudoplástico. O CGBr (Figura 5.4-c) e o CGBZ3 (Figura 5.4-b) apresentaram coeficientes de regressão para o modelo de Ostwald de  $0,9987 \pm 0,0012$  e  $0,9994 \pm 0,0005$ , respectivamente. A adição de nanocápsulas contendo BZ3 à formulação de creme-gel (CGNCBZ3) não alterou seu comportamento reológico (Figura 5.4-a), como pode ser observado pelo coeficiente de regressão para o modelo de Ostwald,  $0,9995 \pm 0,0002$ , superior aos demais modelos.

A taxa de cisalhamento utilizada para avaliar o CGBr (Figura 5.4-c) foi inferior às demais, pois o CGBr tem maior valor de consistência. Utilizando-se as taxas de cisalhamento empregadas nas outras formulações o torque da análise era superior a 100 %, impossibilitando o término da análise.

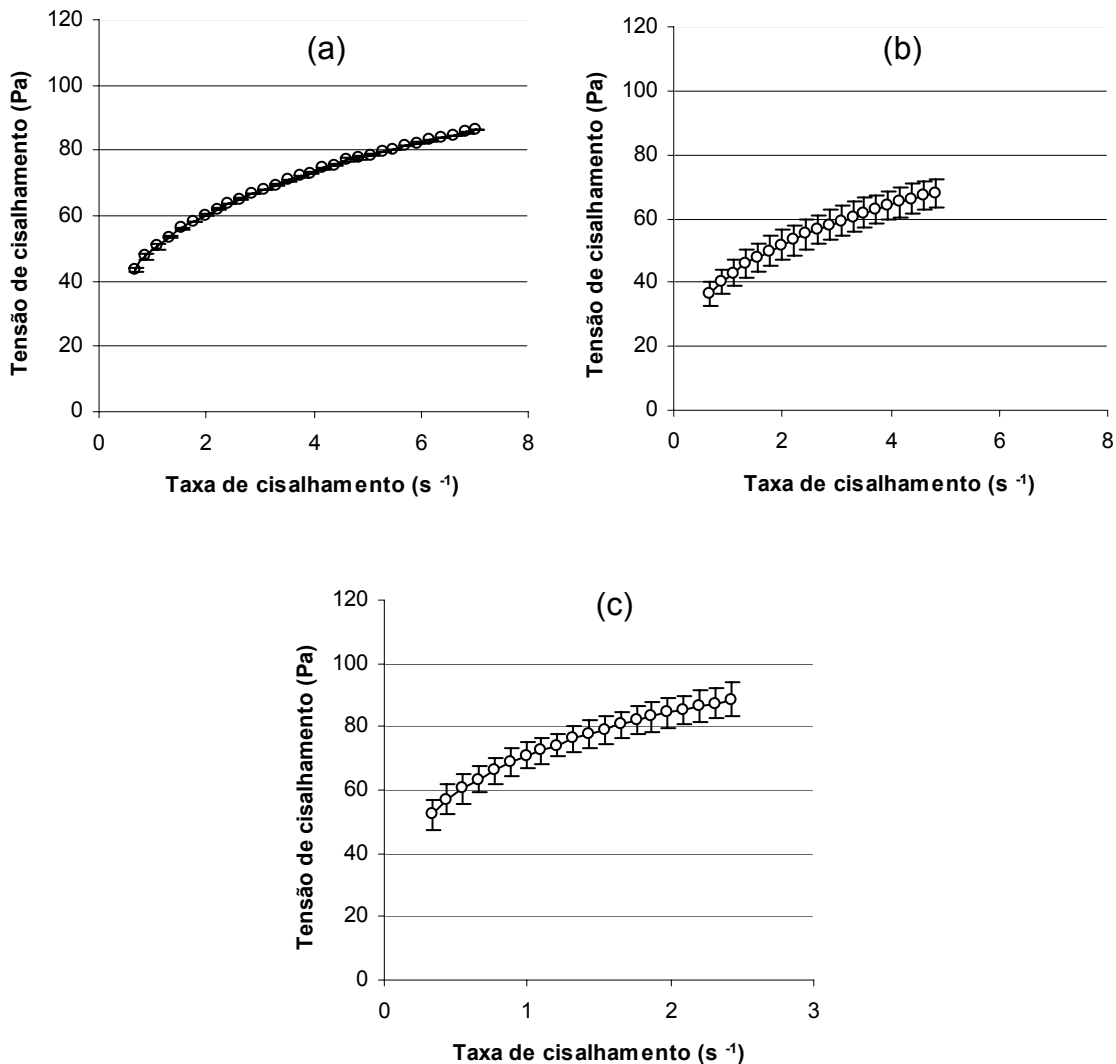


Figura 5.4. Reogramas, de tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento, referentes à série de creme-gel (a: CGNCBZ3; b: CGBZ3; c: CGBr) (n=3).

A emulsão água em silicone foi escolhida para este estudo por se apresentar como uma formulação interessante para incorporação de filtros solares químicos, pois apresenta diferentes silicones em sua fase contínua, propiciando repelência à água e aumento do tempo de resistência da formulação sobre a pele, ambas características muito apreciadas em formulação de protetores solares (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003).



A Figura 5.5 apresenta os reogramas referentes à série de emulsão água em silicone. A formulação SBr (Figura 5.5-c) apresentou comportamento não-newtoniano pseudoplástico com coeficiente de regressão para o modelo de Ostwald de  $0,9993 \pm 0,0008$ , bem como a formulação SBZ3 com coeficiente de  $0,9986 \pm 0,0009$ . Assim como para o hidrogel e para o creme-gel, a emulsão água em silicone também não teve seu comportamento reológico alterado pela adição de nanocápsulas à formulação, apresentando o coeficiente de regressão para o modelo de Ostwald de  $0,9998 \pm 0,0001$ .

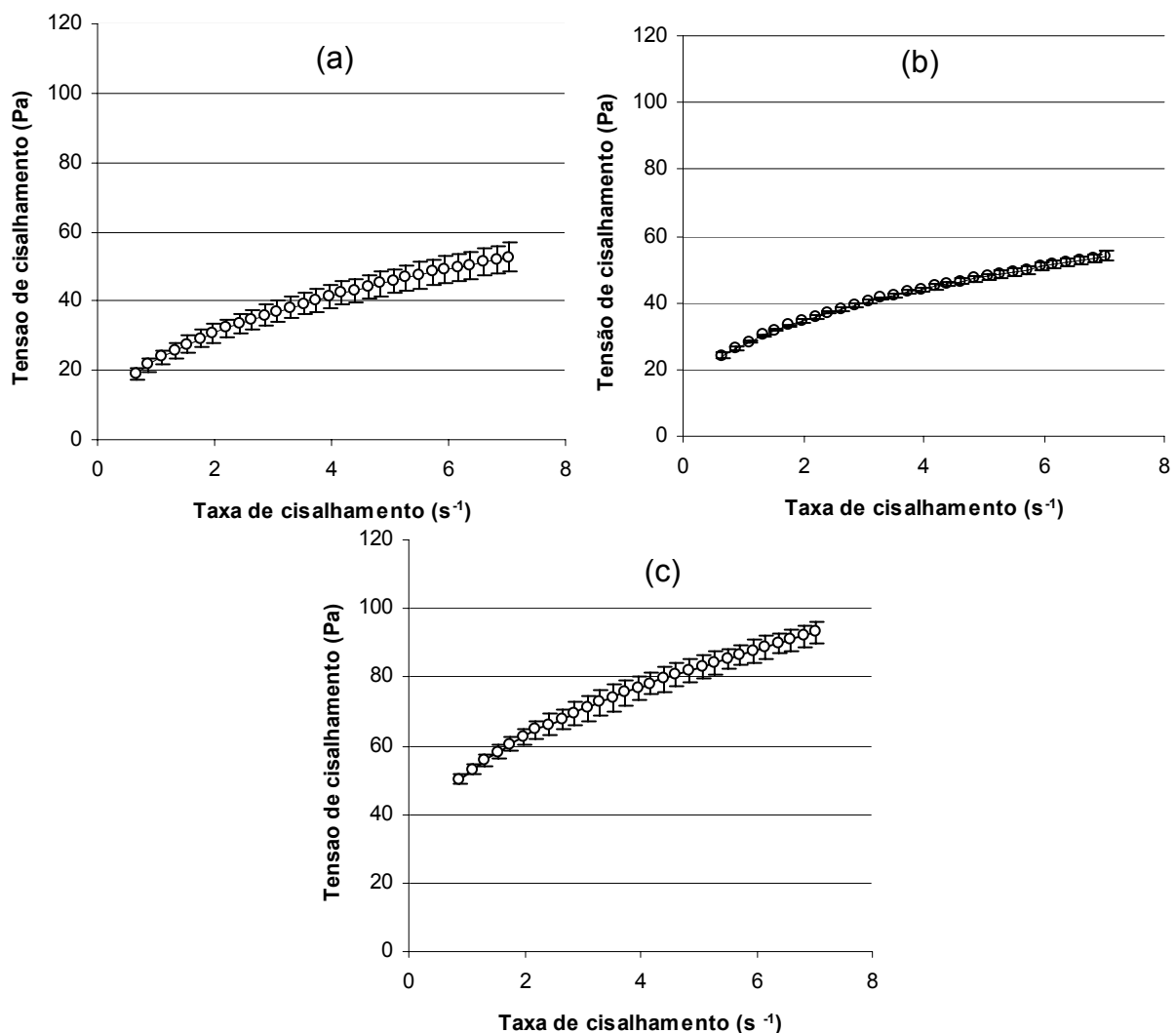


Figura 5.5. Reogramas, de tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento, referentes à série de emulsão água em silicone (a: SNCBZ3; b: SBZ3; c: SBr) (n=3).

Para as formulações dermocosméticas, o fluxo pseudoplástico é o mais comum (CORRÊA *et al.*, 2005). No presente trabalho, o conjunto de resultados

apresentados anteriormente demonstra que a incorporação de nanocápsulas não modificou o comportamento não-newtoniano pseudoplástico apresentado pelas formulações semi-sólidas. Considerando estes resultados é possível concluir que as formulações apresentaram, sob o ponto de vista reológico, características adequadas para aplicação tópica.

Na Tabela 5.8 são apresentados os índices de fluxo e os valores de consistência das formulações semi-sólidas estudadas. Os valores de consistência para as formulações da série de hidrogel foram iguais para todas as formulações, entretanto, os valores de consistência das formulações de creme-gel e emulsão água em silicone, contendo nanocápsulas de BZ3 ou o ativo livre, foram significativamente menores ( $p < 0,05$ ) que os valores de consistência das formulações brancas (sem ativo).

Visto que a presença do polissorbato 80 nestas últimas formulações (CGBZ3, CGNCBZ3, SBZ3 e SNCBZ3) poderia estar ocasionando uma diminuição nos valores de consistência das emulsões estudadas, determinou-se os valores de consistência das formulações semi-sólidas preparadas somente com polissorbato 80, sem conter BZ3. As formulações foram preparadas com a mesma constituição quali-quantitativa básica descrita nos itens 5.2.2.4.1, 5.2.2.4.2 e 5.2.2.4.3, porém sem BZ3 (livre ou nanoencapsulada) e contendo 0,575 % (m/m) de polissorbato 80, concentração esta encontrada nas formulações contendo nanocápsulas de BZ3 ou o ativo livre. Estas formulações foram nomeadas HGTween80, para o hidrogel contendo somente o tensoativo, CGTweent80, para o creme-gel e STween80 para a emulsão água em silicone.

A hipótese que explica a diminuição nos valores de consistência das emulsões foi confirmada (Tabela 5.8), pois se pode observar uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os valores de consistência das formulações de creme-gel e emulsão água em silicone contendo o tensoativo referido (CGNCBZ3, CGBZ3, CGTweent80, SNCBZ3, SBZ3 e STween80) e sem a presença do mesmo (CGBr e SBr).

Para cada série de formulações utilizadas nos estudos de permeação cutânea da BZ3 (hidrogel, creme-gel e emulsão água em silicone) os valores de consistência

foram estatisticamente iguais quando na presença do ativo nanoencapsulado ou livre.

O índice de fluxo ( $n$ ) indica o grau de pseudoplasticidade de uma formulação semi-sólida, quanto mais próximo a 0 é este valor, mais pseudoplástica é considerada a formulação. Para as formulações da série creme-gel não se observou diferença significativa entre as formulações, entretanto, nos hidrogéis e nas emulsões água em silicone, a adição de nanocápsulas aos sistemas modificou o grau de pseudoplasticidade das formulações. O HGNCBZ3 apresentou índice de fluxo igual a  $0,43 \pm 0,07$ , significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) ao HGBZ3 e ao HGBr. Em estudo realizado por Alves e colaboradores (2005), os índices de fluxo obtidos para hidrogéis contendo nanocarreadores de nimesulida também foram inferiores ao índice de fluxo do hidrogel controle (sem conter o fármaco). Para a formulação SNCBZ3 o índice de fluxo foi de  $0,43 \pm 0,04$ , significativamente superior ( $p < 0,05$ ) às demais formulações da série emulsão água em silicone.

Tabela 5.8. Índice de fluxo e valor de consistência das formulações semi-sólidas contendo ou não nanocápsulas.

Formulação	Consistência (Pa.s <sup>n</sup> )	Índice de fluxo
HGNCBZ3	$42,28 \pm 4,88$ <sup>cd</sup>	$0,43 \pm 0,07$ <sup>cd</sup>
HGBZ3	$42,21 \pm 2,99$ <sup>cd</sup>	$0,56 \pm 0,02$ <sup>ab</sup>
HGBr	$41,09 \pm 0,79$ <sup>cd</sup>	$0,58 \pm 0,05$ <sup>a</sup>
HGTween80	$40,47 \pm 5,80$ <sup>cd</sup>	$0,50 \pm 0,02$ <sup>abc</sup>
CGNCBZ3	$49,33 \pm 0,45$ <sup>bc</sup>	$0,28 \pm 0,04$ <sup>fg</sup>
CGBZ3	$40,84 \pm 2,62$ <sup>cd</sup>	$0,32 \pm 0,01$ <sup>fg</sup>
CGBr	$70,57 \pm 4,36$ <sup>a</sup>	$0,26 \pm 0,03$ <sup>g</sup>
CGTween80	$48,30 \pm 2,42$ <sup>bcd</sup>	$0,30 \pm 0,01$ <sup>fg</sup>
SNCBZ3	$22,86 \pm 2,12$ <sup>e</sup>	$0,43 \pm 0,04$ <sup>cde</sup>
SBZ3	$27,45 \pm 0,46$ <sup>e</sup>	$0,34 \pm 0,01$ <sup>fg</sup>
SBr	$51,16 \pm 1,81$ <sup>b</sup>	$0,29 \pm 0,01$ <sup>fg</sup>
STween80	$25,62 \pm 3,95$ <sup>e</sup>	$0,37 \pm 0,01$ <sup>ef</sup>

HGNCBZ3: hidrogel contendo nanocápsulas de BZ3; HGBZ3: hidrogel contendo BZ3 livre; HGBr: hidrogel branco; CGNCBZ3: creme-gel contendo nanocápsulas de BZ3; CGBZ3: creme-gel contendo BZ3 livre; CGBr: creme-gel branco; SNCBZ3: emulsão água em silicone contendo nanocápsulas de BZ3; SBZ3: emulsão água em silicone contendo BZ3 livre; SBr: emulsão água em silicone branco. Letras diferentes, nas colunas, indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) por ANOVA, pós-teste de Tukey.

### 5.3.3.5 Análise de retroespalhamento de luz

As análises através de Turbiscan *LAB*<sup>®</sup> possibilitam a identificação de fenômenos físico-químicos de instabilidade tanto em suspensões quanto em emulsões. A técnica consiste em avaliar a transmissão e o *backscattering*, utilizando uma fonte de infravermelho próximo e detectores que medem a quantidade de luz que é refletida ou transmitida através da amostra. Uma das vantagens da técnica é a possibilidade de detectar fenômenos de instabilidade antes que os mesmos sejam observados por métodos convencionais (MENGUAL *et al.*, 1999).

Na Figura 5.6 (a, b, d, e, f, g, h, i) são apresentados os gráficos de variação do *backscattering* das formulações semi-sólidas em estudo. Segundo o manual do equipamento, os gráficos de variação do *backscattering* podem ser analisados separadamente, isto é, sem analisar os gráficos de variação da transmissão, caso os valores de variação de transmissão sejam inferiores a 0,2 %. No caso da Figura 5.6-c a formulação HGBr é transparente, portanto, os valores de variação de transmissão foram superiores a 0,2 % e o gráfico de variação da transmissão também é apresentado.

Em cada gráfico, a parte esquerda refere-se à base da cubeta de análise e a direita ao topo da mesma, os fenômenos de instabilidade são demonstrados na base, no topo, ou no centro da cubeta, observando-se o aumento ou a diminuição na variação de *backscattering*.

A formulação HGBr (Figura 5.6-c) apresentou variação na transmissão e no *backscattering* durante a análise, provavelmente devido a presença de bolhas de ar na formulação. As formulações HGBZ3 (Figura 5.6-b), CGBr (Figura 5.6-f) e SBZ3 (Figuras 5.6-h), apresentaram diminuição nos valores de *backscattering* no centro da cubeta durante as análises, porém os valores de variação foram inferiores a 5 %, considerados negligenciáveis e indicando não haver fenômenos de instabilidade significativos nas amostras estudadas. As formulações contendo nanocápsulas poliméricas de BZ3, HGNCBZ3 (Figura 5.6-a), CGNCBZ3 (Figura 5.6-d) e SNCBZ3 (Figura 5.6-g), não apresentaram variação no *backscattering* em 24 horas de análise

à 40 °C, indicando que a adição do sistema coloidal nas formulações semi-sólidas não causa desestabilização do sistema.

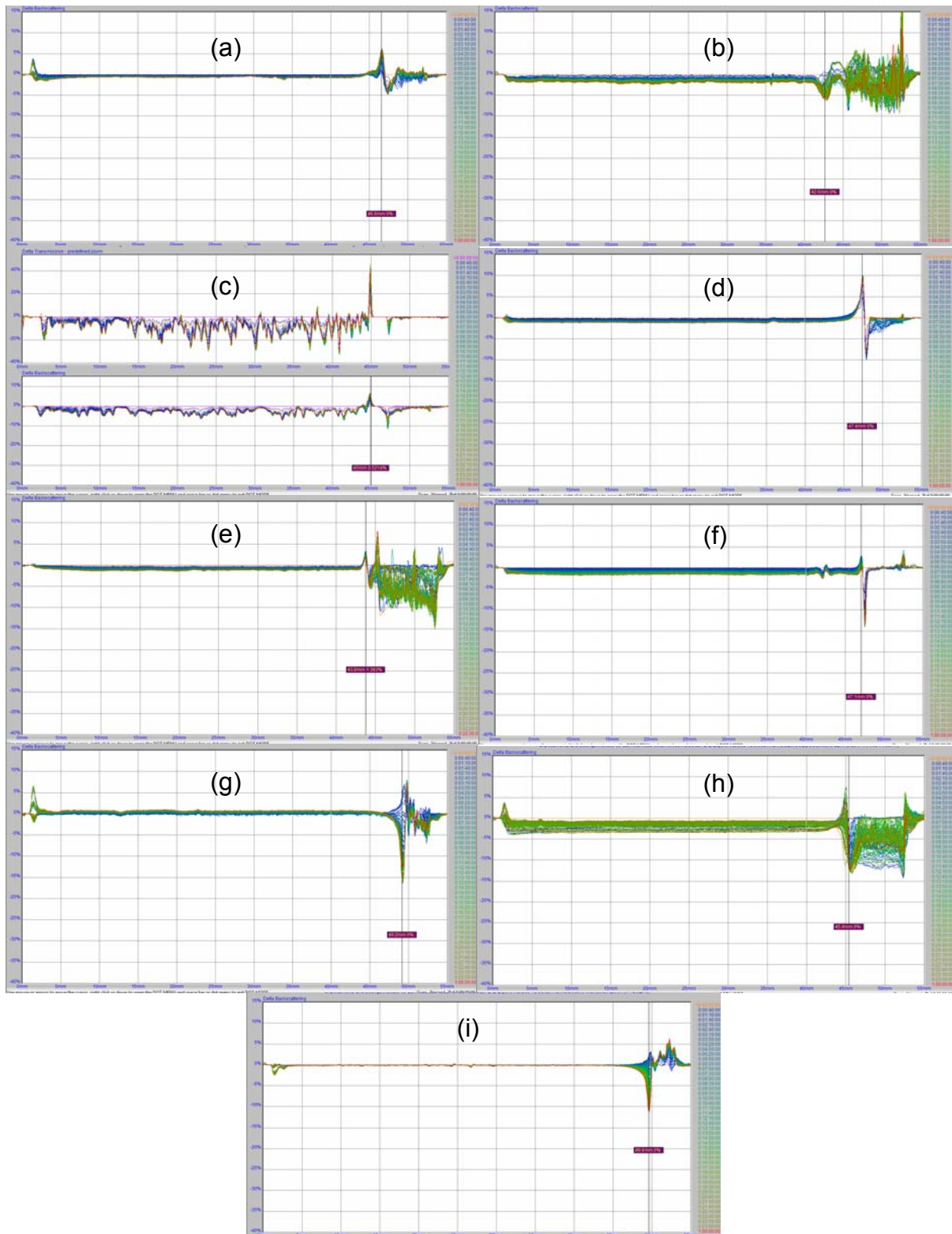


Figura 5.6. Gráficos de variação do *backscattering* das formulações semi-sólidas contendo ou não de nanocápsulas de BZ3 (a: HGNCBZ3; b: HGBZ3; c: HGBr; d: CGNCBZ3; e: CGBZ3; f: CGBr; g: SNCBZ3; h: SBZ3; i: SBr).

---

### 5.3.4 Distribuição da BZ3 nas diferentes camadas da pele avaliada através de experimento *in vitro*.

Para que um filtro solar tenha sua efetividade assegurada é necessário que o mesmo penetre na pele e permaneça por mais tempo nas camadas mais superficiais da pele promovendo assim sua proteção frente às agressões da radiação solar (GUPTA *et al.*, 1999; POTARD *et al.*, 1999). Devido a isto se avaliou a penetração da BZ3, a partir de três formulações semi-sólidas diferentes contendo o ativo livre (HGBZ3, CGBZ3 e SNCBZ3) ou nanoencapsulado (HGNCBZ3, CGNCBZ3 e SNCBZ3), e a permeação do filtro solar através das diferentes camadas da pele. Para tanto se utilizou célula de difusão de Franz, que é uma técnica amplamente empregada por apresentar resultados confiáveis com baixo custo (SARTORELLI *et al.*, 2000).

Várias membranas naturais são utilizadas para experimentos *in vitro* que avaliam a penetração/permeação cutânea de ativos ou fármacos, como pele de rato (LIU *et al.*, 2007), humana (SARTORELLI *et al.*, 2000; ALVES *et al.*, 2007) e de porco (JIMENÉZ *et al.*, 2004; WEISS-ANGELI, 2007). Neste estudo a membrana de escolha foi a pele de porco, uma vez que a mesma é considerada um produto descartado após o abate do animal, além de apresentar morfologia semelhante a pele humana (FERNANDEZ *et al.*, 2000), sendo esta última difícil de adquirir pois normalmente é proveniente de restos de cirurgia plástica (LUENGO *et al.*, 2006; SIMEONI *et al.*, 2005; ESPOSITO *et al.*, 2005) e, mais raramente, de cadáveres (GOOSEN *et al.*, 2002).

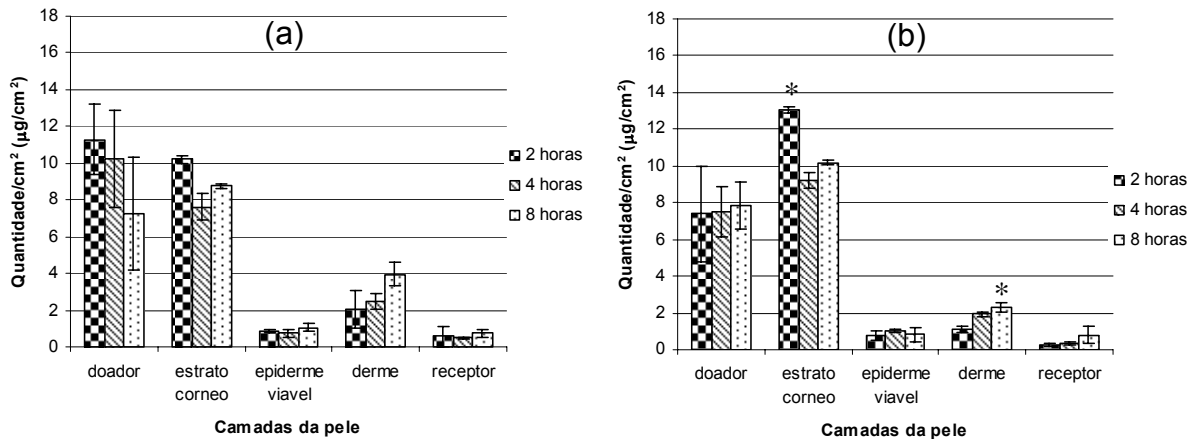
Após a escolha da membrana procedeu-se a determinação do fluido receptor utilizado no experimento. A concentração de saturação de três possíveis fluidos receptores, etanol em tampão fosfato pH 7,4 (10 % v/v), polissorbato 80 em tampão fosfato pH 7,4 (5 % m/v) e polissorbato 80 em tampão fosfato pH 7,4 (10 % m/v), foi determinada. Soluções supersaturadas de BZ3, em cada fluido receptor testado, permaneceram em repouso por 24 horas e após foram centrifugadas a 2000 RPM, o sobrenadante foi diluído e quantificado por CLAE através de metodologia previamente descrita.

A concentração de saturação foi determinada a fim de se escolher um fluido receptor que mantivesse as condições *sink* de liberação (KANG *et al.*, 2007). A concentração de saturação da BZ3 na solução de etanol em tampão fosfato pH 7,4 (10 %) (7,89  $\mu\text{g/mL}$ ) foi inferior à concentração necessária para se manter as condições *sink*. Por outro lado, em ambas as soluções contendo polissorbato 80, as concentrações de saturação foram superiores à concentração procurada e a solução de polissorbato 80 em tampão fosfato pH 7,4 (5 % m/v) (2,23 mg/mL) foi escolhida como fluido receptor para o experimento de permeação cutânea através de célula de difusão de Franz.

Para cada tempo de coleta utilizou-se uma célula de difusão distinta, e aplicou-se sobre a superfície externa da membrana natural em torno de 6,5 mg/cm<sup>2</sup> de formulação semi-sólida, quantidade próxima à utilizada por Jimenez e colaboradores em 2004, que foi de 8 mg/cm<sup>2</sup>, em estudo que avaliou a permeação cutânea de um filtro solar, metoxicinamato de octila, nanoencapsulado.

Após aplicação das formulações semi-sólidas, com concentração de BZ3 conhecida, sobre a superfície externa da membrana posicionada na célula de difusão de Franz, determinou-se a quantidade de BZ3 nas diferentes camadas da pele (compartimento receptor, derme, epiderme, estrato córneo e compartimento doador) em tempos pré-determinados (2, 4 e 8 horas). O experimento de permeação cutânea *in vitro* foi conduzido por 8 horas, levando-se em consideração que o tempo de permanência e de ação de protetores solares aplicados topicamente não é superior a 8 horas (WEISS, 2007). Os resultados foram obtidos e analisados em termos de quantidade de ativo permeada por área de pele, isto é em  $\mu\text{g}$  de BZ3 por cm<sup>2</sup> de pele.

A Figura 5.7 apresenta os resultados de distribuição da BZ3 nas diferentes camadas da pele, a partir das formulações de hidrogel (HGBZ3 e HGNCBZ3). Avaliando-se a quantidade de BZ3 que penetrou no estrato córneo a partir da formulação HGNCBZ3 se observa uma maior quantidade no tempo de 2 horas em relação à formulação HGNBZ3. A quantidade permeada através das diferentes camadas da pele foi semelhante para as duas formulações, porém a quantidade detectada na derme após 8 horas de experimento foi significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) para a formulação HGNCBZ3.



\* significativo para  $p < 0,05$ .

Figura 5.7. Distribuição da BZ3 nas diferentes camadas da pele quando incorporada em um hidrogel (a: HGBZ3; b: HGNCBZ3) (n=5).

A distribuição da BZ3, a partir dos hidrogéis, nas diferentes camadas de estrato córneo (técnica de *Tape stripping*) demonstra que o ativo incorporado em nanocápsulas (HGNCBZ3) penetra na camada referida e tem uma tendência em ficar retido superficialmente em maior quantidade (Figura 5.8-b). O ativo incorporado no gel na forma livre (HGBZ3) penetra em menor quantidade, como observado na Figura 5.8-a. Observa-se uma quantidade maior de BZ3 no compartimento doador a partir da formulação contendo o filtro livre (HGBZ3) comparando-se à formulação nanoencapsulada (HGNCBZ3).

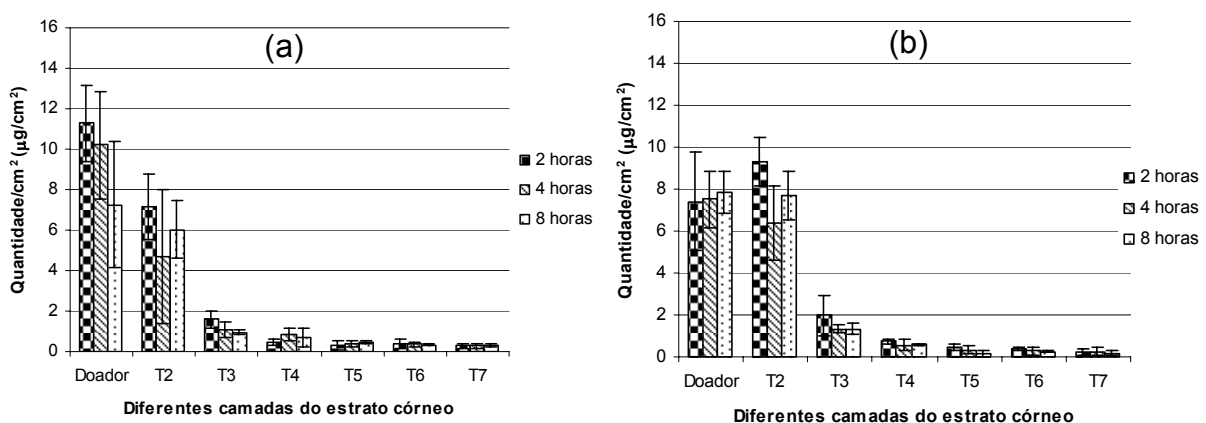
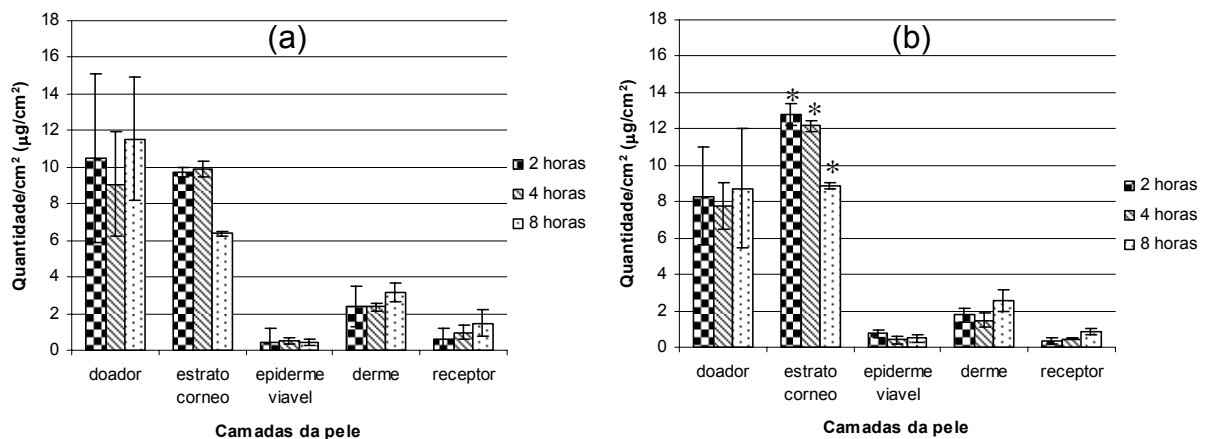


Figura 5.8. Distribuição da BZ3 nas diferentes camadas do estrato córneo quando incorporada em um hidrogel (a: HGBZ3; b: HGNCBZ3) (n=5).



Quanto à distribuição da BZ3 a partir do creme-gel observa-se que a quantidade de filtro solar que penetrou no estrato córneo foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) quando o filtro estava incorporado em nanocápsulas poliméricas (CGNCBZ3) (Figura 5.9-b). Esta diferença já foi detectada nas primeiras 2 horas de experimento e manteve-se até 8 horas, indicando uma maior retenção da BZ3 no estrato córneo. Quanto ao ativo que permeou as diferentes camadas da pele chegando ao compartimento receptor não se observa diferença significativa. Entretanto, se observa uma tendência, se encontrando maiores quantidades de BZ3 na derme e no compartimento receptor a partir da formulação CGBZ3 (Figura 5.9-a) quando comparada a CGNCBZ3 (Figura 5.9-b).



\* significativo para  $p < 0,05$ .

Figura 5.9. Distribuição da BZ3 nas diferentes camadas da pele quando incorporada em creme-gel (a: CGBZ3; b: CGNCBZ3) (n=5).

A quantidade de BZ3 que penetrou no estrato córneo e permaneceu retida mais superficialmente em ambas as formulações (CGBZ3 e CGNCBZ3) foi semelhante nas primeiras 2 horas de experimento. Na formulação CGBZ3 (Figura 5.10-a) a quantidade retida na camada mais superficial do estrato córneo diminuiu com o passar do tempo. Por outro lado, para a formulação CGNCBZ3 (Figura 5.10-b) a quantidade de BZ3 que penetrou até a camada mais superficial do estrato córneo permaneceu constante até o término do experimento (8 horas), indicando maior resistência da BZ3 localizada superficialmente no estrato córneo quando nanoencapsulada.

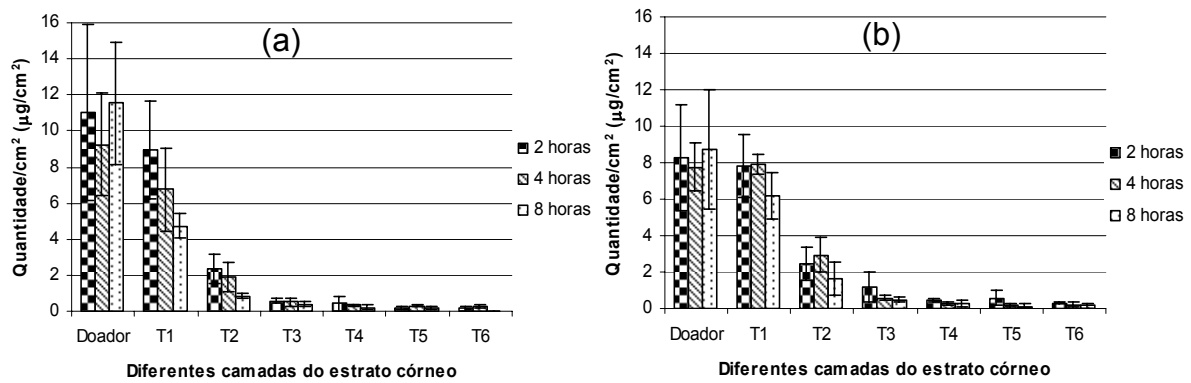
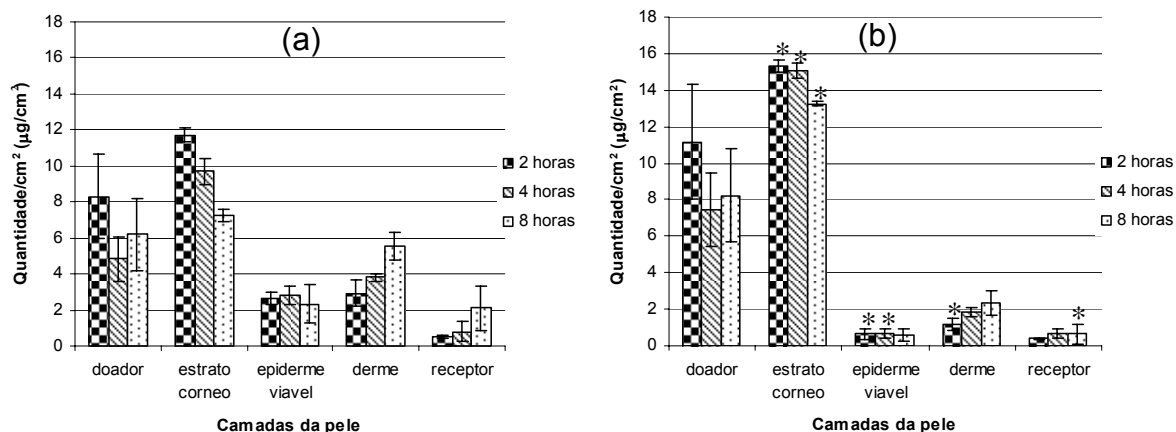


Figura 5.10. Distribuição da BZ3 nas diferentes camadas do estrato córneo quando incorporada em creme-gel (a: CGBZ3; b: CGNCBZ3) (n=5).

Os resultados referentes ao estudo de permeação cutânea da BZ3 incorporada em uma emulsão água em silicone são apresentados na Figura 5.11. Observa-se a distribuição da BZ3 quando o ativo foi incorporado a uma emulsão água em silicone, na forma livre (SBZ3) (Figura 5.11-a) e nanoencapsulada (SNCBZ3) (Figura 5.11-b). A quantidade de BZ3 retida no estrato córneo foi significativamente superior ( $p < 0,05$ ) quando o ativo foi incorporado em nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) (SNCBZ3). Além da maior quantidade de ativo retido no estrato córneo também observa-se que o mesmo permanece no estrato córneo por mais tempo comparado ao ativo formulado na forma livre (HGBZ3). As quantidades permeadas até as demais camadas da pele (epiderme viável e derme) foram inferiores ( $p < 0,05$ ) na formulação SNCBZ3 quando comparada à SBZ3, novamente indicando maior retenção do ativo no estrato córneo quando vinculado em nanocápsulas. A retenção no estrato córneo foi significativamente maior já nas primeiras horas de experimento e se manteve após 8 horas, indicando que este veículo é ideal para a aplicação de filtros solares, visto que a efetividade destes está associada a sua capacidade de permanência no estrato córneo.



\* significativo para  $p < 0,05$ .

Figura 5.11. Distribuição da BZ3 nas diferentes camadas da pele quando incorporada numa emulsão água em silicone (a: SBZ3; b: SNCBZ3) (n=5).

Quanto à distribuição do ativo nas diferentes camadas do estrato córneo (técnica de *Tape stripping*) pode-se observar uma maior retenção do mesmo nas camadas mais superficiais quando nanoencapsulado (SNCBZ3) em comparação com a formulação contendo o filtro livre (SBZ3). Este resultado demonstra a aplicabilidade destes sistemas carreadores para a liberação de filtros solares químicos na superfície cutânea, já que um protetor solar deve permitir que o filtro solar penetre na pele e permaneça retido nas camadas mais superficiais da mesma para exercer sua ação protetora (POTARD *et al.*, 1999).

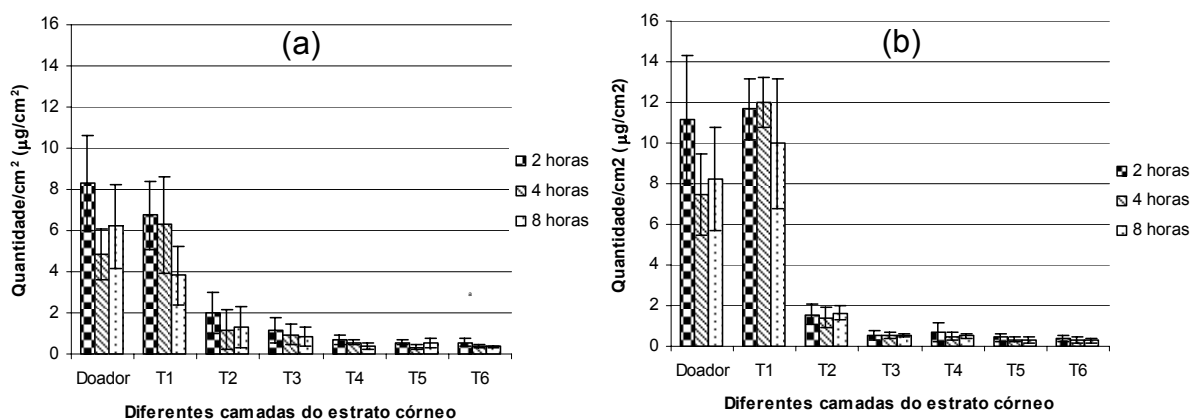


Figura 5.12. Distribuição da BZ3 nas diferentes camadas do estrato córneo quando incorporada numa emulsão água em silicone (a: SBZ3; b: SNCBZ3) (n=5).

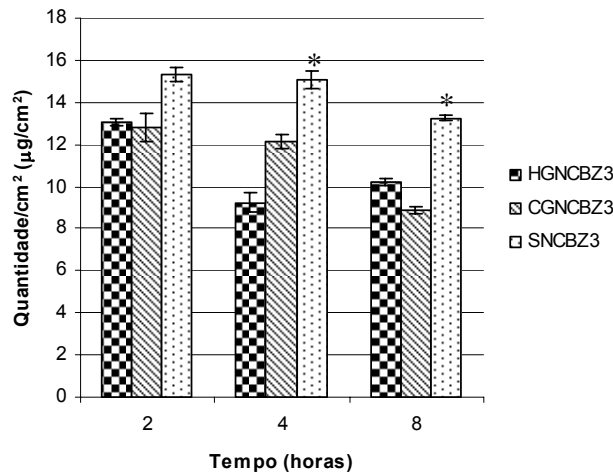
Para as três formulações estudadas (HGNCBZ3, CGNCBZ3 e SNCBZ3) o fenômeno de maior tempo de retenção da BZ3 nanoencapsulada no estrato córneo pode ser explicado pela alta hidrofobicidade e cristalinidade do polímero utilizado [poli( $\epsilon$ -caprolactona)] que contribui para a diminuição da sua difusão até o compartimento receptor, como observado semelhantemente para o MCO em trabalho realizado por Alvarez-Román e colaboradores (2004) com o mesmo polímero. Neste trabalho os autores observaram uma diminuição na penetração do MCO no estrato córneo devido a sua elevada lipofilia, no caso da BZ3 isso não aconteceu provavelmente devido ao menor coeficiente de partição octanol/água da BZ3 (2,63) quando comparada ao MCO (5,65) (GUPTA *et al.*, 1999).

Outro fator que pode explicar a maior retenção do ativo nas camadas mais superficiais da pele (estrato córneo) é o fato de as nanocápsulas apresentarem tamanho reduzido, o que possibilita maior contato entre o ativo e o estrato córneo e também a formação de um filme mais compacto que auxilia na resistência do ativo, nas camadas mais superficiais da pele, por mais tempo (JENNING *et al.*, 2000; ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2004).

A incorporação da BZ3 em sistemas nanoparticulados, além de aumentar seu tempo de retenção no estrato córneo, também diminui a quantidade de ativo que permeia através da pele e chega a suas camadas mais profundas (epiderme viável e derme), o que é fundamental por se tratar de uma formulação contendo filtro solar.

Alguns trabalhos encontrados na literatura apresentam resultados a cerca da absorção da BZ3 e da sua posterior detecção na urina (SARVEYA *et al.*, 2004; GONZALEZ *et al.*, 2006). Isto indica a importância da nanoencapsulação da BZ3, aumentando a retenção do ativo no estrato córneo e limitando sua permeação, posterior absorção e possível chegada à órgãos como apresentado por Okereke e colaboradores em 1995, em estudo desenvolvido aplicando-se topicamente formulações contendo BZ3 na pele de ratos e detectando-se, posteriormente, o ativo em diferentes órgãos dos animais.

A análise comparativa entre as três formulações semi-sólidas contendo nanocápsulas de BZ3 indica uma maior retenção do ativo no estrato córneo na formulação SNCBZ3 (Figura 5.13).



\*significativo para  $p < 0,05$ .

Figura 5.13. Distribuição da BZ3 no estrato córneo quando liberada a partir das diferentes formulações semi-sólidas (n=5).

A comparação da permeação cutânea para as camadas mais profundas da pele (epiderme viável e derme) não indicou haver diferença significativa entre as três formulações semi-sólidas estudadas (Figura 5.14-a e 5.14-b), assim como não houve diferença na quantidade de BZ3 que chegou ao compartimento receptor.

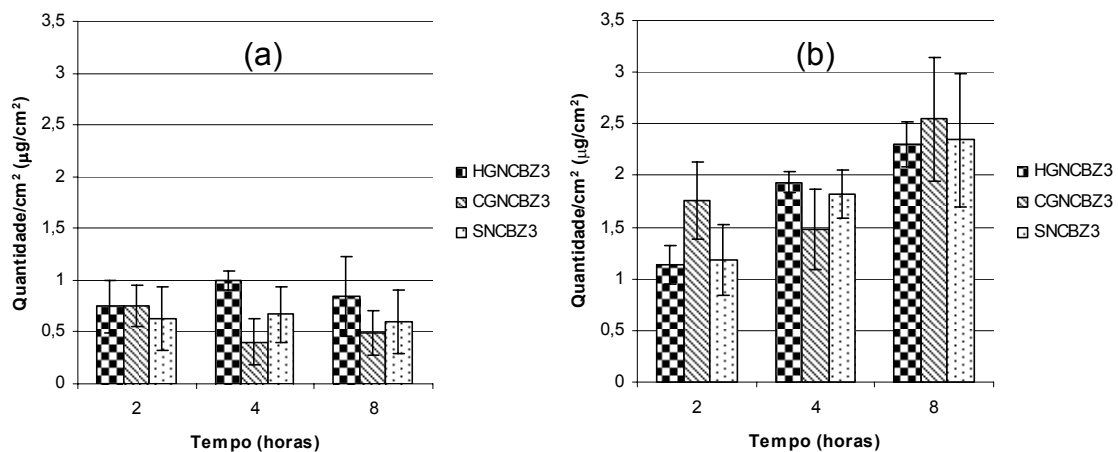


Figura 5.14. Distribuição da BZ3 na (a) epiderme viável e na (b) derme quando liberada a partir das diferentes formulações semi-sólidas (n=5).

A maior retenção do ativo no estrato córneo a partir da emulsão água em silicone contendo BZ3 nanoencapsulada (SNCBZ3) se deve, provavelmente, a maior

viscosidade e lipofilia da fase externa desta formulação quando comparada ao hidrogel e ao creme-gel. A fase externa da formulação SNCBZ3 é formada por diferentes silicones, apresentando maior lipofilia que as formulações HGNCBZ3, um hidrogel, e CGNCBZ3, um creme-gel que também possui uma fase externa aquosa. Esta maior lipofilia pode diminuir a difusão da BZ3, que é lipofílica, aumentando assim seu tempo de retenção no estrato córneo, porém, a partir do momento que a BZ3 chega às camadas mais profundas do estrato córneo ela permeia de maneira similar, independentemente das diferentes características das formulações semi-sólidas em que estava vinculada primariamente. Por isso, não se visualiza diferença significativa nas quantidades de BZ3 presentes na epiderme viável e na derme quando compara-se as diferentes formulações semi-sólidas estudadas.

Yener e colaboradores (2003) avaliaram a penetração do MCO, a partir de microsferas lipídicas ou livre, incorporado em três diferentes formulações semi-sólidas, através de célula de difusão de Franz, utilizando como membrana pele abdominal de ratos. Os autores detectaram uma maior penetração do ativo, a partir de microsferas lipídicas, quando vinculado em uma emulsão oleosa ( $6,38 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), quando comparada à penetração a partir de um hidrogel ( $4,82 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). No caso da emulsão óleo em água o ativo não foi detectado. Os autores atribuem essas diferenças as interações entre as formulações com a estrutura da pele.

Diante dos resultados expostos, a formulação emulsão água em silicone contendo nanocápsulas de BZ3 (SNCBZ3) apresentou melhores resultados, com o aumento o tempo de resistência do filtro solar nas camadas mais superficiais da pele, não aumentando, porém, a permeação da BZ3 para a epiderme viável e derme.



**6 AVALIAÇÃO DA FOTOESTABILIDADE E DA ALERGENICIDADE  
DA BENZOFENONA-3 NANOENCAPSULADA E INCORPORADA  
EM HIDROGEL**

---

---





## ***6.1 INTRODUÇÃO***

---



A exposição excessiva à radiação UV pode produzir danos aos seres humanos, como câncer de pele e fotoenvelhecimento da pele exposta (RIBEIRO, 2006). Para minimizar estes efeitos indesejáveis a aplicação de filtros solares sobre a pele exposta à radiação solar é requerida. A administração tópica de nanocarreadores contendo filtros solares químicos pode apresentar vantagens em comparação aos produtos convencionais, pois podem aumentar a afinidade entre o filtro solar e o estrato córneo, aumentando assim a eficiência do filtro solar (WISSING; MÜLLER, 2002a; GUTERRES *et al.*, 2007), além de melhorar a sua fotoestabilidade (WEISS-ANGELI *et al.*, 2007).

Os filtros solares químicos apresentam maior instabilidade que os filtros físicos por apresentarem como mecanismo de ação a absorção de energia, convertendo a molécula do estado fundamental para um estado excitado e posterior dissipação da energia absorvida. Caso o mecanismo de liberação de energia não seja eficaz, a molécula orgânica pode sofrer rearranjo, fragmentar ou gerar radicais livres, tornando-se instável (PERUGINI *et al.*, 2002; MAIER *et al.*, 2005).

A influência da nanoencapsulação de filtros solares químicos sobre a fotoestabilidade destes foi estudada por Weiss-Angeli e colaboradores (2007). Neste estudo foi desenvolvida uma suspensão de nanocápsulas poliméricas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) contendo metoxicinamato de octila (MCO), quercetina e diferentes tensoativos lipofílicos (monoestearato de sorbitano e fosfolipídios) no núcleo oleoso. Para fins comparativos uma solução metanólica do MCO e uma suspensão metanol/água também foram preparadas. Todas as amostras foram expostas à radiação UVA e, em tempos pré-determinados, o MCO foi quantificado. A capacidade dos nanocarreadores, em específico das nanocápsulas, em proteger parcialmente o filtro solar da fotodegradação foi confirmada pela diferença observada entre as amostras. Após 12 dias de exposição as diferentes nanocápsulas apresentaram teores de 17 a 35 % de MCO, enquanto a solução metanólica e a suspensão apresentaram valores inferiores a 1 %.

Adicionalmente, os nanocarreadores podem espalhar/refletir a radiação UV devido ao seu tamanho reduzido, atuando como filtros solares físicos (WISSING; MÜLLER, 2002b). Géis contendo nanocápsulas poliméricas com núcleo oleoso composto de MCO apresentaram aumento na proteção contra eritema causado pela

exposição à radiação UV quando comparados aos géis controles contendo o mesmo filtro químico na forma livre (ALVARÉZ-ROMÁN *et al.*, 2001).

A benzofenona-3 (BZ3) é um filtro solar químico de amplo espectro comumente utilizado em produtos cosméticos. É um molécula hidrofóbica, insolúvel em veículos aquosos como hidrogéis (YESUDIAN, 2002; FLOR *et al.*, 2007). Devido a isto a nanoencapsulação apresenta-se como uma alternativa para contornar esta característica, representando uma vantagem potencial, visto que os filtros solares químicos precisam estar dissolvidos no meio para serem efetivos. No caso das nanocápsulas poliméricas eles podem estar solubilizados no núcleo oleoso destes carreadores.

De maneira geral, produtos fotoprotetores induzem reações alergênicas (MAIER; KORTING, 2005), porém a prevalência de alergia a protetores solares entre a população mundial não é conhecida (KIEC-SWIERCZYNSKA *et al.*, 2005), porém sabe-se que as benzofenonas são destacadas por freqüentemente causar alergias de contato, entretanto, a ocorrência de urticária com BZ3 é rara (HORN *et al.*, 1998; YESUDIAN, 2002). Em estudo de caso analisado por Kiec-swierczynska e colaboradores (2005), a BZ3 desencadeou reação alérgica em pacientes, esta reação foi mais intensa após exposição à radiação UVA, entretanto a benzofenona-10 desencadeou resposta imune somente após a irradiação.

Neste capítulo será apresentado o estudo da fotoestabilidade da BZ3 nanoencapsulada, em comparação ao filtro livre. Considerando-se também que a BZ3 é um filtro solar químico que pode desencadear reação alérgica, neste capítulo serão apresentados os resultados de dois testes de alergenidade utilizados para avaliar o potencial alergênico da BZ3 livre e nanoencapsulada.

## ***6.2 MATERIAIS E MÉTODOS***

---



## 6.2.1 Materiais

### 6.2.1.1 Matérias-primas

- Benzofenona-3 (BZ3) – Delaware;
- Poli( $\epsilon$ -caprolactona)  $\overline{M}_w = 65000$  – Sigma;
- Monoestearato de sorbitano (Span 60) – Sigma;
- Polissorbato 80 (Tween 80) – Henrifarma;
- Triglicerídios de ácidos cáprico/caprílico (Miglyol 810<sup>®</sup>) – Brasquim;
- Carbopol 940<sup>®</sup> (polímero de ácido acrílico) – BFGoodrich;
- Trietanolamina – Delaware;
- Diazolidinil uréia – Sarfam.

### 6.2.1.2 Aparelhos e equipamentos

- Balança analítica – APX-200, Denver Instrument;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência – Perkin Elmer Series 200;
- Evaporador rotatório – Büchi;
- Potenciômetro – Ultra-Basic, Denver Instrument;
- Zetasizer<sup>®</sup> – nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern;
- Espectrofotômetro – Cary 50, Varian;
- Caixa para irradiação UVA – Fabricação própria;
- Lâmpadas fluorescentes – BLB-30 W-130 V, Starlux;
- Cubeta – 106-QS, Hellma;
- *Holder* – 013.000, Hellma;
- Radiômetro – modelo UV-400, Icel-Manaus;
- Ponto crítico – Critical Point Dryer-CPD030, Balzers;



- Microscópio eletrônica de varredura – JSM-5800, ExII;
- Paquímetro – Mitutoyo.

### **6.2.1.3 Solventes e outros materiais**

- Acetonitrila grau CLAE – Merck;
- Metanol grau CLAE – Merck;
- Acetona – Nuclear;
- Ácido acético – Synth;
- Água MilliQ;
- Membrana 0,45  $\mu\text{m}$  – Millipore;
- Coluna (LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18, 250 mm, 4,0 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) – Merck;
- Glutaraldeído – Merck;
- Camundongos – BALB/c;
- Ácido tricloroacético – Vetec;
- Formaldeído – Merck;
- <sup>3</sup>H-timidina – Amershan Pharmacia Biotech;
- Oxazolona – Merck.

## **6.2.2 Métodos**

### **6.2.2.1 Preparação das suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo BZ3**

O método de deposição interfacial do polímero pré-formado foi utilizado no preparo das nanocápsulas poliméricas contendo BZ3. Para tanto, a fase orgânica homogênea, composta por 1000 mg de poli( $\epsilon$ -caprolactona), 766 mg de

---

monoestearato de sorbitano, 3,33 mL de triglicérides de ácidos cáprico e caprílico, 500 mg de BZ3 e 270 mL de acetona foi injetada na fase aquosa composta por 766 mg de polissorbato 80 e 530 mL de água ultrapura, mantida sob agitação magnética. Após a formação das nanocápsulas, visualizada pelo aspecto leitoso da suspensão, a mesma foi mantida sob agitação moderada durante 10 minutos e, então, a acetona e parte da água foram evaporadas para ajuste final da concentração de BZ3 em 100 mL de suspensão. As nanocápsulas apresentaram diâmetro médio de  $247 \pm 4$  nm (Zetasizer<sup>®</sup> – nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern), potencial zeta de  $-9,50 \pm 1,02$  mV (Zetasizer<sup>®</sup> – nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern), pH de  $6,6 \pm 0,1$  (Potenciômetro – Ultra-Basic, Denver Instrument) e teor próximo a 100 %.

#### **6.2.2.2 Preparação do hidrogel contendo nanocápsulas de BZ3**

O hidrogel foi preparado seguindo a técnica usual, substituindo-se parte da água utilizada na formulação pela suspensão aquosa de nanocápsulas, mediante a dispersão do Carbopol 940<sup>®</sup> (0,25 g) na suspensão de nanocápsulas contendo 5 mg/mL de BZ3 (75 mL). A esta dispersão foi adicionado o conservante, diazolinidil uréia (0,3 g), e o restante em água para completar o peso final da formulação (100 g). Na seqüência, o produto foi neutralizado com trietanolamina até aproximadamente pH 7,0. A concentração de BZ3 no produto final foi de 0,375 % (m/m). Similarmente à formulação descrita anteriormente, foi preparado hidrogel contendo nanocápsulas sem o filtro químico e hidrogel branco, sem a adição de nanocápsulas ou do ativo.

Uma formulação de hidrogel contendo BZ3 livre também foi preparada. Para tanto, o ativo lipofílico foi previamente disperso em polissorbato 80 e água, para posterior adição na formulação com a mesma constituição quali-quantitativa descrita anteriormente. A concentração de polissorbato 80 foi equivalente à utilizada no hidrogel contendo nanocápsulas de BZ3 (0,575 % m/m).

O hidrogel contendo nanocápsulas de BZ3 foi designado por HGNCBZ3, a formulação contendo nanocápsulas brancas (sem ativo) por HGNCBr, a contendo BZ3 na forma livre por HGBZ3 e o hidrogel branco foi por HGBr.

#### **6.2.2.3 Análise da presença das nanocápsulas de BZ3 incorporadas no hidrogel através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (LBOUTOUNNE *et al.*, 2002)**

Para avaliar a presença das nanocápsulas poliméricas contendo BZ3 incorporadas no hidrogel foi realizada uma análise através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Amostras de HGNCBZ3 e HGBr foram aplicadas sobre a superfície de uma peça de pele abdominal de porco (fêmea) e mantidas por 30 minutos à temperatura ambiente. Depois de decorrido este tempo as amostras foram submersas em uma solução de glutaraldeído (2,5 %) em tampão fosfato pH 7,4 à temperatura ambiente por 48 horas para fixação. Seguiram-se então três lavagens, de 30 minutos cada, das amostras com tampão fosfato pH 7,4. As amostras foram desidratadas com acetona e dessecadas através de ponto crítico. Após o processo de dessecação, as amostras de pele contendo as formulações foram fixadas em *stubs*, com auxílio de pinça e lupa, e posteriormente metalizadas com ouro para tornar o material condutivo. As fotomicrografias foram obtidas utilizando-se uma voltagem de 10 kV e aumentos de 1.000 e 10.000 vezes, em microscópio eletrônico de varredura (JSM-5800, ExII), no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

#### **6.2.2.4 Determinação da fotoestabilidade *in vitro* da BZ3 nanoencapsulada e livre**

A influência da nanoencapsulação sobre a fotoproteção da BZ3 mantida sob irradiação UVA foi determinada utilizando-se filmes preparados com HGNCBZ3 e HGBZ3. Os hidrogéis foram aplicados e espalhados sobre a superfície externa de

cubetas de quartzo e mantidos em dessecador por 24 horas a fim de eliminar toda a água contida nos géis, possibilitando a formação de filmes transparentes sobre as cubetas. Os filmes foram mantidos sob radiação UVA 90 W ( $3.6 \text{ mW/cm}^2$ ) e, em tempos pré-determinados, foram retirados da exposição à radiação UVA e a variação nos comportamentos espectrais analisados através da varredura no espectro do UV (de 280 a 400 nm). As áreas sob a curva da absorção UV de 280 a 400 nm foram determinadas para cada intervalo de tempo de exposição à radiação UVA. As áreas sob a curva nos filmes de HGNCBZ3 e HGBZ3 foi expressa pela variação da percentagem das áreas sob a curva da absorção no UV de 280 a 400 nm nos diferentes tempos em relação a área sob a curva no tempo zero, considerado equivalente a 100 %.

Um estudo paralelo foi conduzido para determinar a fotoestabilidade da BZ3, no qual o ativo foi extraído dos filmes expostos à radiação UVA, nos mesmos tempos pré-determinados, utilizando-se água:acetona (70:30 v/v) e estas soluções foram quantitativamente analisadas através de CLAE utilizando-se detector ultravioleta visível 289 nm, coluna LiChrospher 100 RP-18 ( $5 \mu\text{m}$ ,  $250 \times 4 \text{ mm}$ ), pré-coluna do mesmo material ( $5 \mu\text{m}$ ) e fase móvel isocrática de metanol e água em uma proporção 95:5 (v/v), com pH aparente igual à 4,0 e fluxo de 1,0 mL por minuto. A recuperação da BZ3 foi expressa como a variação na concentração percentual de BZ3 relativa à concentração inicial (100 %) contida nos filmes.

Ambos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **6.2.2.5 Avaliação da capacidade absorptiva da radiação UV pelas formulações HGNCBZ3, HGBZ3, HGNCBZ3 e HGNCBr.**

Sistemas nanoestruturados podem atuar como filtros físicos devido sua natureza coloidal, aumentando assim a eficiência de protetores solares (WISSING e MÜLLER, 2002b). Visto isto, a absorção de hidrogéis contendo BZ3 (HGNCBZ3, HGBZ3) e nanocápsulas sem ativo (HGNCBr) foi determinada realizando-se uma varredura no espectro de UV (de 280 a 400 nm) utilizando uma cubeta com

---

capacidade para 2,6 mL e 0,01 mm de caminho óptico (106-QS, Hellma) selada por um *holder* (013.000, Hellma). O HGBr foi utilizado como linha base, e, para avaliar a influência do estado físico da BZ3 livre na absorção de radiação UV, uma solução de triglicerídeos de ácidos cáprico/caprílico contendo BZ3 livre (0,375 % m/m) (TCCBZ3) também foi avaliada. O Miglyol 810<sup>®</sup> foi escolhido por compor o núcleo oleoso das nanocápsulas incorporadas nos hidrogéis, visto que a BZ3 está dissolvida neste meio. Por outro lado, a BZ3 livre adicionada ao hidrogel (HGBZ3) foi dispersa em micelas de tensoativo (polissorbato 80).

#### **6.2.2.6 Avaliação da alergenicidade da BZ3 nanoencapsulada e livre**

Os testes de alergenicidade foram desenvolvidos na Universidade Federal do Rio de Janeiro no Laboratório de Imunofarmacologia sob responsabilidade da Profa. Dra. Bartira Rossi- Bergmann.

##### **6.2.2.6.1 Teste de alergenicidade por ensaio do linfonodo local (*local lymph node assay* – LLNA)**

O princípio básico do ensaio do linfonodo local (LLNA) é que substâncias sensibilizadoras induzem uma proliferação primária de linfócitos no linfonodo que drena o local de aplicação da amostra. Esta proliferação é proporcional à dose aplicada e à potência do alérgeno e constitui um modo simples de obter uma medida quantitativa objetiva da sensibilização. O LLNA avalia esta proliferação numa relação dose/resposta na qual a proliferação nos grupos de ensaio é comparada com a obtida nos grupos controles. É determinada a razão entre a proliferação nos grupos de ensaio e a observada nos controles. Esta razão denomina-se Índice de Estimulação e deve apresentar o valor de, pelo menos, três para que uma substância de ensaio possa ser avaliada como potencial sensibilizadora da pele.

Este teste utilizou marcação radioativa para medir a proliferação celular (KIMBER *et al.*, 1994; BASKETTER *et al.*, 1993; ANDERSEN; FRANKILD, 1997).

Os animais utilizados neste estudo foram camundongos BALB/c, com 8 a 12 semanas de idade e com variação de peso mínima, não excedendo 20 % do seu peso médio e as amostras analisadas foram: HGNCBZ3, HGNCBr, HGBZ3, HGBr e formaldeído (5 % v/v) como controle positivo (Cpos). Cada amostra foi analisada em triplicata e os resultados apresentados como a média das três repetições.

No primeiro dia do teste os camundongos foram identificados e pesados, aplicou-se no dorso de cada orelha 25  $\mu$ L das amostras diluídas, totalizando uma quantidade de 87  $\mu$ g de BZ3, a aplicação das amostras foi repetida no segundo e no terceiro dia de experimento. No quarto e no quinto dia os animais permaneceram sem tratamento. No sexto e último dia do teste, os animais foram novamente pesados, injetou-se 250  $\mu$ L de tampão fosfato pH 7,4 contendo 20  $\mu$ Ci de  $^3$ H-timidina (marcador radioativo) nos camundongos através da veia caudal e 5 horas após a administração do marcador os animais foram sacrificados. A  $^3$ H-timidina foi utilizada por se tratar de um precursor do DNA e por isso se incorpora ao novo DNA das células em proliferação. Os linfonodos auriculares foram retirados e colocados em tampão fosfato pH 7,4, reunindo-se aqueles de cada grupo experimental (grupo de tratamento).

Os linfonodos auriculares foram então macerados e as células lavadas duas vezes com tampão fosfato pH 7,4 e precipitadas com uma solução de ácido tricloroacético (5 %) a 4° C durante 18 horas. Os sedimentos foram ressuspensos em 1 mL de ácido tricloroacético e transferidos para frascos de contador de cintilações contendo 10 mL de líquido de cintilação para contagem de  $^3$ H. A incorporação de  $^3$ H-timidina foi medida por contagem de cintilação  $\beta$  em desintegrações por minuto (DPM) e expressa em DPM/grupo de tratamento.

---

**6.2.2.6.2 Teste de medida de edema de orelha (*mouse ear swelling test* - MEST)**

O teste de medida de edema de orelha (MEST) apresenta vantagens quando comparado aos testes antigamente empregados que utilizavam “porcos da índia”, pois é mais rápido, apresenta custos mais baixos, utiliza menor quantidade de amostra na análise e objetiva avaliar a sensibilização. O protocolo do MEST é muito robusto na detecção de alérgenos, indicando poucos falsos-negativos ou falsos-positivos (ROBINSON *et al.*, 1995).

Similarmente ao ensaio LLNA, os animais utilizados para o MEST foram camundongos com idade entre 8 e 12 semanas e variação de peso mínima, não excedendo 20 % do seu peso médio.

Na primeira fase do teste (fase de indução) foram realizadas três aplicações tópicas de 100 µL das amostras estudadas a cada 2 dias (dias 0, 2 e 4) no dorso dos camundongos, esta região foi previamente tricotomizada. Após 5 dias da última aplicação tópica da fase de indução, procede-se à aplicação tópica de 25 µl das amostras no dorso de ambas as orelhas (fase de desafio). Este período de 5 dias é necessário para possibilitar a resposta imunológica produzida pelo organismo. A resposta imunológica foi avaliada através das medidas do inchaço das orelhas dos camundongos, que foram realizadas 24 e 48 horas após a fase do desafio (Figura 6.1).

As amostras avaliadas neste estudo foram: HGNCBZ3, HGNCBr, HGBZ3, HGBr, oxazolona (0,3 %) como controle positivo (Cpos) e acetona:óleo de oliva (4:1) como controle negativo (Cneg). Cada amostra foi analisada em triplicata e os resultados apresentados como a média das três repetições.

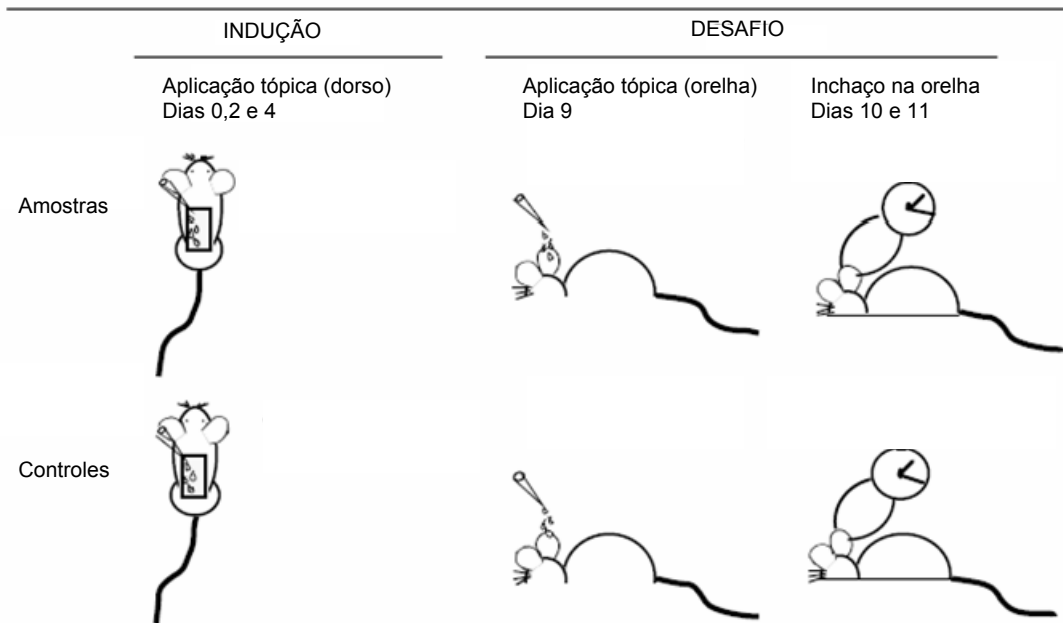


Figura 6.1. Representação esquemática do teste de medida de edema de orelha.

### 6.2.2.7 Análise estatística

Os resultados do experimento de fotoestabilidade foram avaliados através de teste “t” de Student, considerando-se um nível de significância de 0,05. Os testes foram realizados utilizando-se o programa SigmaStat 3.5.

### 6.2.2.8 Descarte de resíduos

Todos os resíduos químicos gerados durante a preparação e caracterização de nanocápsulas, foram segregados, acondicionados e identificados segundo normas do Plano de Gerenciamento de Resíduos implementado pela Resolução COSAT 01/07, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.





### **6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---



---

### **6.3.1 Análise da presença de nanocápsulas poliméricas incorporadas no hidrogel através de MEV**

A presença de nanocápsulas poliméricas contendo BZ3 incorporadas em um hidrogel de Carbopol 940<sup>®</sup> foi visualizada através de microscopia eletrônica de varredura. Nas Figuras 6.1 (a e b) pode-se observar a superfície cutânea (estrato córneo) sem a aplicação de qualquer formulação. Nas Figuras 6.1-c e 6.1-d observa-se a formulação HGBr, nestas imagens visualiza-se a rede polimérica característica da formulação de hidrogel à base de polímero de ácido acrílico.

Nas Figuras 6.2-e e 6.2-f a formulação aplicada sobre a superfície da pele é a HGNCBZ3, que contém nanocápsulas de BZ3. Visualiza-se no maior aumento (10.000 X) pequenas estruturas esféricas inseridas a rede polimérica (própria da formulação de hidrogel), correspondendo às nanocápsulas poliméricas contendo BZ3. O tamanho médio das estruturas esféricas observadas são inferiores ao diâmetro médio obtido nas nanocápsulas de BZ3, provavelmente devido a utilização de acetona no preparo das amostras submetidas a MEV.

Estas mesmas estruturas esféricas não são observadas na Figura 6.2-d, que não contém nanocápsulas. Nesta, somente é observada a rede polimérica característica da formulação. Comparando-se a Figura 6.2-c com a 6.2-e, pode-se observar que o filme polimérico formado no gel que apresenta nanocápsulas (e) é mais denso que aquele formado pelo gel sem nanocápsulas (c), característica esta, provavelmente, devida à presença de estruturas nanométricas.

Em estudo desenvolvido por Lboutonne e colaboradores em 2002, nanocápsulas poliméricas de clorexidina foram desenvolvidas e incorporadas em um hidrogel, a presença das nanoestruturas foi observada através de MEV e, similarmente as imagens apresentadas a seguir, as nanocápsulas poliméricas foram observadas inseridas na rede polimérica do hidrogel.

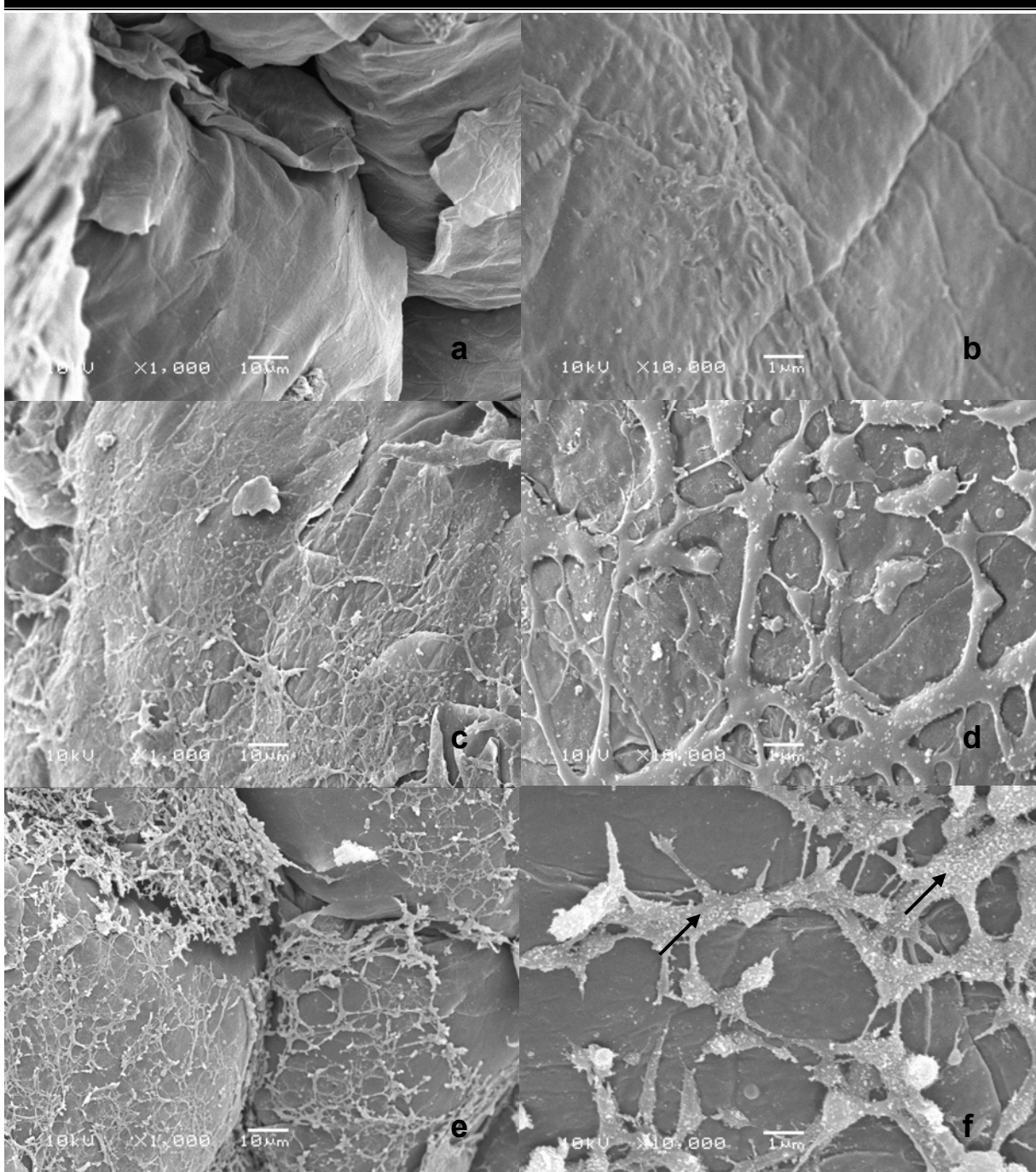


Figura 6.2. Fotomicrografias, obtidas por MEV, da superfície cutânea contendo HGNCBZ3 e HGBr (a: superfície cutânea, 1.000 X; b: superfície cutânea, 10.000 X; c: superfície cutânea com HGBr, 1.000 X; d: superfície cutânea com HGBr, 10.000 X; e: superfície cutânea com HGNCBZ3, 1.000 X; f: superfície cutânea com HGNCBZ3, 10.000 X).

### 6.3.2 Avaliação da fotoestabilidade da BZ3 nanoencapsulada e livre

Em todos os tempos avaliados os comprimentos de onda de máxima absorção não foram deslocados. Avaliando-se as áreas sob a curva das amostras irradiadas (Figura 6.3) observa-se que as áreas sob as curvas da BZ3 livre (HGBZ3) diminuiu de 100 para 62 % após 13 horas de exposição à radiação UVA. Por outro lado, as áreas sob as curvas da BZ3 nanoencapsulada (HGNCBZ3) manteve-se constante (100 %) após o mesmo tempo de análise. Os valores das áreas sob as curvas da BZ3 a partir dos filmes irradiados por radiação UVA após 1 e 13 horas foram avaliados pelo teste “t”. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre HGNCBZ3 e HGBZ3 foram observadas para as áreas sob as curvas em ambos os tempos, 1 e 13 horas, indicando que o processo de nanoencapsulação foi efetivo em aumentar a fotoproteção causada pela formulação de hidrogel contendo nanocápsulas de BZ3 já nas primeiras horas de experimento.

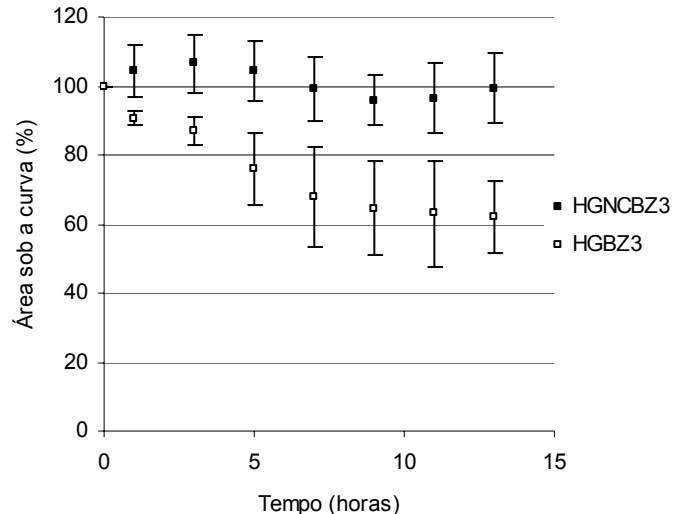


Figura 6.3. Áreas sob as curvas da BZ3 (%) obtida através da varredura das amostras no espectro do UV (n=3).

Avaliando-se quantitativamente, através de CLAE, a taxa de recuperação de BZ3 a partir da concentração inicial da mesma (Figura 6.4) observa-se que, após 13 horas de irradiação a recuperação da BZ3 livre diminuiu de 100 para 29 % e do ativo nanoencapsulado para 56 %. A diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre

estes resultados comprova que a fotoestabilidade da BZ3 foi aumentada devido à nanoencapsulação. As análises cromatográficas e espectrofotométricas dos filmes de HGNCBZ3 apresentaram resultados percentuais diferentes, pois a última técnica demonstra os efeitos combinados do espalhamento das nanocápsulas e da fotoproteção da BZ3 devido à nanoencapsulação.

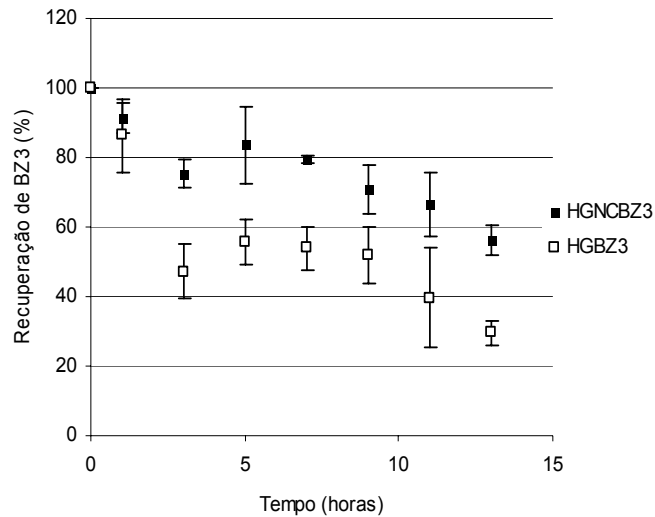


Figura 6.4. Recuperação da BZ3 (%) avaliada através da concentração de BZ3 (n=3).

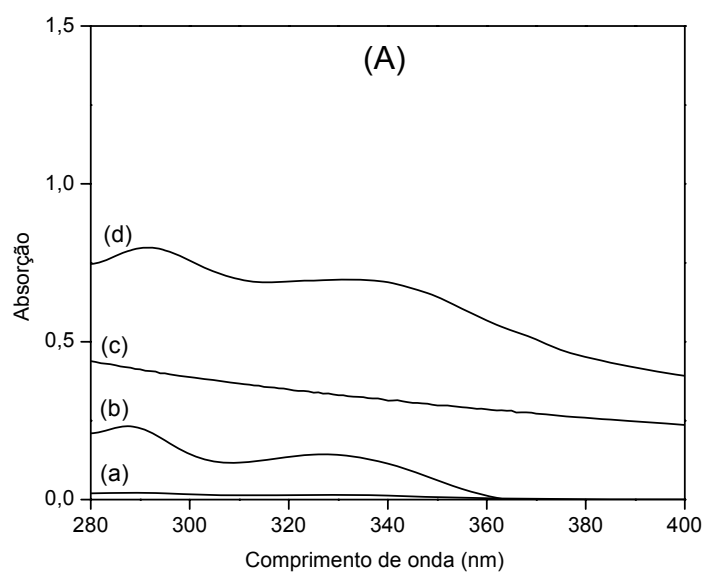
### 6.3.3 Avaliação da capacidade absorptiva da radiação UV pelas formulações HGNCBZ3, HGBZ3 e HGNCBr.

Nas Figuras 6.5 (A e B) pode-se observar a absorção obtida através da varredura das amostras no espectro de UV. Os valores de intensidade de absorção da amostra TCCBZ3 (0,232 em 289 nm e 0,141 em 327 nm) (Figura 6.5-Ab) foram mais altos que os observados para a amostra HGBZ3 (0,021 em 289 nm e 0,015 em 327 nm) (Figura 6.5-Aa, Ba). Os valores mais elevados observados na amostra TCCBZ3 em comparação aos observados na amostra HGBZ3 ocorrem devido a BZ3 apresentar-se totalmente dissolvida na primeira amostra e dispersa como agregados em micelas de polissorbato 80 no hidrogel. O comportamento absorptivo apresentado

pela amostra HGNCBr foi similar ao comportamento descrito anteriormente para nanopartículas lipídicas sólidas (WISSING; MÜLLER, 2002b).

O hidrogel contendo nanocápsulas de BZ3 (HGNCBZ3) apresentou dois picos de absorção, 289 e 327 nm, similarmente às amostras contendo o ativo na forma livre (TCCBZ3 e HGBZ3). A Figura 6.5-Ba apresenta a varredura da amostra HGBZ3, demonstrando os dois comprimentos de onda de absorção máxima da BZ3, que não podem ser observados na Figura 6.5-Aa devido à escala do gráfico.

As varreduras realizadas na amostra HGNCBZ3 apresentaram valores de absorção (0,810 em 289 nm e 0,705 em 327 nm) (Figura 6.5-Ad) superiores aos observados na amostra HGNCBr (0,410 em 289 nm e 0,342 em 327 nm) (Figura 6.5-Ac). Assim, pode-se concluir que a absorção visualizada na varredura do hidrogel contendo nanocápsulas sem o filtro solar foi, na verdade, resultado do espalhamento de luz causado pelo tamanho nanométrico das estruturas contidas no hidrogel, enquanto que o hidrogel com nanocápsulas contendo BZ3 apresentou um efeito sinérgico causado simultaneamente pelo espalhamento de luz e pela absorção da BZ3. Semelhantemente, Wissing e Müller (2002b) observaram este efeito sinérgico em nanopartículas lipídicas sólidas contendo MCO. Os resultados demonstram que nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) aumentam a fotoestabilidade e a eficácia da BZ3 comparada com o filtro não encapsulado.





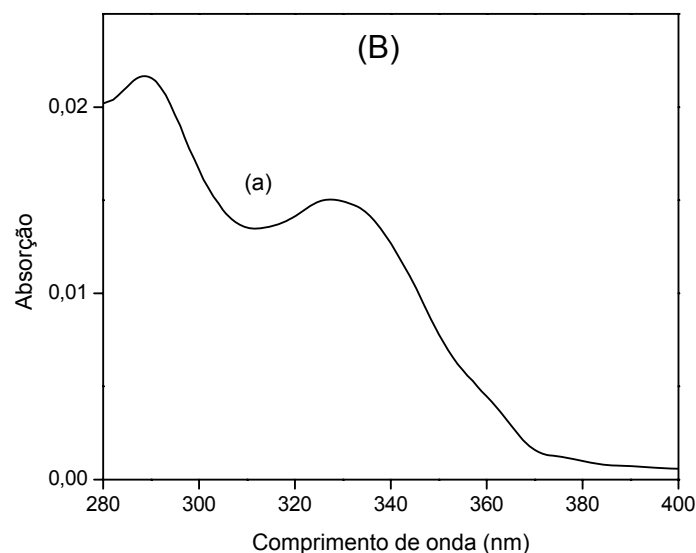


Figura 6.5. Varredura do HGBZ3 (Aa, Ba), TCCBZ3 (Ab), HGNCBr (Ac), HGNCBZ3 (Ad). Todas as amostras contêm a mesma concentração de BZ3 (0.375 % p/p) (n=3).

### 6.3.4 Determinação da alergenicidade da BZ3 nanoencapsulada e livre

#### 6.3.4.1 Teste de alergenicidade por ensaio do linfonodo local (*local lymph node assay* – LLNA)

O teste LLNA é utilizado como ensaio na detecção de resposta imunológica aguda, já o teste MEST detecta resposta crônica. Os índices de sensibilização produzidos no teste de LLNA apresentaram-se abaixo de 3 (Figura 6.6) para todas as formulações estudadas, podendo-se concluir, então, que a aplicação tópica de 3 doses de 87  $\mu\text{g}$  de BZ3 nanoencapsulada ou livre não produziu sensibilização cutânea em camundongos. O controle positivo apresentou índice de sensibilização igual a 10, indicando que o teste apresenta sensibilidade na obtenção de resultados positivos.

A ausência de sensibilização cutânea, no caso do uso de BZ3, provavelmente é devida a baixa concentração de ativo utilizada. Em estudo de alergenicidade

desenvolvido por Kiec-Swierczynska e colaboradores (2005) a concentração de BZ3 nas formulações foi superior (1 a 3 %) àquela utilizada neste estudo (0,375 %).

É importante ressaltar que a formulação contendo nanocápsulas brancas também não produziu sensibilização. Esse resultado é de fundamental importância, pois indica o potencial uso de nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) para administração cutânea, tanto cosmética quanto dermatológica.

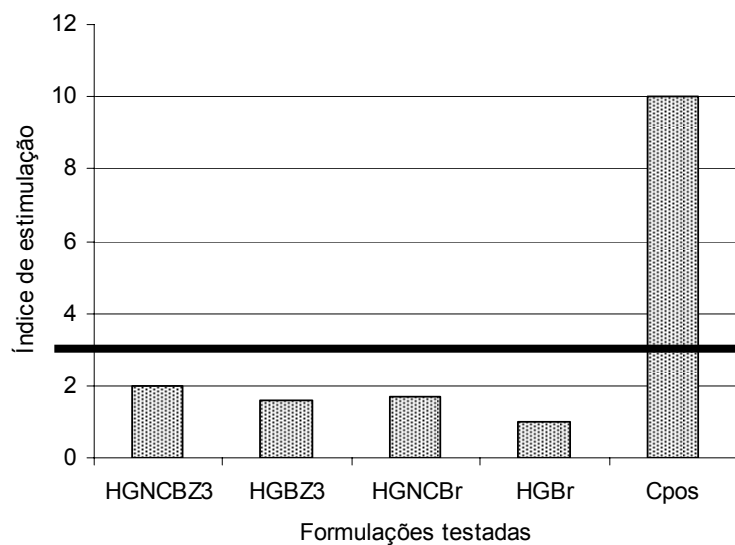


Figura 6.6. Índices de estimulação obtidos através do LLNA para as diferentes formulações testadas.

Os resultados referentes ao número de desintegrações por minuto são apresentados na Figura 6.7. O controle positivo apresentou número de desintegrações por minuto significativamente superior às demais amostras. A formulação HGBr que não contém nem BZ3 nem nanocápsulas, foi empregada como controle negativo e apresentou número de desintegrações por minuto semelhante às formulações contendo o filtro solar e/ou as nanocápsulas poliméricas (HGNCBZ3, HGBZ3 e HGNCBr), indicando que as formulações testadas não causaram sensibilização cutânea.

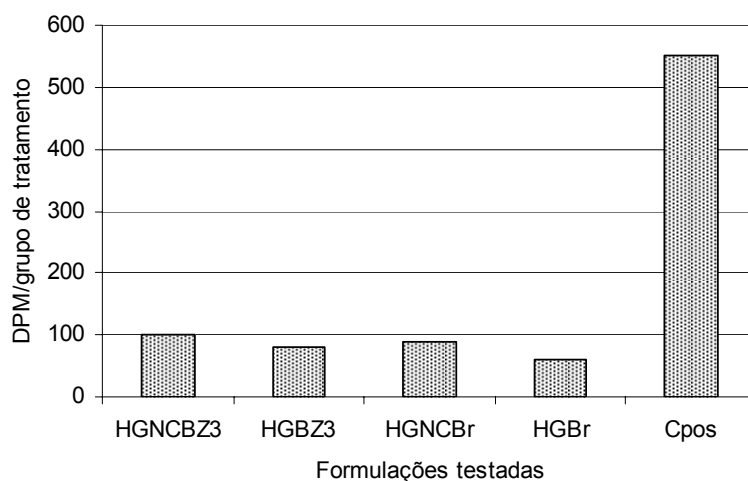


Figura 6.7. DPM/grupo de tratamento obtidos através do LLNA para as diferentes formulações testadas.

#### 6.3.4.2 Teste de medida de edema de orelha (*mouse ear swelling test* - MEST)

De acordo com a literatura, a substância utilizada como controle positivo, a oxazolona (0,3 %), promove um aumento de 30 % da espessura da orelha em relação à medida antes do desafio (KATO *et al.*, 2002). Na Tabela 6.1 observa-se que a percentagem de edema de orelha para o controle positivo foi de 129 % e 133 %, sendo destes, 100 % a espessura da orelha antes da fase do desafio e as percentagens de 29 % e 33 % resultantes do edema causado pela oxazolona, corroborando com dados da literatura.

Todas as formulações estudadas, bem como o controle negativo apresentaram uma percentagem do edema de orelha de camundongo entre 91 e 103 %. Por produzirem uma percentagem do edema da orelha menor que 10 %, ou seja, menor que 110 %, no teste de medida de edema de orelha (MEST) (ROBINSON *et al.*, 1995) (Tabela 6.1), pode-se concluir que a aplicação tópica de 3 doses de 87  $\mu$ g de BZ3 nanoencapsulada ou livre não produziu sensibilização cutânea em camundongos.

Novamente ressalta-se a importância das nanocápsulas brancas não desencadearem sensibilização cutânea, indicando a potencialidade deste veículo para administração tópica.

Tabela 6.1. Percentagem do edema de orelha obtido por MEST, para as diferentes formulações estudadas.

Formulação	% do edema (24 horas)	% do edema (48 horas)
<b>HGNCBZ3</b>	99 ± 6	97 ± 4
<b>HGBZ3</b>	92 ± 6	95 ± 4
<b>HGNCBr</b>	103 ± 5	102 ± 6
<b>HGBr</b>	93 ± 7	97 ± 7
<b>Controle positivo (oxazolona 0,3 %)</b>	129 ± 10	133 ± 13
<b>Controle negativo (acetona:óleo de oliva 4:1)</b>	92 ± 6	91 ± 6



## ***7 CONCLUSÕES***

---



As suspensões de nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) contendo concentrações crescentes de BZ3 preparadas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado apresentaram diâmetros de partícula inferiores a 300 nm, índices de polidispersão abaixo de 0,23 e teores totais e taxas de associação próximos a 100 %.

As suspensões coloidais contendo elevadas concentrações de BZ3 (10, 15 e 25 mg/mL) apresentaram tendência a sedimentação quando avaliadas através de Turbiscan *LAB*<sup>®</sup>.

As suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo concentrações crescentes de BZ3 se mantiveram estáveis quanto ao diâmetro médio, polidispersão, potencial zeta e teor durante 90 dias, armazenadas ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Os valores de pH diminuíram de 6,5 para 4,5, provavelmente devido a hidrólise parcial do polímero empregado no preparo das nanocápsulas.

Foi possível desenvolver três diferentes formulações semi-sólidas para uso tópico contendo nanocápsulas poliméricas de BZ3. Uma emulsão água em silicone, um creme-gel e um hidrogel.

As formulações semi-sólidas desenvolvidas apresentaram comportamento reológico não-newtoniano pseudoplástico descrito pelo modelo de Ostwald, este comportamento não foi modificado pela adição de nanocápsulas às formulações.

As análises através de Turbiscan *LAB*<sup>®</sup> demonstraram que as formulações semi-sólidas estudadas não apresentaram tendência a desestabilização.

Os valores de consistência das formulações CGNCBZ3, CGBZ3, SNCBZ3 e SBZ3, que continham tween 80, foram inferiores aos valores de consistência das formulações CGBr e SBr, que não continham esse tensoativo. A hipótese de que a presença do tween 80 diminui os valores de consistência foi confirmada através da diminuição dos valores de consistência das formulações CGTween80 e STween80, que continham somente o tensoativo sem o filtro solar, quando comparadas as formulações brancas (CGBr e SBr).

As formulações semi-sólidas contendo nanocápsulas de BZ3 apresentaram maior quantidade de ativo no estrato córneo durante o período de análise (8 horas)



quando comparadas às formulações contendo o ativo livre, confirmando o efeito reservatório que as nanocápsulas propiciam, aumentando o tempo de resistência do filtro solar nas camadas mais superficiais da pele.

A formulação SNCBZ3 apresentou maior quantidade de BZ3 no estrato córneo quando comparada ao HGNCBZ3 e ao CGNCBZ3, além de maior tempo de resistência. Este resultado é devido, provavelmente, a difusão mais lenta da BZ3 na fase externa da emulsão água em silicone.

Avaliando-se a fotoestabilidade da BZ3 nanoencapsulada e livre, incorporada em hidrogel de Carbopol 940<sup>®</sup>, frente à exposição à radiação UVA, conclui-se que a nanoencapsulação da BZ3 aumentou a fotoestabilidade do filtro químico quando comparada a forma livre.

A BZ3 nanoencapsulada e livre incorporada em hidrogel de Carbopol 940<sup>®</sup> não apresentou sensibilização cutânea nos testes de LLNA (resposta aguda) e MEST (resposta crônica). O hidrogel contendo nanocápsulas sem ativo também não apresentou sensibilização cutânea, podendo-se concluir que nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) não desencadeiam resposta alérgica.

A avaliação do conjunto dos resultados obtidos demonstra que estas formulações semi-sólidas contendo suspensões de nanocápsulas poliméricas com a presença de BZ3 em seu núcleo oleoso são sistemas promissores para a aplicação cutânea de filtros solares.

## **8 REFERÊNCIAS**

---



ALMEIDA, I. F.; BAHIA, M. F. Reologia: Interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. **Cosmetics & Toiletries**, v. 15, p. 97-100, 2003.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; BARRÉ, G.; GUY, R. H.; FESSI, H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agente: preparation and photoprotection. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 191-195, 2001.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 53-62, 2004.

ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**, v. 60, p. 63-67, 2005.

ALVES, M. P. **Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea *in vitro***. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2006.

ALVES, M. P., SCARRONE, A. L., SANTOS, M., POHLMANN, A. R., GUTERRES, S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215-220, 2007.

ANDERSE, K. E.; FRANKILD, S. Allergic contact dermatitis. **Clinics in Dermatology**, v. 15, p. 645-654, 1997.

ASBILL, C. S.; MICHNIAK, B. B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity, **PSTT**, v. 3, n. 1, p. 36-41, 2000.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmcêuticas**, 2 ed. Porto Alegre: Artmed, cap. 4, p. 56-73, 2005.

BASKETTER, D. A.; SELBIE, E.; SCHOLLES, E. W.; LEES, D.; KIMBER, I.; BOTHAM, P. A. Results with OECD recommended positive control sensitizers in the maximization, Buehler and local lymph node assays. **Food and Chemical Toxicology**, v. 31, n. 1, p. 63-67, 1993. (Abstract).

BRASIL, Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 02/06/2003.

CASTAING, J.C.; ALLAINZ, C.; AUROY, P.; AUVRAY, L. Rheology of nanosized hairy grain suspensions. **The European Physical Journal B**, v. 10, p. 61-70, 1999.

CALVO, P.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules and nanoemulsions, as ocular drug carrier. **Journal of Pharmaceutics Science**, v. 85, p. 530-536, 1996.

CEVC, G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 675-711, 2004.

CHISVERT, A.; SALVADOR, A.; PASCUAL-MARTÍ, M. C. Simultaneous determination of oxybenzone and 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate in sunscreen formulations by flow injection-isodifferential derivative ultraviolet spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 428, p. 183-190, 2001.

CORRÊA, N. M.; CAMARGO-JÚNIOR, F. B.; IGNÁCIO, R. F.; LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 73-78, 2005.

COUVREY, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsules technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.

CRUZ, L.; SOARES, L. U.; DALLA-COSTA, T.; MEZZALANA, G.; DA SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, p. 198-205, 2006.

DAOUD-MAHAMMED, S.; COUVREUR, P.; GREF, R. Novel self-assembling nanogels : Stability and lyophilisation studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 332, p. 185-191, 2007.

DOLZ, M.; HERRÁEZ, M.; GONZÁLEZ, F.; DÍEZ, O.; DELEGIDO, J.; HERNÁNDEZ, M. J. Flow behaviour of Carbopol-940<sup>®</sup> hydrogels. The influence of concentration and agitation time. **Pharmazie**, v. 53, p. 126-130, 1998.

ESPÓSITO, E.; CORTESI, R.; DRECHSLER, M.; PACCAMICCIO, L.; MARIANI, P.; CONTADO, C.; STELLIN, E.; MENEGATTI, E.; BONINA, F.; PUGLIA, C. Cubosome dispersions as delivery systems for percutaneous administration of indomethacin. **Pharmaceutical Research**, v. 22, p. 2163-2173, 2005

FERNANDEZ, C.; MARTI-MESTRES, G.; RAMOS, J.; MAILLOLS, H. LC analysis of benzophenone-3: II application to determination of 'in vitro' and 'in vivo' skin penetration from solvents, coarse and submicron emulsions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 155-165, 2000.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, R1-R4, 1989.

FLOR, J.; DAVOLOS, M.R.; CORREA, M.A. Protetores Solares. **Química Nova**. v. 30, n. 1, p.153-158, 2007.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **PSTT**, v.3, n. 12, p. 417-425, 2000.

FRANZ, T J. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 64, n. 3, p. 190-195, 1975.

FRONZA, T.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. ; TEIXEIRA, H. **Nanocosméticos: Em direção ao estabelecimento de marcos regulatórios**, 1 ed. Porto Alegre: Gráfica da UFRGS, 2007.

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, p. 35-44, 2003.

GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Evaluation of the photostability of different UV filter combinations in a sunscreen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, p. 123-128, 2006.

GONZALEZ, H. ; FARBROT, A. ; LARKÖ, O. Percutaneous absorption of benzophenone-3, a common component of topical sunscreens. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 27, p. 691-694, 2002.

GONZALEZ, H.; FARBROT, A.; LARKÖ, O.; WENNERG, A-M. Percutaneous absorption of the sunscreen benzophenone-3 after repeated whole-body applications, with and without ultraviolet irradiation. **Photobiology**, v. 154, p. 337-340, 2006.

GOOSEN, C.; LAING, T. J.; DU PLESSIS, J.; GOOSEN, T. C.; LU, G-W.; FLYNN, G. L. Percutaneous delivery of thalidomide and its *N*-alkyl analogs. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 4, p. 434-439, 2002.

GUINEBRETIERE, S. ; BRIANON, S. ; FESSI, H. ; TEODORESCU, V. S. ; BLANCHIN, M. G. Nanocapsules of biodegradable polymers : preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy. **Materials Science & Engineering C**, v. 21, p. 137-142, 2002.

GUPTA, V. K. ; ZATZ, J. L. ; REREK, M. Percutaneous absorption of sunscreens through micro-yucatan pig skin *in vitro*. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 10, p. 1602-1607, 1999.

GUTERRES, S. S. **Etude pharmacotechnique, pharmacocinetique et de tolerances digestive et tissulaire des nanocapsules de diclofenac**. Paris: Faculé de Pharmacie de Chatenay-Malabry, 1995. Tese (Doutorado em Farmácia).

GUTERRES, S. S.; WEISS, V.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Influence of benzyl benzoate as oil core on the physicochemical properties of spray-dried

powders from polymeric nanocapsules containing indomethacin. **Drug Delivery**, v. 7. p. 195-199, 2000.

GUTERRES, S. S. A fotoproteção da pele. In: SCHENKEL, E. P.; MENGUE, S. S.; PETROVICK, P. R. (Org). **Cuidados com os medicamentos**, 4 ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, p. 183-190, 2004.

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

HORN, H. M.; HUMPHREYS, F.; ALDRIDGE, R. D. Contact dermatitis and prolonged protosensitivity induced by ketoprofen and associated with sensitivity to benzophenone-3. **Contact Dermatitis**, v. 38, p. 353-354, 1998.

HUONG, S. P.; ANDRIEU, V.; REYNIER, J. P.; ROCHER, E. ; FOURNERON, J. D. The photoisomerization of the sunscreen ethylhexyl *p*-methoxy cinnamate and its influence on the sun protection factor. **Journal of Photochemical and Photobiology**, v. 186, p. 65–70, 2007.

ICH Harmonized tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Metodology. United States of America, 1996.

JALÓN, E. G.; BLANCO-PRÍETO, M. J.; YGARTUA, P.; SANTOYO, S. PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 226, p. 181-184, 2001.

JENNING, V.; SHÄFER-KORTING, M.; GOHLA, S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. **Journal of Controlled Release**, v. 66, p. 115-126, 2000.

JIMÉNEZ, M. M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M. F.; MARTINI, M. C. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 272, p. 45-55, 2004.



JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 9 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, cap. 18, p. 303-314, 1999.

KANG, L.; POH, A. L.; FAN, S. K.; HO, P. C.; CHAN, Y. W.; CHAN, S. Y. Reversible effects of permeation enhancers on human skin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 57-63, 2002.

KATO, H.; HAYASHI, M.; FUKUMORI, Y.; KANEKO, H. MHC restriction in contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1713-1718, 2002.

KIEC-SWIERCZYNSKA, M.; KRECISZ, B.; SWIERCZYNSKA-MACHURA, D. Photoallergic and allergic reaction to 2-hidroxy-4-methoxybenzophenone (sunscreen) and allergy to cetyl alcohol in cosmetic. **Contact Dermatitis**, v. 53, p. 170-171, 2005.

KIM, J.; SONG, J.; Lee, E.; PARK, S. Rheological properties and microstructures of Carbopol gel network system. *Colloid and Polymer Science*. **Colloid and Polymer Science**, v. 281, p. 614-623, 2003.

KIMBER, I.; DEARMAN, R. J.; SCHOLE, E. W.; BASKETTER, D. A. The local lymph node assay: developments and applications. **Toxicology**, v. 93, n. 1, p. 13-31, 2004. (*Abstract*).

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**, Lisboa: Fundação Galauste Gulbenkian, 2001.

LAUTENSCHLAGER, S.; WULF, H. C.; PITTELKOW, M. R. Photoprotection. **The Lancet**, publicado online em 3 de maio de 2007.

LBOUTOUNNE, H.; CHAULET, J.; PLOTON, C.; FALSON, F.; PIROT, F. Sustained *ex vivo* skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. **Journal of Controlled Release**, v. 82, p. 319-334, 2002.

LEMARCHAND, C.; COUVREUR, P.; VAUTHIER, C.; COSTANTINI, D.; GREF, R. Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, p. 77-82, 2003.

LIU, J.; HU, W.; CHEN, H.; NI, Q.; XU, H.; YANG, X. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 191-195, 2007.

LUENGO, J.; WEISS, B.; SCHNEIDER, M.; EHLERS, A.; STRACKE, F.; KÖNIG, K.; KOSTKA, K. H.; LEHR, C. M.; SCHAEFER, U. F. Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid, **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, p. 190-197, 2006.

LUPPI, B.; CERCHIARA, T.; BIGUCCI, F.; BASILE, R. ; ZECCHI, V. Polymeric nanoparticles composed of fatty acids and polyvinylalcohol for topical application of sunscreens. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 407-411, 2003.

MAGENHEIM, B.; BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **S. T. P. Pharma Sciences**, v. 1, n. 4, p. 221-241, 1991.

MAIER, H.; SCHAUBERGER, G.; BRUNNHOFER, K.; HÖNIGSMANN, H. Change of Ultraviolet Absorbance of Sunscreens by Exposure to Solar-Simulated Radiation. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.117, n. 2, p. 256-262, 2001.

MAIER, T.; KORTING, H. C. Sunscreens – wich ou what for? **Skin Pharmacology and Pysiology**, v. 18, p. 253-262, 2005.

MAIER, H.; SCHAUBERGER, G.; MARTINCIGH, B.S.; BRUNNHOFER, K.; HÖNIGSMANN, H. Ultraviolet protective performance of photoprotective lipsticks: change of spectral transmittance because of ultraviolet exposure. **Photodermatology photoimmunology & photomedicine**, v. 21, p. 84-92, 2005.

MARTIN, A.; WARBRICK, J.; CAMMARATA, A. **Rheology in Physical Pharmacy**. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

MARTINDALE, **The complete drug reference**. 32 ed. London: Pharmaceutical Press, p. 1486-1487, 1999.

MENGUAL, O.; MEUNIER, G.; CAYRE, I.; PUECH, K.; SNABRE, P. Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: the TURBISCAN MA 1000. **Colloids and Surfaces A**, v. 152, p. 111-123, 1999.

MILÃO, D. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação biológica de formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas de diclofenaco**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2001.

MÜLLER-GOYMAN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics Biopharmaceutics**, v. 58, p. 343-346, 2004.

NETZ, P. A.; ORTEGA, G. G.; Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 236-246, 2002.

OLVERA-MATÍNEZ, B.; CÁZARES-DELGADILLO, J.; CALDERILLA-FAJARDO, S.; VILLALOBO-GARCÍA, R.; GANEM-QUINTANAR, A.; QUINTANAR-GUERRERO, D. Preparation of polymeric nanocapsules containing octyl methoxycinnamate by the emulsification-diffusion technique: penetration across the stratum corneum. **Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 94, n. 7, p. 1552-1559, 2005.

OKEREKE, C. S.; BARAT, S. A.; ABDEL-RAHMAN, M. S. Safety evaluation of benzophenone-3 after dermal administration in rats. **Toxicology Letters**, v. 80, p. 61-67, 1995.

PERUGINI, P.; SIMEONI, S.; SCALIA, S.; GENTA, I.; MODENA, T.; CONTI, B.; PAVANETTO, F. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-*p*-methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 246, p. 37-45, 2002.

POTARD, G.; LAUGEL, C.; BAILLET, A.; SCHAEFER, H.; MARTY, J.-P. Quantitative HPLC analysis of sunscreens and caffeine during in vitro percutaneous penetration studies. **Internacional Journal of Pharmaceutis**, v. 189, p. 249-260, 1999.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMAN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. **Pharmaceutical Research**, v. 15(7), p.1056-1062, 1998.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia Aplicada a Dermoestética**, 1 ed. São Paulo: Pharmabooks, p. 77-115, 2006.

ROBINSON, M. K.; CRUZE, C. A. Preclinical skin sensitization testing of antihistamines: guinea pig and local lymph node assay responses. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, p. 495-506, 1996.

SARTORELLI, P.; ANDERSEN, H. R.; ANGERER, J.; CORISH, J.; DREXLER, H.; GÖEN, T.; GRIFFIN, P.; HOTCHKISS, S. A. M.; LARESE, F.; MONTOMOLI, L.; PERKINS, J.; SCHMELZ, M.; VAN DE SANDT, J.; WILLIAMS, F. Percutaneous penetration studies for risk assessment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 8, p. 133-152, 2000.

SARVEIYA, V.; RISK, S.; BENSON, H. A. E. Liquid chromatographic assay for common sunscreen agents: application to in vivo assessment of skin penetration and systemic absorption in human volunteers. **Journal of Chromatography B**, v. 803, p. 225-231, 2004.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; SIQUEIRA, I. R.; BADEJO, A. S.; JORNADA, D. S.; POHLMANN, A. R.; NETTO, C. A.; GUTERRES, S. S. Incorporation in polymeric nanocapsules improves the antioxidant effect of melatonin against lipid peroxidation in mice brain and liver. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutis**. *In press*. Doi: 10.1016/j.ejpb.2007.11.010, 2007.

SCHULZ, J.; HOHENBERG, H.; PFLÜCKER, F.; GÄRTNER, E.; WILL, T.; PFEIFFER, S.; WEPF, R.; WENDEL, V.; GERS-BARLAG, H.; WITTERN, K. –P. Distribution of sunscreens on skin. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54 (1), p. 157-163, 2002.

SERPONE, N.; SALINARO, A.; EMELINE, A.V.; HORIKOSHI, S.; HIDAKA, H.; ZHAO, J. An *in vitro* systematic spectroscopic examination of the photostabilities of a random set of commercial sunscreen lotions and their *chemical* UVB/UVA active agents. **Photochemical and Photobiological Science**, v.1, p. 970–981, 2002.

SHIM, J.; KANG, H. S.; PARK, W-S.; HAN, S-S.; KIM, J.; CHANG, I-S. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 97, p. 477-484, 2004.

SIMEONI, S.; SCALIA, S.; TURSILLI, R.; BENSON, H. Influence of cyclodextrin complexation on the *in vitro* human skin penetration and retention of the sunscreen agent, oxybenzone. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 54, p. 275-282, 2006.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

SZNITOWSKA, M.; JANICKI, S.; BACZEK, A. Studies on the effect of pH on the lipoidal route of penetration across stratum corneum. **Journal of Controlled Release**, v. 76, p. 327-335, 2001.

VENTER, J. P.; MÜLLER, D. G.; PLESSIS, J.; GOOSEN, C. A comparative study of *in situ* adapted diffusion cell and *in vitro* Franz diffusion cell method for transdermal absorption of doxylamine. **European Journal of Pharmaceutics Science**, v. 13, p. 169-177, 2001.

VERMA, D. D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 258, (1-2), p. 141-151, 2003.

VIGLIOGLIA, P. A.; RUBIN, J. **Cosmiatria Fundamentos Científicos y Técnicos**. Buenos Aires: Ediciones de Cosmiatria, 1979.

WEISS, V. **Avaliação Tecnológica de Suspensões e Nebulizados de Nanocápsulas e Nanoesferas contendo Indometacina**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2001.

WEISS-ANGELI, V. **Desenvolvimento e caracterização de formulações fotoprotetoras contendo nanocápsulas**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2007.

WEISS-ANGELI, V., POLETTO, F.S., ZANCAN, L.R., BALDASSO, F., POHLMANN, A.R., GUTERRES, S.S. Nanocapsules of octyl methoxycinnamate containing quercetin delayed the photodegradation of both components under ultraviolet A radiation. **Journal of Biomedich Nanotechnology**. *In press*. Doi: 10.1166/jbn.2008.004, 2007.

WILKINSON, J. B.; MOORE, R. J. **Harry's Cosmetology**. 7 ed. New York: Chemical Publishing, cap. 15, p. 222-258, 1982.

WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. **Journal of Controlled Release**, v. 81, p. 225-233, 2002a.

WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H. The development of an improved carrier system for sunscreen formulations based on crystalline lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 242, p. 373-375, 2002b.

WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H. Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 254, p. 65-68, 2003.

WOOLFSON, A. D.; MALCOLM, R. K.; CAMPBELL, K.; JONES, D. S.; RUSSELL, J. A. Rheological, mechanical and membrane penetration properties of novel dual drug

systems for percutaneous delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 67, p. 395-408, 2000.

YESUDIAN, P. D. Severe contact urticaria and anaphylaxis from benzophenone-3 (2-hydroxy 4-methoxy benzophenone). **Contact Dermatitis**, v. 46. p. 55-56, 2002.

YENER, G.; INCEGUL, T.; YENER, N. Importance of using solid lipid microspheres as carriers for UV filters on the example octyl methoxy cinnamate. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 258, p. 203-207, 2003.







## **9.1 ANEXO 1**

---

**Validação do método analítico para o doseamento de benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas**



Uma validação tem como objetivo demonstrar que o método analítico desenvolvido é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003).

Um método analítico linear indica que o mesmo tem a capacidade de demonstrar que os resultados obtidos experimentalmente são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003). A quantificação da BZ3, a partir de nanocápsulas poliméricas, foi realizada através de CLAE em cromatógrafo Perkin Elmer Series 200, utilizando-se detector ultravioleta visível 289 nm, coluna LiChrospher 100 RP-18 (5µm, 250 x 4 mm), pré-coluna do mesmo material (5 µm) e fase móvel isocrática de metanol e água em uma proporção 95:5 (v/v), com pH aparente igual à 4,0 e fluxo de 1,0 mL por minuto.

Para a avaliação da linearidade, as seguintes concentrações, a partir de uma mesma solução-mãe (500 µg/mL), foram preparadas: 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30 e 40 µg/mL. Foram determinadas 3 curvas-padrão com estas concentrações em dias consecutivos e, com auxílio do programa Excel, foram determinados o coeficiente de correlação, intersecção com o eixo y, o coeficiente angular.

Segundo a análise da variância (ANOVA), verificou-se regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ( $p < 0,05$ ), observados nos valores de  $F_{\text{calculado}}$  comparados aos valores de  $F_{\text{tabelado}}$  (Tabela 9.1.1).

Tabela 9.1.1. ANOVA da linearidade do método analítico para quantificação da BZ3 a partir de nanocápsulas poliméricas.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Variância	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
Entre	8	$2,574 \cdot 10^{13}$	$3,217 \cdot 10^{12}$	5391,01*	2,51
<i>Regressão linear</i>	1	$2,573 \cdot 10^{13}$	$2,573 \cdot 10^{13}$	70857,12*	4,41
<i>Desvio da linearidade</i>	7	$2,542 \cdot 10^9$	$3,632 \cdot 10^8$	0,60	2,58
Dentro	18	$1,074 \cdot 10^{10}$	$5,968 \cdot 10^8$		
Total	26	$2,575 \cdot 10^{13}$			

\*significativo para  $p < 0,05$ .

A curva-padrão de BZ3 apresentou coeficiente angular igual a 70966, intersecção no eixo y igual a - 13834 e coeficiente de correlação de 0,9999 (Figura 9.1.1), superior a 0,99, que é o valor mínimo preconizado pelos códigos oficiais (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

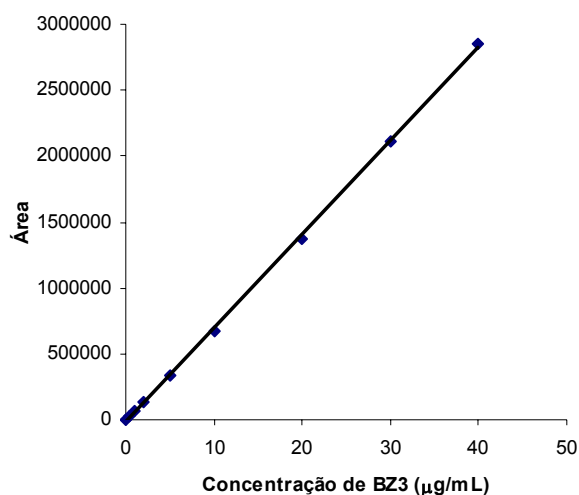


Figura 9.1.1. Curva-padrão para quantificação de BZ3 a partir de nanocápsulas poliméricas.

A precisão de um método analítico indica a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão intra-dia é a concordância dos resultados obtidos em um curto espaço de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação, já a precisão

inter-dia considera a concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes de análise (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

A precisão foi determinada ao nível de repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia). Para isto, 6 soluções-amostra diferentes de 20 µg/mL foram obtidas a partir de nanocápsulas contendo BZ3 e injetadas, em triplicata, durante 3 dias. Foram determinados os desvios-padrão e os coeficientes de variação (CV %) intra-dia e inter-dia.

A avaliação do CV % intra-dia (Tabela 9.1.2) demonstra pequena variação na análise de amostras de mesma concentração num mesmo dia, assim como a determinação do CV % inter-dia (Tabela 9.1.2). Tanto o CV % intra-dia quanto o CV % inter-dia apresentaram valores que não ultrapassam 1 %, sendo inferior ao limite máximo estabelecido pelos códigos oficiais, que é de 5 % (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

Tabela 9.1.2. Avaliação dos coeficientes de variação (CV %) intra e inter-dia do método analítico para o doseamento da BZ3 em nanocápsulas (n=6).

<b>Solução-amostra</b>	<b>Precisão intra-dia (1) (%)</b>	<b>Precisão intra-dia (2) (%)</b>	<b>Precisão intra-dia (3) (%)</b>	<b>Precisão inter-dia (%)</b>
<b>Nanocápsulas contendo BZ3 (20 µg/mL)</b>	0,65	0,73	0,57	0,08

A exatidão de um método analítico indica a proximidade dos resultados obtidos experimentalmente em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003).

Para a determinação da exatidão, a uma solução de 1 µg/mL obtida a partir de uma suspensão de BZ3, foi adicionada uma quantidade conhecida de BZ3, obtendo-se concentrações finais relativas a uma concentração baixa da curva-padrão (2 µg/mL), uma concentração intermediária (10 µg/mL) e uma concentração alta (30 µg/mL). A partir da recuperação do ativo determinou-se a exatidão do método. Os valores de exatidão apresentados na Tabela 9.1.3 demonstram os

valores percentuais recuperados de BZ3 a partir das soluções-amostra, estes valores encontram-se dentro dos intervalos permitidos (ICH, 1996).

Tabela 9.1.3. Avaliação da exatidão do método analítico para o doseamento da BZ3 em nanocápsulas (n=3).

<b>Concentração teórica de BZ3 (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Conc. (<math>\mu\text{g/mL}</math>) <math>\pm</math> DP</b>	<b>Exatidão (%)</b>
<b>2,00</b>	2,02 $\pm$ 0,05	104,31
<b>10,00</b>	9,75 $\pm$ 0,19	96,24
<b>30,00</b>	28,90 $\pm$ 0,16	96,75

O limite de quantificação aceito para este método analítico foi a concentração mais baixa da curva-padrão, 0,1  $\mu\text{g/mL}$ .

Os cromatogramas apresentados na Figura 9.1.2 demonstram a especificidade do método para quantificação de BZ3 a partir de nanocápsulas poliméricas, sem haver interferentes de outros componentes da formulação na quantificação do ativo.

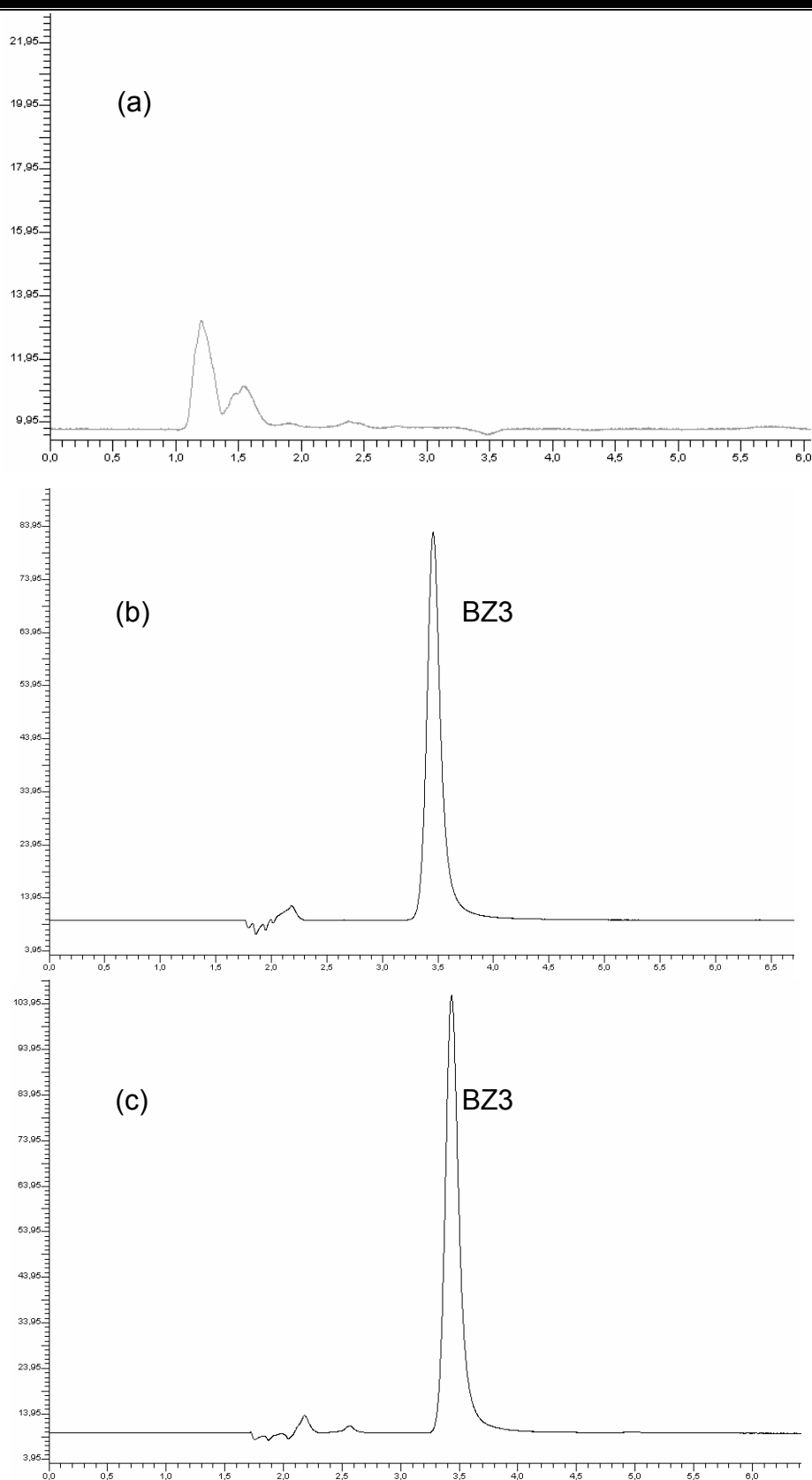


Figura 9.1.2. Cromatogramas de CLAE para o método analítico de doseamento de BZ3 em nanocápsulas (a: nanocápsulas sem ativo; b: amostra da curva padrão na concentração de 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ; c: amostra da suspensão de nanocápsulas contendo 5  $\text{mg/mL}$  de BZ3).





## **9.2 ANEXO 2**

---

**Determinação da especificidade, precisão inter e intra-dia e da exatidão da extração da BZ3 das formulações semi-sólidas**



Com o propósito de avaliar a precisão intra e inter-dia e a exatidão da metodologia empregada para a extração do ativo BZ3, procedeu-se o processo de extração do ativo contido nas formulações semi-sólidas.

Cerca de 200 mg de cada formulação semi-sólida, contendo nanocápsulas de BZ3, foi colocada em erlenmeyer com 10 mL do solvente de extração (Tabela 9.2.1) e mantida sob agitação magnética em banho-maria à 37 °C por 2 horas. Após decorrido o tempo de extração as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e filtradas através de papel filtro para balão volumétrico de 10 mL, tendo seu volume completado com acetonitrila. Uma segunda diluição foi realizada, onde 1 mL da solução extratora filtrada foi transferida para balão volumétrico de 5 mL, e o volume completado com acetonitrila. Em seguida as amostras foram filtradas através de membrana (0,45 µm, Millipore), e analisadas através de CLAE em cromatógrafo Perkin Elmer Series 200, utilizando-se detector ultravioleta visível 289 nm, coluna LiChrospher 100 RP-18 (5µm, 250 x 4 mm), pré-coluna do mesmo material (5 µm) e fase móvel isocrática de metanol e água em uma proporção 95:5 (v/v), com pH aparente igual à 4,0 e fluxo de 1,0 mL por minuto. Este procedimento foi repetido 6 vezes em três dias consecutivos para determinação da precisão inter e intra-dia para cada formulação semi-sólida.

Tabela 9.2.1. Soluções extratoras utilizadas na extração da BZ3 contida nas bases semi-sólidas em estudo.

<b>Formulação</b>	<b>Primeira hora de extração</b>	<b>Segunda hora de extração</b>
<b>Hidrogel</b>	7 mL de água	3 mL de acetonitrila
<b>Creme-gel</b>	7 mL de água	3 mL de acetonitrila
<b>Emulsão água em silicone</b>	10 mL de acetonitrila	-

Para a determinação da exatidão do método preparou-se uma solução-mãe contendo 500 µg/mL de BZ3 em acetonitrila. Após o processo de extração de cada formulação, descrito anteriormente, foram adicionadas concentrações crescentes da solução-mãe de BZ3 nas soluções extrativas, totalizando três concentrações finais distintas para cada formulação semi-sólida, referentes a valores de concentração

baixos, médios e altos da curva de calibração. Em seguida as amostras foram filtradas através de membrana (0,45 µm, Millipore) e analisadas por CLAE como descrito anteriormente. Ao final o valor de exatidão foi determinado através da média dos três valores.

Os resultados de precisão intra e inter-dia, bem como os resultados de exatidão são apresentados nas tabelas 9.2.2 e 9.2.3.

A análise dos resultados de precisão, tanto inter quanto intra-dia (Tabela 9.2.2), demonstram uma adequada repetibilidade do método devido aos baixos valores (inferiores a 5 %) encontrados. A extração da BZ3 de todas as formulações estudadas apresentou valores de precisão dentro do limite aceitável experimentalmente nos códigos oficiais (ICH, 1996; BRASIL, 2003).

Tabela 9.2.2. Valores de precisão intra e inter-dia (CV %) da metodologia de extração de BZ3 contida nas formulações semi-sólidas hidrogel, creme-gel e emulsão água em silicone (n=6).

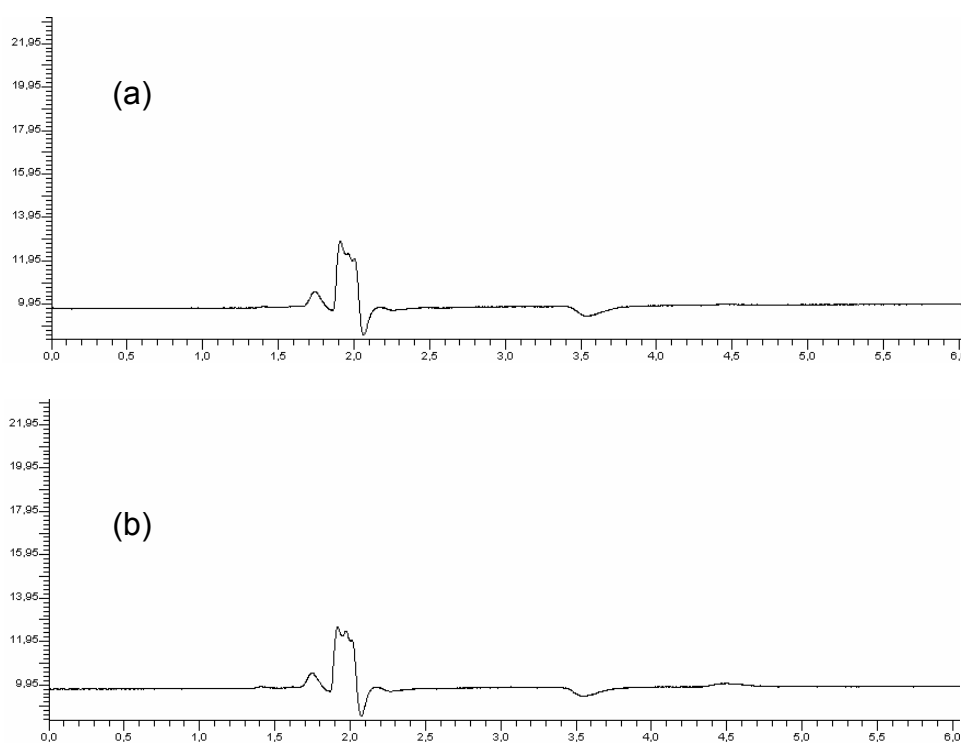
<b>Formulação</b>	<b>Precisão intra-dia (1) (CV%)</b>	<b>Precisão intra-dia (2) (CV%)</b>	<b>Precisão intra-dia (3) (CV %)</b>	<b>Precisão inter-dia (CV %)</b>
<b>HGNBZ3</b>	1,08	1,39	0,61	0,29
<b>CGNBZ3</b>	0,68	0,32	1,14	1,84
<b>SNBZ3</b>	0,82	1,41	1,18	1,16

Quanto à exatidão do método, os valores obtidos, em média, para todas as formulações semi-sólidas, foram superiores à 90 % (Tabela 9.2.3), também demonstrando valores dentro do limite aceitável experimentalmente.

Tabela 9.2.3. Avaliação da exatidão (%) da metodologia de extração de BZ3 contida nas formulações semi-sólidas hidrogel, creme-gel e emulsão água em silicone (n=3).

Concentração teórica de BZ3 (µg/mL)	HGNBZ3	CGNBZ3	SNCBZ3
	Conc. (µg/mL) ± DP Exatidão (%)	Conc. (µg/mL) ± DP Exatidão (%)	Conc. (µg/mL) ± DP Exatidão (%)
2,00	1,91 ± 0,02	1,89 ± 0,10	1,76 ± 0,18
	90,29	86,44	96,53
10,00	9,72 ± 0,21	9,73 ± 0,13	9,98 ± 0,36
	96,16	96,08	95,62
30,00	29,07 ± 0,55	28,87 ± 0,23	29,02 ± 0,30
	96,53	98,79	96,38
<b>Exatidão média (%)</b>	94,33	92,72	93,02

A especificidade do método de quantificação de BZ3 contida nas formulações semi-sólidas é apresentada através dos cromatogramas na Figura 9.2.1. Não há interferentes de outros componentes das formulações na quantificação do ativo.



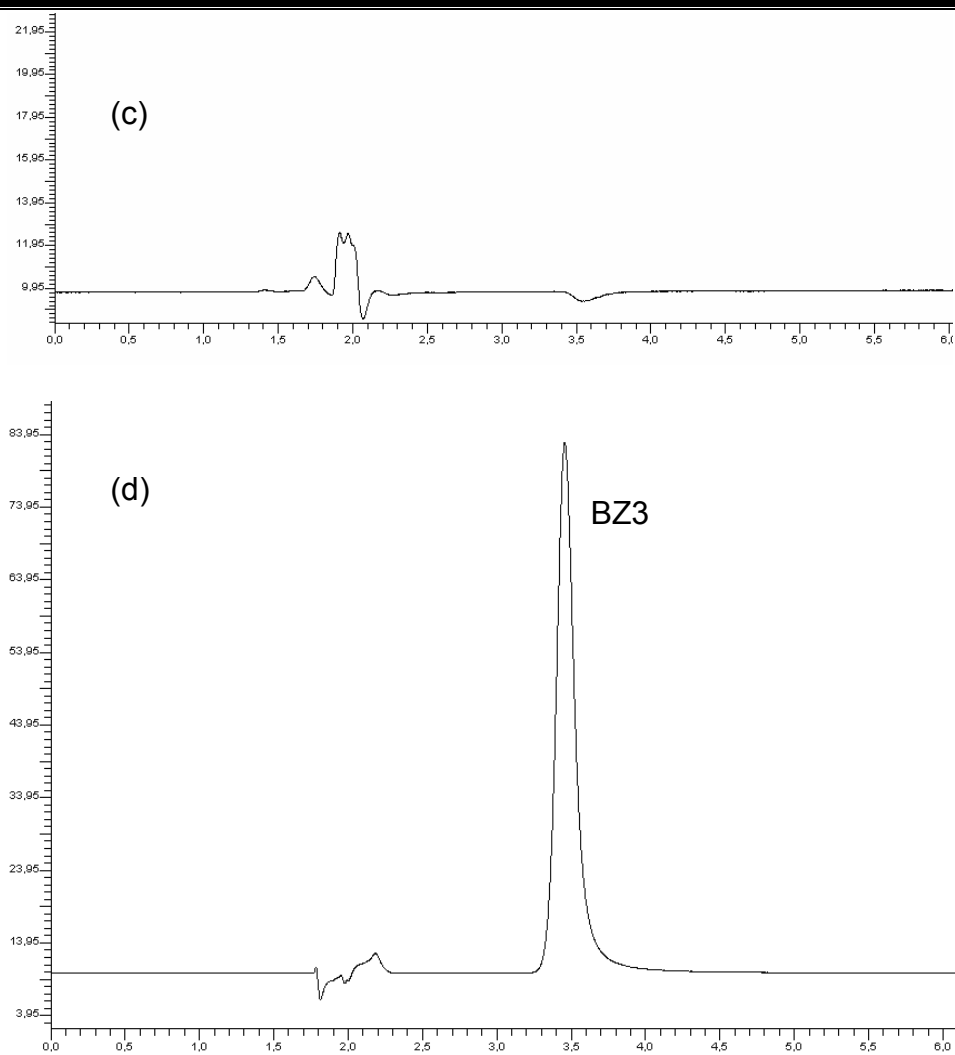


Figura 9.2.1. Cromatogramas de CLAE para o método analítico de doseamento de BZ3 em três diferentes formulações semi-sólidas (a: HGBr; b: CGBr; c: SBr; d: amostra da curva padrão na concentração de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

### **9.3 ANEXO 3**

---

**Determinação da linearidade, especificidade e da exatidão da extração da BZ3  
das amostras de pele abdominal de porcos fêmeas**





O método analítico utilizado para a quantificação da BZ3 a partir de nanocápsulas poliméricas não foi específico para a quantificação do ativo retido na derme (Figura 9.3.1-a) e epiderme (Figura 9.3.1-b) nos experimentos de permeação cutânea *in vitro*. O método então foi modificado e a linearidade, especificidade e a exatidão da extração do ativo contido na pele foram determinadas.

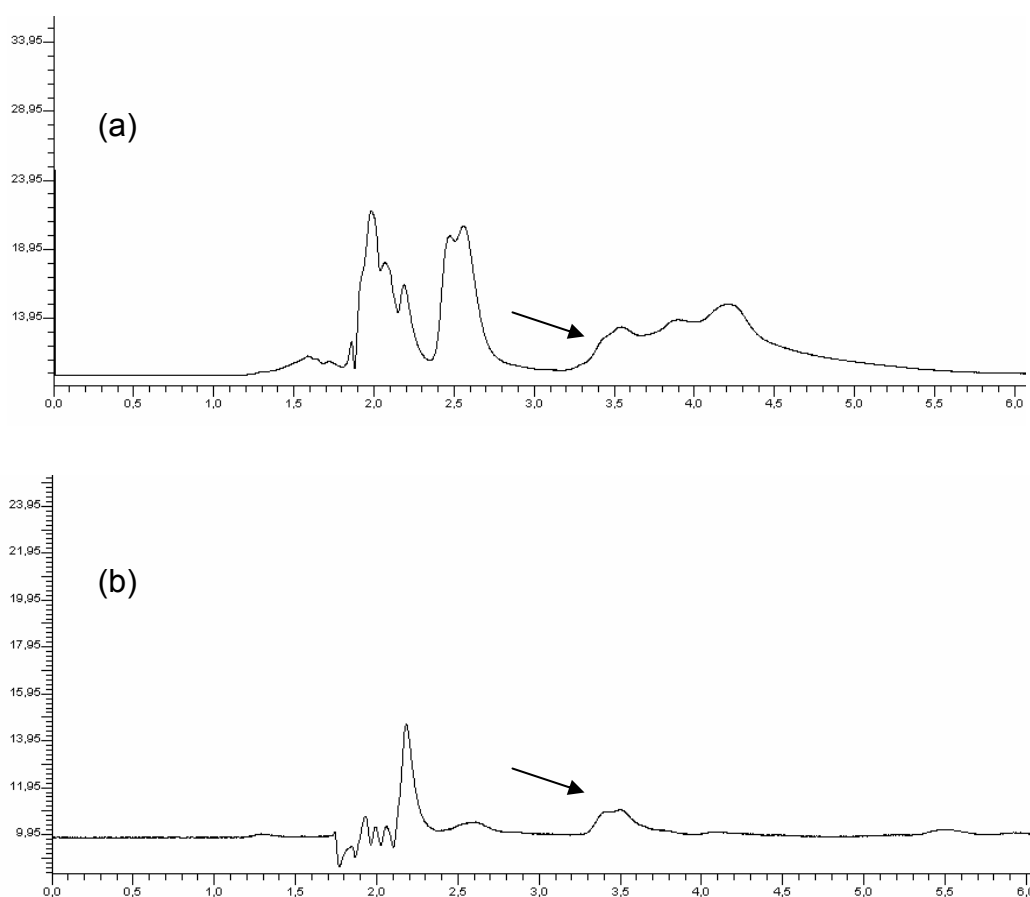


Figura 9.3.3. Cromatogramas de CLAE para o método analítico de doseamento de BZ3 a partir de nanocápsulas e os interferentes da pele no tempo de retenção do ativo (3,6 minutos) (a: derme; b: epiderme).

A quantificação da BZ3 nos experimentos de permeação cutânea foi realizada por CLAE em cromatógrafo Perkin Elmer Series 200, utilizando-se detector ultravioleta visível 289 nm, coluna LiChrospher 100 RP-18 (5 $\mu$ m, 250 x 4 mm), pré-coluna do mesmo material (5  $\mu$ m) e fase móvel isocrática de metanol e água em uma proporção 90:10 (v/v), agente de pareamento iônico perclorato de tetrabutílamônio (4 mg/%), com pH aparente igual à 4,0 e fluxo de 0,9 mL por minuto.

Para a avaliação da linearidade, as seguintes concentrações, a partir de uma mesma solução-mãe (500 µg/mL), foram preparadas: 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10 e 20 µg/mL. Três curvas-padrão com estas concentrações foram determinadas em dias consecutivos e, com auxílio do programa Excel, foram determinados o coeficiente de correlação, intersecção com o eixo y, o coeficiente angular.

Segundo a análise da variância (ANOVA), verificou-se regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo ( $p < 0,05$ ), observados nos valores de  $F_{\text{calculado}}$  comparados aos valores de  $F_{\text{tabelado}}$  (Tabela 9.3.1).

Tabela 9.3.1. ANOVA da linearidade do método analítico para quantificação da BZ3 extraída da pele abdominal de porcos fêmeas no experimento de permeação cutânea *in vitro*.

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Variância	$F_{\text{calculado}}$	$F_{\text{tabelado}}$
<b>Entre</b>	6	$5,895 \cdot 10^{12}$	$9,825 \cdot 10^{11}$	2882,87*	2,85
<b>Regressão linear</b>	1	$5,894 \cdot 10^{12}$	$5,894 \cdot 10^{14}$	17295,46*	4,60
<b>Desvio da linearidade</b>	5	$6,144 \cdot 10^8$	$1,228 \cdot 10^8$	0,36	2,96
<b>Dentro</b>	14	$4,771 \cdot 10^9$	$3,408 \cdot 10^8$		
<b>Total</b>	20	$5,900 \cdot 10^{12}$			

\*significativo para  $p < 0,05$ .

A curva-padrão de BZ3 apresentou coeficiente angular igual a 78680, intersecção no eixo y igual a - 6408,3 e coeficiente de correlação igual a 0,9999 (Figura 9.3.2).

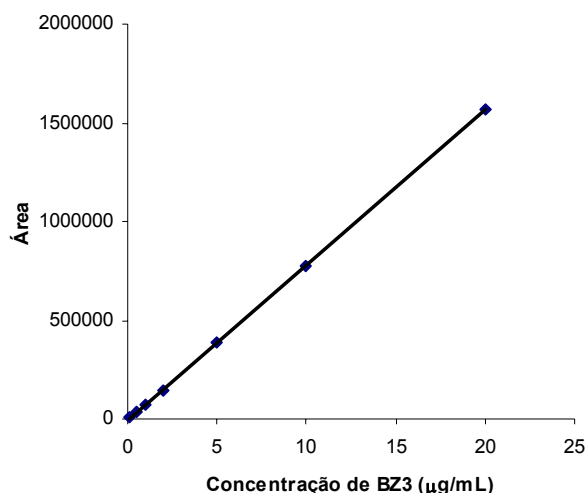


Figura 9.3.2. Curva-padrão para quantificação de BZ3 nas diferentes camadas da pele.

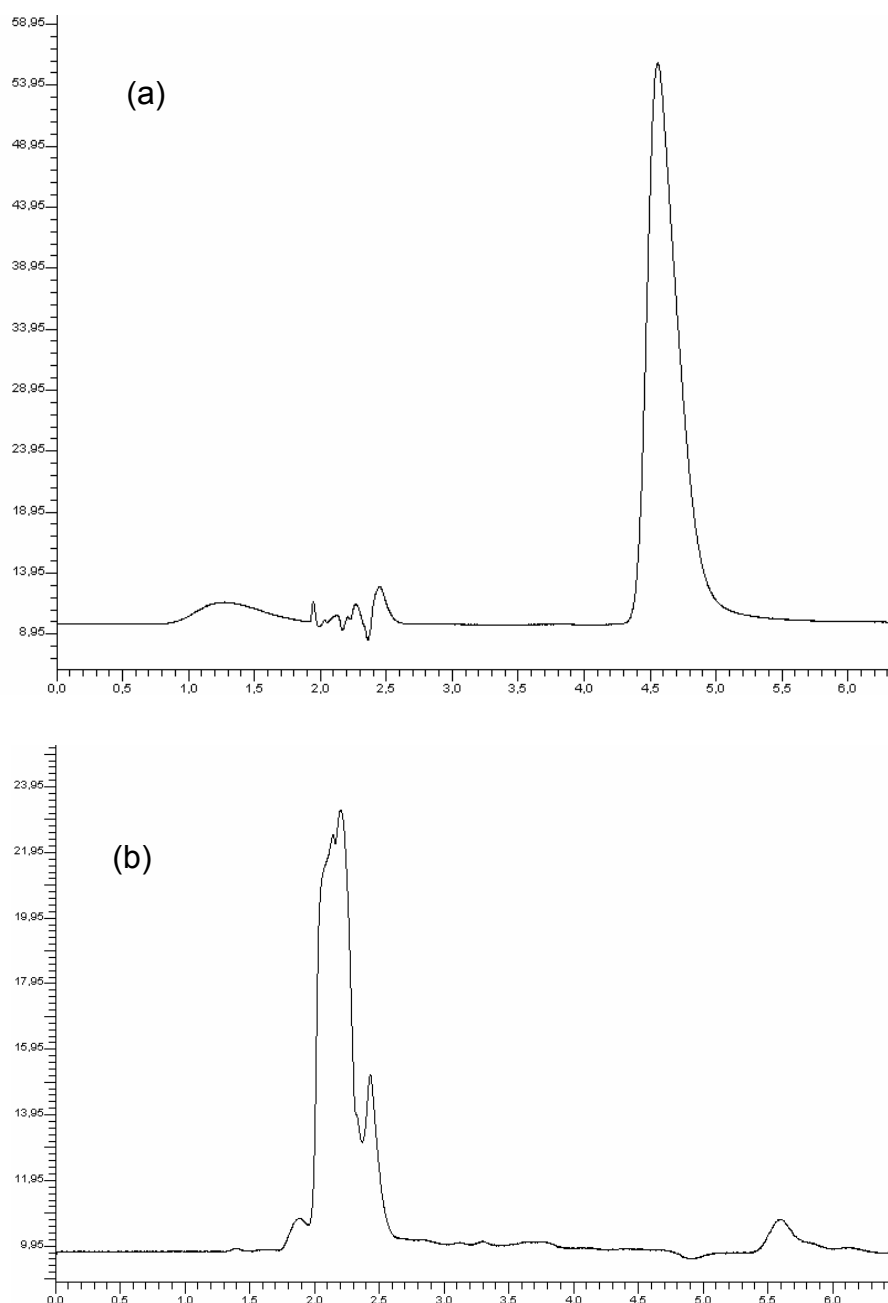
Para a determinação da exatidão, adicionou-se, em rodela de pele abdominal de porcos fêmeas, uma quantidade conhecida de BZ3, obtendo-se concentrações finais iguais a: uma concentração baixa da curva-padrão (0,5 µg/mL), uma concentração intermediária (5 µg/mL) e uma concentração alta (10 µg/mL). As amostras de pele foram picotadas e submetidas a um processo de extração da BZ3, primeiramente foram agitadas em vórtex durante 2 minutos e posteriormente sonicadas por 15 minutos para total extração do ativo. Após este procedimento, as amostras foram filtradas, através de membrana com 0,45 µm, sendo o filtrado submetido ao doseamento por método analítico previamente descrito.

A partir da recuperação do ativo determinou-se a exatidão do método. Os valores de exatidão apresentados na Tabela 9.3.2 demonstram os valores percentuais recuperados de BZ3 a partir das amostras de pele, estes valores encontram-se dentro dos intervalos permitidos (ICH, 1996).

Tabela 9.3.2. Avaliação da exatidão (%) da metodologia de extração de BZ3 contida na pele abdominal de porcos fêmeas no experimento de permeação cutânea *in vitro* (n=3).

Concentração teórica de BZ3 (µg/mL)	Conc. (µg/mL) ± DP	Exatidão (%)
0,50	0,54 ± 0,01	109,34
5,00	4,91 ± 0,06	98,27
10,00	9,58 ± 0,04	95,98

A especificidade do método de quantificação de BZ3 contida nas diferentes camadas da pele (derme, epiderme e estrato córneo) é apresentada através dos cromatogramas na Figura 9.3.3. Não há interferentes de componentes da pele na quantificação do ativo.



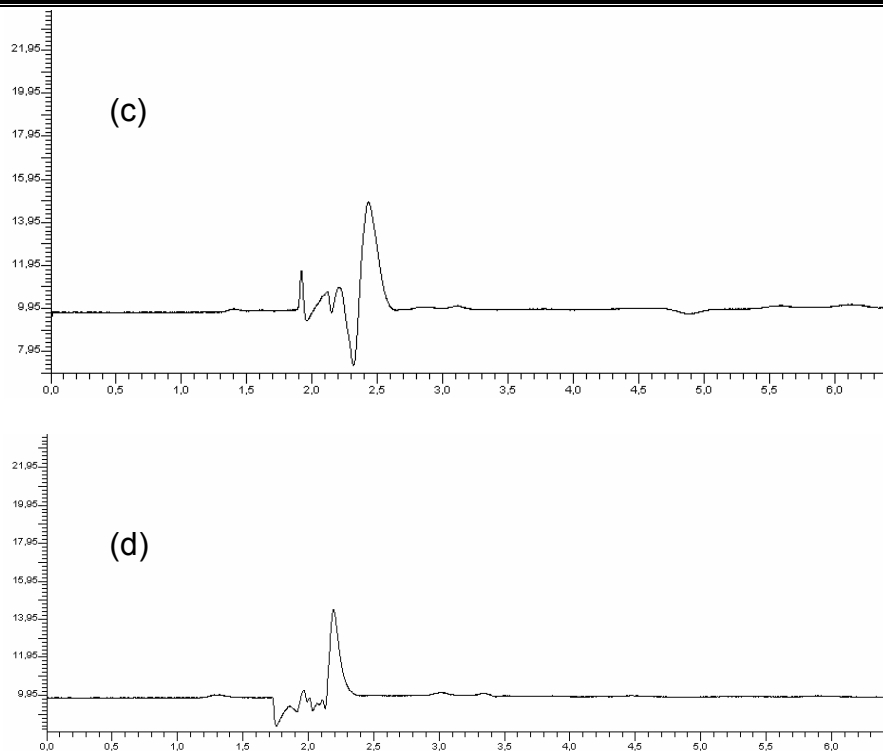


Figura 9.3.3. Cromatogramas de CLAE para o método analítico de doseamento de BZ3 nas diferentes camadas da pele (a: amostra da curva padrão na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ ; b: especificidade da derme; c: especificidade da epiderme; d: especificidade do estrato córneo).

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)