

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Faculdade de Farmácia

Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Filtros Solares em Nanocosméticos:
Desenvolvimento e Avaliação da
Segurança e Eficácia**

Mariana Sato de S de B Monteiro

Rio de Janeiro
2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Filtros Solares em Nanocosméticos: Desenvolvimento e Avaliação da Segurança e Eficácia

Mariana Sato de S B Monteiro

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Elisabete Pereira dos Santos

Co-Orientadora: Dr^ª. Zaida Maria Faria de Freitas

Rio de Janeiro
2008

Filtros Solares em Nanocosméticos: Desenvolvimento e Avaliação da Segurança e Eficácia

Orientadora

Prof^a Dr^a Elisabete Pereira dos Santos
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Co-Orientadora

Dr^a. Zaida Maria Faria de Freitas
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Banca Examinadora

Prof Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira
Faculdade de Farmácia - UFMG

Prof^a Dr^a. Carla Holandino Quaresma
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Prof Dr. Eduardo Ricci Junior
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Agradecimentos

Antes de tudo quero agradecer a Deus pela determinação e perseverança que me permitiram concluir este trabalho.

Aos meus pais, Claudia e Luis, e ao João, por todo carinho, suporte e incentivo para que eu pudesse concluir mais esta etapa.

Aos meus avôs Geraldo, Marly e Maria Helena, as minhas tias Kátia e Cristiane, as minhas primas, Cristine e Caroline, e a toda a minha família pelo apoio e incentivo.

A minha orientadora Elisabete Pereira dos Santos que me proporcionou a oportunidade de realizar este trabalho, e contribuiu de forma direta para o meu crescimento profissional e pelos ensinamentos transmitidos.

A minha co-orientadora Zaida Maria Faria de Freitas, pelo empenho, carinho e orientação durante a realização deste projeto.

A minha banca de acompanhamento, professores Eduardo Ricci e Nancy Barbi, pelo incentivo, sugestões e por auxiliarem na conclusão deste trabalho.

Ao Dr André Vergnanini e toda a sua equipe da ALLERGISA, pela parceria e pela realização dos testes *in vivo* das amostras, contribuindo para o sucesso do trabalho.

Ao Venicio Féo da Veiga do Instituto de Microbiologia Paulo Góes da UFRJ pela ajuda na microscopia óptica.

Ao Prof Marcos Kneip Fleury pela colaboração nos ensaios de microscopia óptica.

A Prof^a Nadia Maria Volpato pela colaboração nos tratamentos estatísticos realizados neste trabalho.

Ao LASSBIO pela colaboração nas análises do Infravermelho.

Aos professores Lucio Mendes Cabral e Camila Dornelas pela colaboração nas análises de difração de raio X.

Ao NPPN pela colaboração nas análises de RMN – ¹H.

Ao Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas pela colaboração nas análises para determinação do tamanho dos lipossomas, por espalhamento dinâmico da luz.

A todos da Farmácia Universitária da UFRJ: Maria Amélia, Prof^a Naira, Prof^a Rita, Cléo, Carlinhos, Paulo, Ricardo e toda a sua equipe por participarem destes últimos 5 anos da minha vida, pelo carinho e apoio físico e estrutural, pelo ambiente agradável e acolhedor que vocês proporcionaram.

Ao LABCQ pela colaboração nas análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, e toda sua equipe: Eliane, Maria, Monique, Tailane, Yara, Luís Francisco, Daniela e Bianca pela ajuda e troca de idéias durante o trabalho e também pelos momentos de descontração e os cafés.

A todas as amigas do LADEG: Mariana da Volta, Ana Karla, Gláucia e Bárbara por compartilharem de perto todos os momentos destes últimos 2 anos, e pelas palavras de incentivo.

Aos professores da pós-graduação pelos grandes ensinamentos e contribuição na minha formação.

A Prof^a Dr^a Gisella Ortiz, pelo apoio no exercício do papel de coordenadora do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

As minhas amigas, em especial: Nandol, Fernanda, Flavinha, Flávia, Débora, Camila que tornaram esses anos estressantes muito mais divertidos. Especialmente Flavinha e Fernanda que ajudaram na limpeza das orelhas. E a todos os meus amigos de faculdade pelos momentos compartilhados.

À CAPES, órgão que financiou a bolsa de estudo para a realização deste trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

MONTEIRO, MARIANA S. S. B. Filtros Solares em Nanocosméticos: Desenvolvimento e Avaliação da Segurança e Eficácia. Rio de Janeiro. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

A exposição excessiva à luz solar pode causar diversos efeitos indesejáveis, como queimaduras e câncer de pele. Os filtros solares são recomendados como uma medida preventiva aos efeitos nocivos da luz solar. Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que alguns filtros solares possuem atividade estrogênica, evidenciando que pode ocorrer a absorção sistêmica destes ativos. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de preparações anti-solares seguras e eficazes. O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar a eficácia e a segurança de quatro nanocosméticos desenvolvidos, na forma de gel creme, contendo o filtro solar *p*-metoxicinamato de octila (MCO) a 8% livre e incluso nos sistemas nanoestruturados: β -ciclodextrina e lipossoma. Foram desenvolvidas quatro formulações: gel creme contendo MCO livre; β -ciclodextrina/MCO; lipossoma/MCO e β -ciclodextrina/MCO + lipossoma/MCO. A eficácia das formulações foi avaliada pelos testes de FPS *in vivo* a seco e após a imersão em água. A segurança dos nanocosméticos foi avaliada pelos testes de liberação, penetração e/ou permeação *in vitro* utilizando um sistema bicompartimental de difusão vertical, empregando membrana sintética (acetato de celulose) e membrana natural (pele suína), respectivamente. No teste de FPS *in vivo* a seco, a formulação contendo ambos os sistemas β -ciclodextrina/MCO + lipossoma/MCO, obteve o maior valor de FPS = $11,6 \pm 1,6$. A formulação contendo o sistema lipossoma/MCO também demonstrou um alto valor de FPS a seco = $11,0 \pm 1,3$ e apresentou um alto valor de FPS após imersão em água = $10,3 \pm 2,2$. Nos testes de penetração a formulação contendo o sistema lipossoma/MCO apresentou melhor desempenho, pois foi encontrada uma maior quantidade de MCO na epiderme $18,04 \pm 1,17 \mu\text{g}$ e uma baixa quantidade de MCO na derme $9,4 \pm 2,36 \mu\text{g}$, evidenciando o efeito reservatório do lipossoma no estrato córneo. Dessa forma, o sistema nanoestruturado lipossoma/MCO é o mais vantajoso, pois é capaz de aumentar a quantidade de ativo na epiderme e aumentar o FPS da formulação.

ABSTRACT

MONTEIRO, MARIANA S. S. B. Filtros Solares em Nanocosméticos: Desenvolvimento e Avaliação da Segurança e Eficácia. Rio de Janeiro. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

Excessive exposure to ultraviolet radiation could cause several side effects, such as burns and skin cancer. Sunscreens have been widely recommended as a preventive measure for the harmful effects of sunlight. Several *in vivo* and *in vitro* studies have reported estrogen-like activity for some sunscreens, showing systemic absorption for these molecules. Therefore, it is necessary to develop anti-solar preparations that are safe and effective. The aim of this work was to evaluate the efficacy and safety of four sunscreen formulations developed: gel cream containing the sunscreen p-octyl methoxycinnamate (OMC) at 8% and containing the release system: β -cyclodextrins and liposomes. Four formulations were developed: gel cream containing OMC free, β -cyclodextrin/OMC; liposome/OMC and liposome/OMC + β -cyclodextrin/OMC systems. The effectiveness of these formulations was evaluated by *in vivo* SPF values and after water immersion SPF values. The safety of preparations was evaluated by *in vitro* release and penetration tests using a bicompartimental vertical diffusion system, employing a synthetic (cellulose acetate) and natural (pigskin) membrane, respectively. The preparation containing both release systems liposome/OMC + β -cyclodextrin/OMC showed the best result in the *in vivo* FPS test = 11.6 ± 1.6 . The formulation containing only the liposome/OMC system had also a high value of *in vivo* FPS = 11.0 ± 1.3 and showed the best resistance to water FPS = 10.3 ± 2.2 . In penetration tests the formulation containing the liposome/OMC system had a better performance because a high amount of OMC was found in the epidermis 18.04 ± 1.17 g and a low amount of OMC in the dermis 9.4 ± 2.36 g, showing there is an interaction between the liposome and stratum corneum, promoting a reservoir effect. Thus, the liposome/OMC system is the most advantageous release system due to its ability to increase the amount of OMC in the epidermis and increase the FPS formulation.

LISTA DE FIGURAS

	Pág
FIGURA 1: Ilustração esquemática do espectro eletromagnético.	26
FIGURA 2: Penetração da radiação UV e visível na pele.	30
FIGURA 3: As três camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme.	31
FIGURA 4: Representação diagramática do transporte de fármacos através da principal via no estrato córneo: o espaço intercelular.	34
FIGURA 5: Representação gráfica do lag-time.	37
FIGURA 6: Fórmula estrutural genérica da maioria dos filtros solares orgânicos.	40
FIGURA 7: Estrutura do <i>p</i> -metoxicinamato de octila.	42
FIGURA 8: Estrutura do lipossoma.	46
FIGURA 9: Demonstração do efeito reservatório do lipossoma.	47
FIGURA 10: Classificação dos lipossomas de acordo com o tamanho e número de lamelas.	49
FIGURA 11: Estrutura das ciclodextrinas naturais: A- α -CD; B- β -CD e C- γ -CD.	52
FIGURA 12: Estrutura da β -CD: (a) Estrutura tronco-cone e (b) Estrutura vista do topo.	53
FIGURA 13: Processo de obtenção dos lipossomas através do método de hidratação do filme lipídico.	74
FIGURA 14: Representação esquemática do método de Bartlett para a determinação do teor de fósforo.	79
FIGURA 15: Área demarcada nas costas dos voluntários para a determinação do teste de FPS <i>in vivo</i> .	90
FIGURA 16: Preparo da orelha suína.	95
FIGURA 17: Demonstração do aparato experimental e retirada da pele.	98
FIGURA 18: Espectro de UV-Vis do MCO.	100
FIGURA 19: Representação da curva padrão média do MCO por espectroscopia de UV utilizando como solvente etanol P.A.	101

FIGURA 20: Espectro de Infravermelho do MCO (filme entre cristais de NaCl).	103
FIGURA 21: Espectro de RMN ¹ H do MCO.	105
FIGURA 22: Espectro de RMN ¹ H do sistema β-CD/MCO.	105
FIGURA 23: Molécula do MCO.	106
FIGURA 24: Difratoograma da β-CD.	107
FIGURA 25: Difratoograma da β-CD-mistura física.	108
FIGURA 26: Difratoograma do sistema β-CD/MCO.	108
FIGURA 27: Espectro de IV da matéria prima β-CD.	109
FIGURA 28: Espectro de IV do sistema β-CD/MCO.	110
FIGURA 29: Micrografia óptica dos lipossomas com MCO a 72,00 mM – fração não diluída. Aumento de 100 x.	114
FIGURA 30: Micrografia óptica da fração filtrada em membrana 0,4 μm dos lipossomas com MCO a 72,00 mM diluídos em 10 mL de solução etanólica a 25 %. Aumento de 100.	114
FIGURA 31: Micrografia óptica da fração filtrada em membrana 0,4 μm dos lipossomas com MCO a 72,00 mM diluídos em 20 mL de solução etanólica a 25 %. Aumento de 100x.	115
FIGURA 32: Micrografia óptica contendo medidas aleatórias da fração filtrada em membrana 0,4 μm dos lipossomas com MCO a 72,00 mM diluídos em 10 mL de solução etanólica a 25%. Aumento de 100x.	115
FIGURA 33: Tamanho das partículas nos lipossomas com MCO 72,00 mM – fração filtrada.	117
FIGURA 34: Distribuição do tamanho dos lipossomas MCO 72,00 mM – fração filtrada.	117
FIGURA 35: Representação de uma das curvas de calibração de fósforo utilizada para a determinação do teor de fosfolipídios na fração lipossomal por espectroscopia de UV/VIS.	120
FIGURA 36: Cromatograma do branco e da formulação contendo MCO livre, ambos na concentração de 10 μg/ mL obtido por CLAE com λ de 310 nm.	123
FIGURA 37: Representação das três curvas de calibração obtidas na faixa de concentração de 2,5 a 20 μg/mL de MCO.	124

FIGURA 38: Valores de FPS <i>in vivo</i> a seco e após imersão em água nas formulações desenvolvidas.	133
FIGURA 39: Perfil de liberação <i>in vitro</i> do MCO a partir das formulações desenvolvidas. Erro das barras indica média \pm desvio padrão.	137
FIGURA 40: Curvas padrão de MCO 0,1 a 20,0 $\mu\text{g/mL}$.	141
FIGURA 41: Cromatogramas obtidos na extração de MCO da pele suína empregando metanol: água (87:13), para a avaliação da especificidade do método.	142
FIGURA 42: Massas absolutas de MCO extraída da epiderme e derme após 6 horas de contato das formulações com a pele, em uma área de $1,96 \text{ cm}^2$.	144

LISTA DE EQUAÇÕES:

	Pág
EQUAÇÃO 1: Primeira Lei de Fick.	36
EQUAÇÃO 2: Segunda Lei de Fick	37
EQUAÇÃO 3: Equação <i>tlag</i>	38
EQUAÇÃO 4: Fator de Proteção Solar.	58
EQUAÇÃO 5: Cálculo do FPS segundo Mansur.	88

LISTA DE TABELAS

	Pág
TABELA 1: Composição da suspensão lipossomal.	73
TABELA 2: Composição do gel creme com MCO livre, com os sistemas nanoestruturados β -CD/MCO, Lipo/MCO e com ambos β -CD/MCO e Lipo/MCO.	81
TABELA 3: Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda.	89
TABELA 4: Fórmula da emulsão padrão utilizada nos testes de FPS <i>in vivo</i> .	91
TABELA 5: Parâmetros observados na análise por ultravioleta do MCO.	100
TABELA 6: Comparação das principais bandas de absorção do espectro de infravermelho do MCO.	102
TABELA 7: Alterações nos deslocamentos químicos do MCO incluso.	106
TABELA 8: Principais bandas de absorção no espectro de infravermelho da β -CD e do MCO.	111
TABELA 9: Determinação do rendimento da inclusão do complexo β -CD/MCO por espectrofotometria de UV.	112
TABELA 10: Determinação da quantidade de filtro solar incorporado na suspensão lipossomal por espectrofotometria de UV.	119
TABELA 11: Resultados obtidos na determinação da concentração de fosfolipídios na matéria prima Lipoid 100% [®] e Lipossoma.	121
TABELA 12: Respostas obtidas pelas curvas de calibração de MCO em cada dia de análise.	125
TABELA 13: Análise da precisão inter e intra dia nos cinco níveis de concentração do MCO.	126
TABELA 14: Concentrações de MCO nas formulações desenvolvidas obtidas por CLAE.	128
TABELA 15: Valores de absorbância e do FPS <i>in vitro</i> das formulações desenvolvidas (média \pm desvio padrão relativo).	129
TABELA 16: Valores de FPS <i>in vivo</i> das formulações desenvolvidas.	131
TABELA 17: Valores de FPS <i>in vivo</i> após a imersão em água das formulações desenvolvidas.	132

TABELA 18: Valores obtidos para a solubilidade do MCO nas soluções receptoras testadas.	135
TABELA 19: Fluxo no estado estacionário (J_{ss}) para cada uma das formulações estudadas.	137
TABELA 20: Quantidade média de MCO cedida de cada formulação em cada tempo \pm D.P (n = 6).	138
TABELA 21: Recuperação média de MCO na epiderme e derme para três níveis de concentração \pm D.P (n = 3).	141
TABELA 22: Massa de MCO obtida na epiderme suína em uma área de $1,96 \text{ cm}^2$, após 6 horas de contato com a formulação.	144
TABELA 23: Massa de MCO obtida na derme suína em uma área de $1,96 \text{ cm}^2$, após 6 horas de contato com a formulação.	144

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs – Absorbância.

DNA – ácido desoxirribonucléico.

PABA – Ácido p-aminobenzóico.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

ANOVA – Análise de variância.

BZ-3 – Benzofenona – 3.

β -CD – Beta ciclodextrina.

BHT-Butilhidroxitolueno.

BMDM – Butilmetóxidibenzoil metano.

BP – Farmacopéia Britânica.

cm – centímetro (s).

cm² - centímetro(s) quadrado (s).

CD – Ciclodextrina.

r – Coeficiente de correlação.

r² – Coeficiente de determinação.

ϵ – Coeficiente de extinção molar.

COLIPA – Comitee de La Liasion des Associations Europeans de L`Industries de La Parfumerie, de Produits Cosmetiques et de Toilette (Comitê das Associações Européias das Industrias de Perfumaria, Cosmético e produtos de Toucador).

λ – Comprimento de onda.

λ máx – Comprimento de onda em que ocorre a maior absorbância.

CG – Cromatografia com fase Gasosa.

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência.

Da – Dalton.

D.P – Desvio padrão.

DPR – Desvio padrão relativo.

DL - Difração a Laser.

XDR – Difração de Raio X.

DMSO- d⁶- Dimetilsulfóxido deuterado.

DME – Dose mínima de eritema.

EE – Efeito Eritematogênico.

EFC – Espectroscopia de correlação de fótons.

EC – Estrato córneo.

FPS – Fator de proteção solar.

FDA – Food and Drug Administration.

PC – Fosfatidilcolina.

g – grama (s).

°C – Graus Celsius.

HP-β-CD - hidroxipropil β ciclodextrina.

h – hora (s).

IV – Infravermelho.

I – Intensidade da Luz Solar.

Lipo – Lipossoma.

L – litro (s).

MHz- Megahertz.

MD – Média.

3,4 –MBC – 3-(4-metilbenzilideno) cânfora.

m – metro (s).

µg – micrograma (s).

µg/mL – micrograma/mililitro.

μL – microlitro.

μm – micrômetro.

MET - Microscopia eletrônica de transmissão.

MV - Microscopia de varredura.

mg – miligrama (s).

mg/cm^2 - miligramas/ centímetro quadrado.

mg/L – miligrama/ Litro.

mL – mililitro (s).

mm – milímetro (s).

μM – milimolar.

min – minuto (s).

n – número de réplicas.

ng/mL – nanograma/mililitro.

ng/g – nanograma/grama.

nm – nanômetro.

nM – nanomolar (nanomoles/Litro).

p – Nível de probabilidade.

α – Nível de significância.

P.A. – Para análise.

MCO – *p*-metoxicinamato de octila.

% - Percentual.

pH – Potencial de hidrogênio iônico.

q.s.p – quantidade suficiente para.

rf – Radiofrequência.

RDC – Resolução da diretoria colegiada.

RMN ^1H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.

RMN ^{13}P – Ressonância Magnética Nuclear de Fósforo.

□PM – Rotações por minuto.

Tlag – Lag-time

θ – Theta.

TRIS – Tris-hidróximetilaminometano.

UV – Ultravioleta.

UVA - Ultravioleta A.

UV –A1 – Ultravioleta A1.

UV-A2 – Ultravioleta A2.

UVB – Ultravioleta B.

UVC – Ultravioleta C.

UV-VIS – Ultravioleta visível.

VMGs- Vesículas multilamelares grandes.

VUGs - Vesículas unilamelares grandes.

VUPs - Vesículas unilamelares pequenas.

W – Watts.

SUMÁRIO

	Pág
1. Introdução.	22
2. Objetivos.	25
3. Revisão Bibliográfica.	26
3.1. Radiação Solar.	26
3.1.1. Radiação Ultravioleta.	27
3.1.2. Efeitos Benéficos da Radiação Ultravioleta.	28
3.1.3. Efeitos Nocivos da Radiação Ultravioleta.	28
3.2. Pele, Estrutura e Vias de Penetração.	30
3.2.1. Aspectos Teóricos Sobre Mecanismos de Penetração Cutânea.	35
3.3. Filtros Solares.	38
3.3.1. Filtros Inorgânicos.	39
3.3.2. Filtros Orgânicos.	40
3.3.3. <i>p</i> -Metoxicinamato de Octila.	41
3.4. Lipossomas.	44
3.5. Ciclodextrinas.	51
3.5.1. Derivados das Ciclodextrinas.	55
3.5.2. Formação do Complexo de Inclusão.	55
3.6. Eficácia dos Filtros Solares.	58
3.7. Segurança das Formulações Fotoprotetoras.	60
4. Materiais.	63
4.1. Equipamentos e Acessórios.	63
4.2. Reagentes.	65
4.3 Matérias – Primas.	66

5. Métodos.	67
5.1. Caracterização Físico-Química do MCO.	67
5.2.1 Análise do Espectro de Absorção na Região do Ultravioleta.	67
5.2.2. Análise do Espectro de Absorção na Região do Infravermelho.	68
5.3. Formação do Sistema Nanoestruturado β -CD/ MCO.	68
5.3.1. Sistema Nanoestruturado β -CD/ MCO.	68
5.3.2. Purificação do Sistema Nanoestruturado β -CD/ MCO.	69
5.3.3. Caracterização do Sistema Nanoestruturado β -CD/ MCO.	69
5.3.4. Determinação da Quantidade de MCO Incorporado no Sistema Nanoestruturado β -CD/ MCO.	71
5.4. Formação do Sistema Nanoestruturado Lipo/MCO.	72
5.4.1. Normalização dos Lipossomas.	74
5.4.2. Verificação da Formação dos Lipossomas por Microscopia Óptica.	75
5.4.3. Espalhamento Dinâmico da Luz.	76
5.4.4. Determinação da Quantidade de MCO Incorporado no Sistema Nanoestruturado Lipo/MCO.	76
5.4.5. Determinação da Quantidade de Fosfolipídio na Matéria- Prima Lipoid [®] 100%, na Suspensão Lipossomal.	77
5.5. Desenvolvimento das Formulações.	80
5.6. Padronização da Metodologia de Análise das Formulações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.	83
5.6.1 Preparo das Soluções de Trabalho.	84
5.6.2. Preparo das Amostras Para a Quantificação do Teor de MCO nos Nanocosméticos Desenvolvidos.	85
5.6.3. Parâmetros Avaliados por CLAE.	85
5.7. Eficácia das Formulações Anti-solares.	87
5.7.1. Determinação do FPS <i>in vitro</i> .	88

5.7.2. Determinação do FPS <i>in vivo</i> a Seco.	89
5.7.3. Determinação do FPS <i>in vivo</i> Após a Imersão em Água.	91
5.8. Análise Estatística.	92
5.9. Segurança das Formulações Fotoprotetoras.	92
5.9.1. Estudo da Solubilidade do MCO e Escolha da Solução Receptora.	92
5.9.2. Estudo de Liberação <i>in vitro</i> .	93
5.10. Estudo de Penetração e/ou Permeação Cutânea.	94
5.10.1. Obtenção e Limpeza da Pele suína.	94
5.10.2. Validação da Metodologia Para a Extração e Quantificação de MCO na Epiderme e Derme Suína.	95
5.10.3. Metodologia de Extração de MCO na Epiderme e Derme Suína.	96
5.10.4. Protocolo da Penetração/Permeação Cutânea das Formulações Contendo MCO.	97
6. Resultados.	99
6.1. Caracterização Físico – Química do Filtro MCO.	99
6.1.1. Determinação dos Parâmetros de Absorção na Região do UV.	99
6.1.2. Determinação dos Parâmetros do Espectro de Absorção do MCO na Região do Infravermelho.	101
6.2. Formação e Purificação do Sistema Nanoestruturado β -CD/MCO.	103
6.2.1. Caracterização do Sistema β -CD/MCO por Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H).	103
6.2.2. Caracterização do Sistema β -CD/MCO por Difração de Raio X.	106
6.2.3. Caracterização do Sistema β -CD/MCO por Espectroscopia de Infravermelho.	108
6.2.4. Determinação do Rendimento de Inclusão do Sistema Nanoestruturado β -CD/MCO por Espectrometria de Ultravioleta.	111
6.3. Caracterização dos Lipossomas.	112
6.3.1. Verificação da Formação dos Lipossomas por Microscopia Óptica.	112

6.3.2. Determinação do Tamanho dos Lipossomas por Espalhamento Dinâmico da Luz Laser.	116
6.3.3 Determinação da Quantidade de MCO Incorporado na Suspensão Lipossomal.	119
6.3.4 Análise de Fósforo nos Fosfolípidios (Lipoid 100%) e no Lipossoma.	120
6.4. Análise Quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.	122
6.4.1 Condições Cromatográficas Para Análise do MCO.	122
6.4.2. Seletividade.	122
6.4.3. Linearidade.	123
6.4.4. Precisão Intra e Inter dia.	125
6.4.5. Determinação da Concentração de MCO nas Formulações Desenvolvidas por CLAE.	126
6.5. Eficácia das Formulações Anti-Solares	128
6.5.1. Determinação do FPS <i>in vitro</i> .	128
6.5.2. Determinação do FPS <i>in vivo</i> a Seco.	130
6.5.3. Determinação do FPS <i>in vivo</i> Após Imersão em Água.	131
6.6. Segurança das Formulações Anti-Solares	134
6.6.1. Estudo da Solubilidade do MCO e Escolha da Solução Receptora.	134
6.6.2. Estudo de Liberação <i>in vitro</i> .	137
6.6.3. Estudo de Permeação/Penetração <i>in vitro</i> Utilizando a Pele Suína.	140
6.6.3.1. Desenvolvimento e Validação do Método Para a Extração e Quantificação de MCO na Epiderme e Derme Suína.	141
6.6.3.2. Resultados da Penetração de MCO na epiderme e derme suína.	143
7. Conclusão.	148
8. Referências Bibliográficas.	151

1. Introdução.

A radiação solar é subdividida em: luz visível (400-800 nm), que corresponde cerca de 45% do total da energia incidente; radiação infravermelha (acima de 800 nm) também chamada radiação calórica, que corresponde a aproximadamente 50% da energia incidente e a radiação ultravioleta (< 400 nm). Esta última se divide em: UVC (200-290 nm), completamente absorvida pelo ozônio e oxigênio da atmosfera; UVB (290-320 nm), parcialmente absorvida pela camada de ozônio e UVA (320-400 nm) que não é absorvida pela camada de ozônio (HIRSCHBERG, SANTUS & KOHEN, 1995; MERWALD *et al.*, 2005).

Os efeitos nocivos da luz solar na pele humana são bem conhecidos, especialmente os da radiação ultravioleta. Esta pode causar danos irreparáveis como queimaduras solares, fotoenvelhecimento e câncer de pele, sendo este último o mais grave (SCALIA, 2002; MERWALD *et al.*, 2005; KULLAVANIJAYA & LIM, 2005; SCALIA, 2006). Devido aos fatores citados, houve uma conscientização por parte da população resultando no aumento do uso de produtos fotoprotetores.

Os filtros solares têm sido largamente recomendados como uma medida preventiva contra os raios ultravioletas (SCALIA *et al.*, 1998; URBACH, 2001). Estes são frequentemente aplicados e espalhados em grandes áreas do corpo, sendo recomendadas reaplicações após o contato com água, conseqüentemente aumentando a quantidade do produto que será utilizada. Além disso, filtros solares são incorporados em produtos para uso diário, como hidratantes e produtos para cabelo (GONZALES, FARBROT & LARKÖ, 2002).

Na tentativa de tornar os filtros solares mais resistentes à água, os fabricantes os tornam mais lipofílico o que pode levar a um aumento de absorção cutânea, favorecendo sua presença nas camadas mais internas da pele, o que não é desejável. Um filtro solar

deve cobrir e proteger a pele, desenvolvendo suas atividades nas camadas superiores do tecido cutâneo (estrato córneo (EC)), evitando, assim, uma possível absorção sistêmica (PETRAZZUOLI, 2000; NOHYNEK & SCHAEFER, 2001; KULLAVANIJAYA & LIM, 2005).

De acordo com Sarveiya, Risk & Benson (2004), uma quantidade significativa dos filtros solares como oxibenzona, *p*-metoxicinamato de 2-etil-hexila, octilsalicilato e homosalato foram encontrados em camadas mais profundas do EC, 30 minutos após a aplicação em voluntários. Esta quantidade encontrada diminuiu 4 horas após a aplicação, sugerindo que pode ter ocorrido absorção para camadas mais profundas da pele, e aproximadamente 1% da dose aplicada de oxibenzona e seus metabólitos foram encontrados na urina, após uma única aplicação. Além disso, estes filtros solares também foram detectados em amostras de leite materno de voluntários (HANY & NAGEL, 1995). Sendo assim, a quantidade absorvida pode ser significativa mesmo que o grau de permeação seja baixo (SARVEIYA, STACEY & BENSON, 2004).

O *p*-metoxicinamato de 2-etilhexila ou octilmetoxicinamato (MCO) é um filtro solar químico derivado da classe dos cinamatos que absorve na faixa do UVB e apresenta absorção máxima em 310 nm. Apesar de ser mundialmente empregado em formulações antisolares, apresenta uma perda de atividade de 5% sob ação da luz, a qual está associada ao processo de formação dos isômeros E-Z. Esta perda de atividade implica no emprego de concentrações mais elevadas (5 a 10%) (HUONG *et al.*, 2007). Por isso, este filtro solar foi escolhido para o desenvolvimento e avaliação dos sistemas nanoestruturados (lipossomas e ciclodextrinas) e preparo dos nanocosméticos na concentração de 8 %.

Sistemas nanoestruturados, como lipossomas e ciclodextrinas, têm sido empregados para garantir a presença de filtros solares na epiderme. Estes sistemas

podem melhorar as propriedades deste ativo, aumentando sua retenção no EC, diminuindo sua permeação cutânea, aumentando seu Fator de Proteção Solar (FPS), controlando sua liberação e tornando-o mais fotoestável (GARCIA, 1998; SCALIA, 1998; PERUGINE, 2002; SCALIA, 2002; YENER, 2003; JIMÉNEZ).

A eficácia dos nanocosméticos pode ser avaliada pela determinação do FPS *in vivo* a seco e após imersão em água. O FPS é a medida de um fotoprotetor frente à radiação UVB, e é definida pela razão de tempo de exposição à radiação UV necessária para produzir dose mínima de eritema (DME) na pele protegida pelo tempo de aparecimento do mesmo eritema na pele desprotegida (ANVISA, 2006).

A segurança das formulações cosméticas pode ser avaliada por técnicas *in vitro*, empregando um modelo bicompartimental, conhecido como célula de difusão vertical e pele natural (humana ou animal). Dentre os vários tipos de pele animal podem ser utilizadas as de rato, cobaio, camundongo com e sem pêlo, macaco rhesus e cobra. No entanto, tem-se empregado a pele suína devido a sua similaridade com a pele humana (SEKKAT, KALIA & GUY, 2002; MEDI & SINGH, 2003).

A determinação da velocidade de liberação do ativo das formulações é interessante para avaliar a disponibilidade do ativo para a pele. Pois, a liberação imediata da dose total administrada ou a ausência de liberação do ativo são situações não desejadas. Para avaliar a velocidade de liberação, pode-se empregar o mesmo sistema bicompartimental com membranas artificiais, como acetato de celulose, nitrato de celulose e polissulfona (HAIGH & SMITH, 1994; UNITED STATES, 1997), as quais são apenas suportes que não oferecem resistência à passagem do ativo do compartimento doador para o compartimento receptor da célula de difusão, proporcionando, desta forma, sua quantificação neste último, em função da partição entre o veículo e o meio aceptor.

2. Objetivos.

- Desenvolver e caracterizar sistemas nanoestruturados: lipossomas e β -ciclodextrina contendo o filtro solar *p*- metoxicinamato de octila (MCO);
- Desenvolver nanocosméticos na forma de gel creme contendo os sistemas nanoestruturados desenvolvidos;
- Avaliar a eficácia, através dos testes de FPS *in vivo* a seco e após a imersão em água, dos nanocosméticos desenvolvidos;
- Avaliar a segurança dos nanocosméticos desenvolvidos, através dos testes de liberação, penetração e/ou permeação *in vitro* utilizando um sistema bicompartimental de difusão vertical, empregando membrana sintética (acetato de celulose) e membrana natural (pele suína), respectivamente.

3. Revisão Bibliográfica.

3.1 Radiação Solar.

A radiação solar abrange todo o espectro eletromagnético, incluindo energia cósmica de alta e baixa energia; raios gama; raios ultravioletas (UV) de alta e baixa energia; luz visível; radiação infravermelha (IV); microondas, e finalmente ondas de rádio (FIGURA 1). Radiação com comprimento de onda de alta energia ($\lambda < 10$ nm) desloca os elétrons das moléculas para formar íons, e são consideradas radiações ionizantes. Radiação UV, visível e IV com baixo comprimento de onda, não possuem a energia requerida para esse processo e são classificadas como não ionizantes (KIRCHOFF, 1995; SHAATH *et al.*, 2005).

Os comprimentos de onda das radiações que alcançam a superfície terrestre estão compreendidos entre 290-2000 nm. A radiação ultravioleta corresponde a 5% do total de radiação solar que atinge a superfície terrestre, sendo a responsável por ocasionar danos à pele (SANTOS, 1986; VIGLIOGLIA, 1989; IARC, 1992; RAMOS, 1995, FREITAS, 1997).

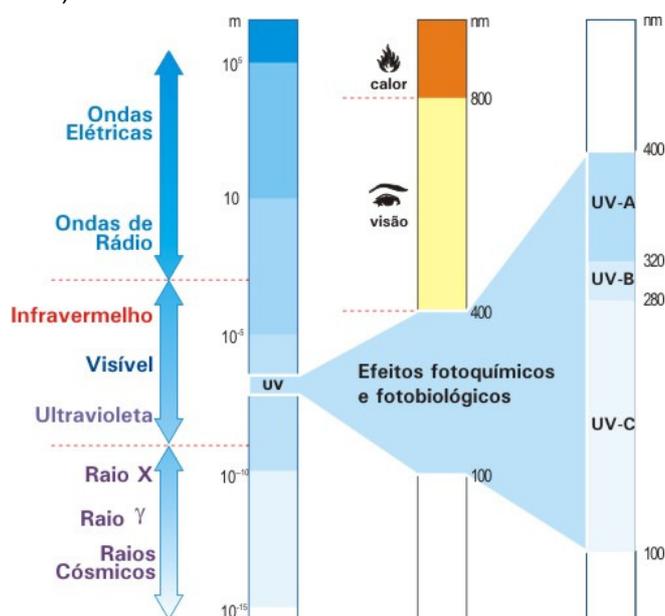


FIGURA 1: Ilustração esquemática do espectro eletromagnético. Disponível em <http://www.cptec.inpe.br/glossario/fotos/035g.jpg>.

3.1.1. Radiação Ultravioleta.

A radiação ultravioleta é a região do espectro eletromagnético compreendida entre 100 e 400 nm, sendo dividida, segundo sua faixa de comprimento de onda, em três regiões distintas: UVA ($\lambda = 320\text{-}400$ nm), UVB ($\lambda = 290\text{-}320$ nm) e UVC ($\lambda = 100\text{-}290$ nm). A radiação UVA ainda pode ser subdividida em UV-A1 ($\lambda = 340\text{-}400$ nm), e UV-A2 ($\lambda = 320\text{-}340$ nm) (SHAATH *et al.*, 2005).

Existem vários fatores que podem influenciar os níveis de radiação ultravioleta que chegam à superfície terrestre (IARC, 1992):

- Horário do dia: a quantidade de radiação recebida varia com os ângulos de incidência com que esta radiação chega à superfície terrestre. No horário de 6:30 h às 17:30 h observa-se maior incidência dos raios UVA e das 9:30 h às 15:00 h maior incidência dos raios UVB.
- Clima: há uma grande variação na quantidade de raios UV que chegam à superfície terrestre, nas regiões de clima temperado. Esta variação é muito menor que nas regiões próximas ao Equador.
- Latitude: a incidência anual de raios UV diminui quanto maior a distância do Equador.
- Altitude: os níveis de radiação UV são muito menores em regiões abaixo do nível do mar. Observa-se que um aumento de 300 m de altitude aumenta em cerca de 4% a intensidade da luz solar.
- Presença de nuvens: a presença de nuvens reduz os raios UV que chegam à superfície terrestre. Em dias nublados, recebe-se aproximadamente 10% a menos da radiação UVB do que em dias ensolarados (RAMOS, 1995).

Aproximadamente 30-40% da radiação UV são absorvidas pelas camadas mais externas da atmosfera terrestre através da camada de ozônio. A camada de ozônio filtra

a radiação UV abaixo de 290 nm. Portanto, as radiações UVC e UVB de baixo comprimento de ondas são bloqueadas, e uma quantidade mínima da radiação UVA é filtrada (SHAATH *et al.*, 2005).

A depleção da camada de ozônio tem um impacto direto sobre o aumento da exposição da radiação UV na superfície terrestre. Estima-se que 1% da diminuição da camada de ozônio ocasione um aumento de 1 a 2% dos casos de melanomas malignos (KULLAVANIJAYA & LIM, 2005).

3.1.2 Efeitos Benéficos da Radiação Ultravioleta.

A exposição à luz solar, dependendo da intensidade, frequência e características individuais, pode resultar em efeitos benéficos ao ser humano: sensação de bem estar físico e mental; estímulo da circulação sanguínea periférica; elevação na capacidade de formação da hemoglobina; prevenção e cura do raquitismo; melhora no tratamento da psoríase e de certas infecções cutâneas e estímulo da produção de melanina, com conseqüente bronzeamento (VELASCO DE PAOLA & RIBEIRO, 1998; KULLAVANIJAYA & LIM, 2005). Entretanto, a radiação solar também pode causar danos ao organismo, caso não se tome os devidos cuidados com o tempo de exposição.

3.1.3 Efeitos Nocivos da Radiação Ultravioleta.

A radiação UVA predomina sobre os raios UVB na superfície terrestre e penetra profundamente na derme (FIGURA 2). Os efeitos em curto prazo desencadeados pela exposição solar, na faixa da radiação UVA (315 a 400 nm) são: pigmentação imediata da pele, que é provocada pelo aumento da atividade da tirosinase e pela fotooxidação da melanina existente; mudanças na distribuição dos melanócitos na epiderme e eritema que pode ser induzido por ambas às radiações UVA e UVB. A resposta à radiação UVA

é variável para cada indivíduo (SHAATH *et al.*, 2005; SCHUELLER & ROMANOWSKI, 2000).

A exposição solar crônica, ou seja, a exposição prolongada e excessiva na faixa da radiação UVA resulta no fotoenvelhecimento, que ocorre quando elementos chave de suporte da pele são danificados por esta radiação. Trata-se de um processo cumulativo que contribui para a formação de rugas, flacidez e outros sinais de envelhecimento precoce e como consequência mais grave, pode-se citar a indução ao câncer de pele, dependendo da tonalidade da pele, tempo e intensidade de exposição (VELASCO DE PAOLA & RIBEIRO, 1998).

A radiação UVA também pode causar danos no DNA por processos oxidativos através da geração de espécies reativas de oxigênio. Estas espécies reativas induzem ao aumento da síntese de melanina, ocasionando o bronzeamento da pele. Além disto, pode causar peroxidação das membranas lipídicas das células gerando inflamação cutânea. Esta oxidação de lipídios e proteínas pode afetar no reparo do DNA. Deste modo, a radiação UVA danifica o DNA pela quebra dos filamentos e pela oxidação dos ácidos nucleicos (SHAATH *et al.*, 2005).

A radiação UVB é predominante na superfície terrestre no período entre 10 e 14 horas. Ela afeta principalmente a camada epidérmica da pele (FIGURA 2), onde causa eritema (queimadura solar), que aparece de 3 a 4 horas após a exposição e se intensifica de 12 a 24 horas. É acompanhado por edemas, dores, prurido, pela formação de bolhas e espessamento da epiderme e da derme (KULLAVANIJAYA & LIM, 2005).

A exposição excessiva frente à radiação UVB pode causar fotoenvelhecimento, imunossupressão e fotocarcinogênese, pois as bases do DNA e das proteínas são capazes de absorver a radiação UVB. Quando os ácidos nucleicos absorvem esta radiação são formados fotoprodutos, como dímeros de pirimidina. Esses fotoprodutos podem ser

mutagênicos ou citotóxicos se não forem reparados (VELASCO DE PAOLA & RIBEIRO, 1998; OSTERWALDER, LUTHER & HERZOG, 2000).

Os raios UVC são portadores de elevada energia, característica que os torna extremamente lesivos aos seres vivos. São absorvidos pelas camadas mais elevadas da atmosfera e estratosfera e a camada de ozônio impede que atinjam a superfície terrestre. Esta propriedade justifica a preocupação com a destruição desta camada (VELASCO DE PAOLA & RIBEIRO, 1998).

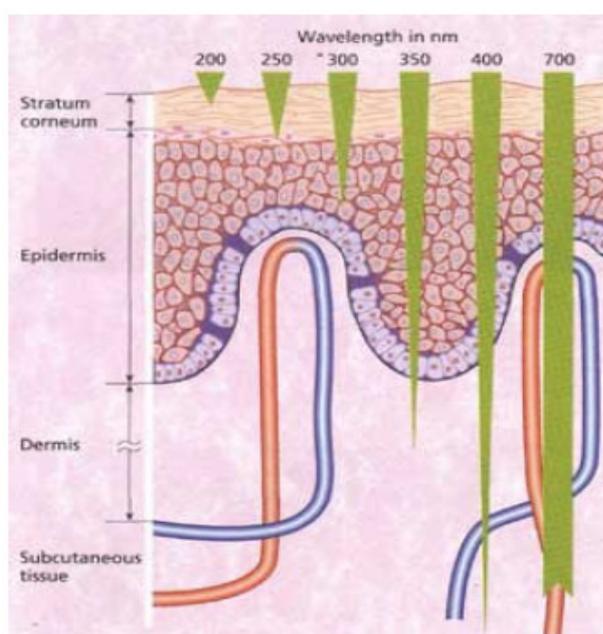


FIGURA 2: Penetração da radiação UV e visível na pele. Disponível <<http://www.corpore.org.br/.../dicas.1-radiacao.pele.jpg>>

3.2. Pele, Estrutura e Vias de Penetração Cutânea.

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a aproximadamente 15% do peso corporal. A pele humana é composta principalmente de duas partes: epiderme e derme. A epiderme é constituída por tecido epitelial de revestimento e a derme por tecido conjuntivo, que correspondem às fibras colágenas e elásticas envoltas por substância fundamental (gel composto principalmente por mucopolissacarídeos ácidos); vasos sanguíneos e linfáticos; nervos e terminações nervosas, além dos

folículos pilosebáceos e glândulas sudoríparas (FIGURA 3). A epiderme apresenta como principal função a proteção e o equilíbrio hidroeletrolítico e a derme possui funções de termoregulação, percepção e proteção (AZULAY & AZULAY, 1999; DANGELO & FANTINI, 2005; RIBEIRO, 2006).

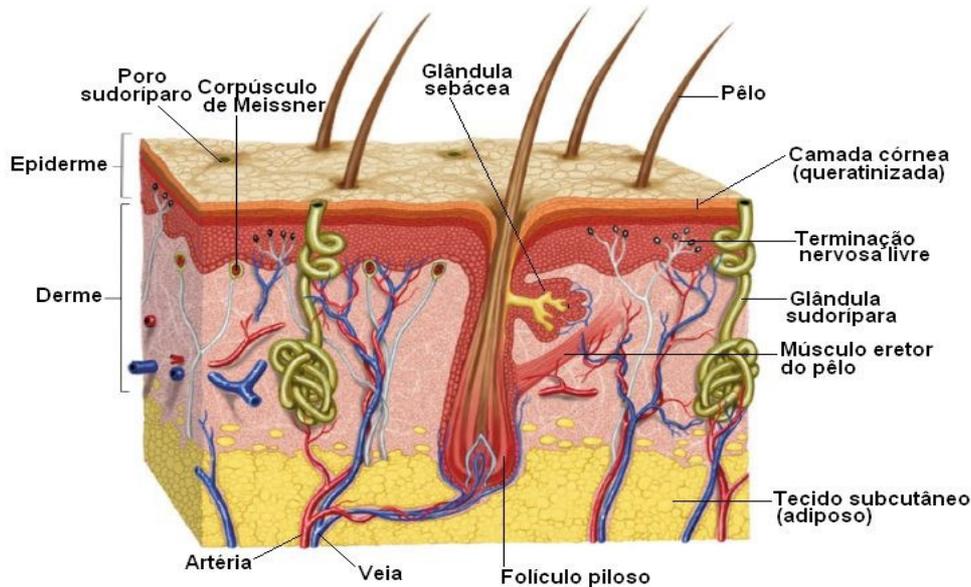


FIGURA 3: As três camadas da pele: epiderme, derme e tecidos subcutâneos. Disponível em <<http://www.afh.bio.br/sentidos/img/sentidos%20pele.jpg>>.

A epiderme é a camada mais externa da pele e sua espessura varia de acordo com a região do corpo. É um tecido epitelial estratificado, avascular e possui uma estrutura multilamelar (AZULAY & AZULAY, 1999; ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000), sendo subdividida em: camada córnea, a mais externa, camada granulosa, camada espinhosa e por último a camada basal. Em movimento ascendente de proliferação da camada basal, as células se alteram de forma ordenada, metabolicamente ativa e dividem-se em células densas, funcionalmente mortas e queratinizadas. As últimas células são envolvidas por bicamada lipídica multilamelar constituindo a última camada da epiderme, o estrato córneo (EC) (DANGELO & FANTINI, 2005).

Na epiderme, encontra-se o sistema melanocítico formado pelos melanócitos. Os melanócitos são células produtoras de melanina e localizam-se ao nível da camada basal. A melanina é um pigmento capaz de refletir e absorver a radiação visível e UV, e dissipá-la, preferencialmente, na forma de calor, protegendo a pele (KULLANIJAYA & LIM, 2005).

O ácido urocânico, também localizado na epiderme, tem absorção máxima em 277 nm, constituindo um papel importante na proteção do tecido contra a radiação solar (KULLANIJAYA & LIM, 2005).

A camada basal ou camada germinativa é composta por células jovens, colunares e justapostas, responsáveis pela renovação das células da epiderme. As células da camada espinhosa apresentam projeções citoplasmáticas, os desmossomas, que ancoram as células umas às outras. Nos estratos mais externos da camada espinhosa, a célula começa a se tornar mais parecida com as células do estrato granuloso. A camada granulosa é constituída por células granulosas, que possuem grânulos de querato-hialina em seu citoplasma e são precursores da queratina do EC (ZATZ, 1993; AZULAY & AZULAY, 1999; MENON, 2002).

A camada córnea ou EC é a camada mais externa da pele, sendo formada por cerca de 18 a 21 camadas de células mortas, secas, alongadas, chamadas de corneócitos. Os corneócitos são os produtos finais da diferenciação dos queratinócitos, que são as células produzidas na epiderme viável; são compostos principalmente de queratina (MENON, 2002).

O espaço entre os corneócitos é preenchido por lipídios, dessa maneira é possível observar na barreira da pele dois componentes: o componente hidrofílico, a queratina, e o componente hidrofóbico, os lipídios. Portanto, o EC pode ser descrito como uma “parede de tijolos”. Os corneócitos repletos de queratina podem ser

simbolizados por “tijolos”, enquanto as regiões lipídicas entre as células agem como “cimento” (MOSER, 2001; BOUWSTRA, 2002; MENON, 2002).

Os lipídios encontrados no EC estão organizados em camada dupla, formando estruturas arredondadas. Essa barreira de lipídeos é composta de 40-49% de ceramidas; 20-25% de colesterol; 10% de sulfato de colestera; 0,7% de éster de colestera; 0,1% de fosfolipídios; 2,6% de triacilgliceróis e cerca de 25% de ácidos graxos livres. Os lipídios são responsáveis pela função de barreira à perda de água e à entrada de substâncias no EC. A quantidade de lipídios varia de 3 a 46% nas diferentes áreas do corpo (MOSER, 2001; BOUWSTRA, 2002).

A camada córnea é a principal barreira física contra a entrada de substâncias na pele e a perda de água, embora seja levemente permeável à água; impede a penetração da radiação UV, sendo capaz de refletir de 5 a 10% da luz solar (MENON, 2002; LÉPORI, 2002).

A permeação de substâncias na pele pode ocorrer por difusão passiva através da penetração transcelular, intercelular e transanexal por meio dos folículos pilosos, glândulas sudoríparas e dispositivos pilosebáceos (FIGURA 4). Entretanto, a penetração dos ativos pelos apêndices não é significativa, uma vez que estas estruturas representam uma pequena fração da área superficial da pele (apenas 1%) (SUHONEN, 1999; BARRY, 2001; HADGRAFT, 2001).

A via transcelular requer múltipla partição dos ativos entre os corneócitos e os lipídios intercelulares, o que dificulta a permeação por esta via (MIGRATORI, 2000). Na via intercelular, a molécula passa através dos domínios lipídicos, situados entre os corneócitos. Este transporte envolve uma interação do soluto com os componentes lipídicos do espaço intercelular. É considerada a principal via para a permeação da maioria dos fármacos (SUHONEN, 1999). Entretanto, para ambas as vias, a estrutura do

EC controla a difusão dos permeantes, pois se comporta como uma membrana artificial semi-permeável.

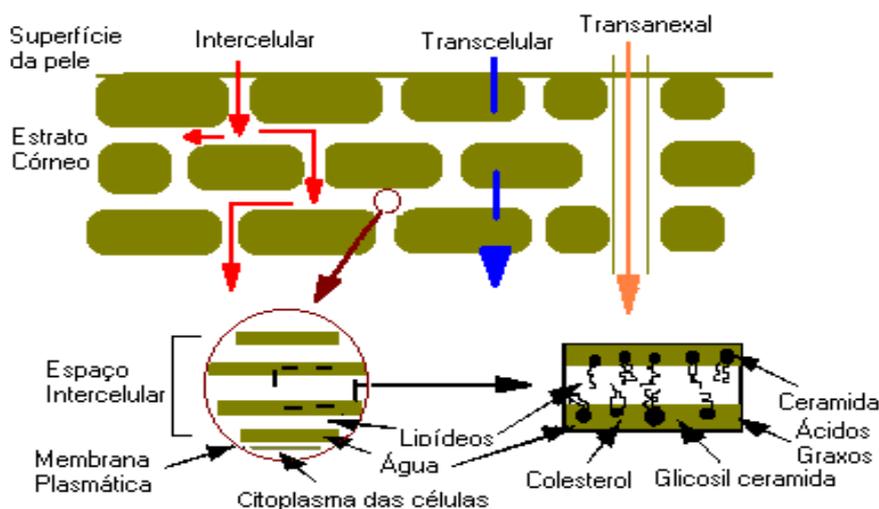


FIGURA 4: Representação diagramática do transporte de fármacos através da principal via no estrato córneo: o espaço intercelular. Adaptado de BARRY, 1987.

De acordo com Blanco e colaboradores (2003), as substâncias administradas pela via tópica ou transdérmica deveriam possuir propriedades físico-químicas específicas para possibilitar sua penetração na pele: elevada lipofilicidade, solubilidade em óleo e possuir baixo peso molecular, em geral menor que 500 Da. Desta forma, o ativo destinado à proteção solar deve ter peso molecular superior, pois será mais difícil sua permeação. Caso contrário, poderá passar pelos domínios lipídicos entre os corneócitos e difundir-se através das diferentes camadas da epiderme implicando em alguma absorção sistêmica (MARTINI & SEILLER, 2006).

É importante ainda, que os filtros solares apresentem uma adequada lipofilicidade, propriedade essencial para que estas moléculas fiquem aderidas aos domínios lipídicos do EC (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2001). Devido a estes fatores citados, tornam-se necessários realizar ensaios para avaliar a penetração/permeação cutânea destas moléculas.

Outro fator que deve ser considerado é a natureza dos componentes da formulação, pois estes podem promover modificações nas propriedades do EC, alterando sua resistência natural, retendo ou liberando a substância ativa para a pele. Dentre eles pode-se citar: água; tensoativos; ácidos graxos; álcoois, álcoois graxos e glicóis; uréia e outros (LEONARDI & CAMPOS, 1997; WILLIAMS & BARRY, 2004); assim como, sistemas nanoestruturados como lipossomas e ciclodextrinas (LEONARDI & CHORILLI, 2006; LOFTSSON & MASSON, 2001).

Os fatores biológicos que podem alterar a permeabilidade da pele incluem: o estado da pele; a presença de alguma patologia; a idade da pele; o fluxo sanguíneo; o metabolismo; região da aplicação; grau de hidratação e o modo de aplicação de uma formulação (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000; AULTON, 2005).

3.2.1 Aspectos Teóricos sobre Mecanismos de Penetração Cutânea.

A penetração cutânea de ativos na pele ocorre através da difusão passiva e tem como etapa limitante a camada com maior resistência à difusão, o EC. No processo de difusão passiva, as moléculas se movem de uma região do sistema mais concentrada para outra região menos concentrada, sem que haja gasto de energia. Este processo ocorre de maneira aleatória e depende de um gradiente de concentração (HADGRAFT, 2001; NETZ, GONZALEZ & ORTEGA, 2002).

O processo de difusão de ativos através do EC pode ser explicado através de três etapas:

- 1) O ativo difunde-se dentro da formulação para a superfície do EC;
- 2) Ocorre a passagem do ativo para o interior do EC, controlada pelo coeficiente de partição;
- 3) O ativo difunde-se através do EC.

O processo de transporte de ativos na/atr v s da pele pode ser descrito pela primeira Lei de Fick (EQUAÇÃO 1). A hipótese básica   que a taxa de transferência da substância difundida, por unidade de área de uma se o,   proporcional ao gradiente de concentra o, medido perpendicularmente a esta se o (AULTON, 2005).

EQUAÇÃO 1: Primeira Lei de Fick.

$$J_{ss} = \frac{D \cdot K_p \cdot (C_1 - C_2)}{h}$$

A primeira lei de difusão de Fick   empregada para descrever o fluxo (J) que se estabelece no estado estacionário (SS) por  rea. Relacionando: a parti o do permeante entre a formula o aplicada e a pele (Kp), o coeficiente de difusão (D), a diferença de concentra o do permeante através da pele ($C_1 - C_2$) e do comprimento difusional (h) em fun o do tempo, obedecendo   condi o *sink* (MOSER, 2001; HADGRAFT, 2001).

Esta Lei   aplicável somente para membranas homog neas, isto  , que não apresentem varia o no coeficiente de permeabilidade ao longo de sua espessura. Portanto, o fluxo de passagem de uma substância   constante desde o início. Porém, isso não   observado para uma membrana heterog nea como a pele, ou mais especificamente para o EC (AULTON, 2005).

A segunda lei de Fick leva em considera o as varia es que uma membrana heterog nea e complexa como a pele oferece. A segunda lei   aplicada para saber como varia a concentra o do fármaco no interior da membrana em fun o do tempo (SINGH & SINGH, 1993). A mudança na quantidade cumulativa do fármaco (Q) que passa

através da membrana, por unidade de área, como função do tempo está representada na FIGURA 5.

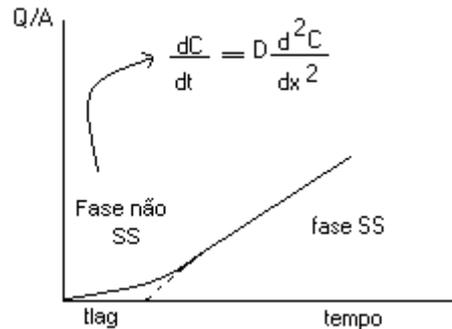


FIGURA 5: Representação gráfica do lag-time (*t_{lag}*). Adaptado de Freitas (2005).

Quando a linha do SS é extrapolada até o eixo x (tempo), o intercepto corresponde ao *t_{lag}* (ROUGIER *et al.*, 1990), que é definido como o tempo em que o gradiente de concentração do fármaco se estabiliza no interior da membrana.

Assumindo que a concentração do fármaco no compartimento doador é constante, que a condição *sink* é perfeita, que não há degradação ou ligação do permeante na membrana e que o equilíbrio na interface é instantâneo, o desdobramento matemático da 2ª lei de Fick, resultará no tempo infinito, na expressão abaixo (EQUAÇÃO 2):

EQUAÇÃO 2: Equação do estado estacionário.

$$Q/A = K_p D C_d / h (t - t_{lag})$$

Quando $Q = 0$ (extrapolação da linha SS), o intercepto no eixo X corresponde ao *t_{lag}* (FIGURA 5); a equação acima resultará em (EQUAÇÃO 3):

EQUAÇÃO 3: Equação *t_{lag}*.

$$t_{lag} = h^2 / 6D$$

De modo que, pode-se estimar o coeficiente de difusão (D), conhecendo-se a espessura da membrana (h).

3.3. Filtros Solares.

Durante os últimos 40 anos, um grande número de diferentes moléculas foi introduzido no mercado mundial para atuarem como filtro solar: ácido tânico (1925); salicilato de benzila (1931); derivados do ácido para-aminobenzóico (PABA) e derivados de 2-fenilimidazóis (1942); ácido antranílico (1950); vários cinamatos (1954); e benzofenonas (1965) (URBACH, 2001).

Atualmente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) disponibiliza a listagem das substâncias químicas orgânicas e inorgânicas que podem ser utilizadas como filtros solares (ANVISA, 2006).

Na última década, os filtros solares têm sido utilizados como uma proteção contra o fotoenvelhecimento, fotoalergias, câncer de pele e danos causados por radicais livres. As preparações anti-solares mais modernas utilizam uma combinação de diversos filtros orgânicos e inorgânicos, para garantir proteção frente à radiação ultravioleta (NOHYNEK & SCHAEFER, 2001; DAMIANI *et al.*, 2006).

3.3.1. Filtros Inorgânicos.

Os filtros solares inorgânicos, dióxido de titânio e dióxido de zinco, refletem e dispersam a radiação ultravioleta e visível. Porém, dependendo do tamanho da partícula, também podem absorver a radiação ultravioleta. Estes filtros são muito foto-estáveis e devido as suas propriedades de espalhamento de luz; apresentam menor variabilidade no seu efeito fotoprotetor quando comparados aos filtros orgânicos. Além disso, não

apresentam propriedades irritantes nem sensibilizantes a pele humana (SHAATH, 1997; LAUTENSCHLAGER, WULF & PITTELKOW, 2007).

De uma maneira geral, os filtros inorgânicos são considerados mais seguros. De acordo com Lautenschlager, Wolf & Pittelkow (2007), não foram encontradas evidências da penetração do dióxido de titânio e do óxido de zinco em estudos *in vitro* empregando sistema bicompartimental de difusão vertical e pele animal (pele suína). Assim como nos estudos de retenção *in vitro*, através da técnica de *tape stripping* utilizando pele suína, não foi demonstrada a penetração dos filtros inorgânicos através do EC (SCHULZ *et al.*, 2002), indicando que estes filtros não têm a capacidade de permear a pele, evitando efeitos adversos.

Os filtros inorgânicos são cosmeticamente inaceitáveis devido a sua opacidade e oclusividade, pois proporcionam uma película branco-leitosa sobre a pele. Recentemente, têm-se desenvolvido filtros solares inorgânicos micronizados e encapsulados de alta qualidade. Com a redução do tamanho das partículas para 10-50 nm ocorre a diminuição do espalhamento da luz visível, levando ao desenvolvimento de um produto cosmético esteticamente mais aceitável (FLOR, DAVOLOS & CORREA, 2007; LAUTENSCHLAGER, WOLF & PITTELKOW, 2007).

As preparações anti-solares que contêm somente filtros inorgânicos são geralmente recomendadas para crianças, isto ocorre devido à baixa penetração e subsequente degradação destas substâncias no corpo. Observa-se ausência de relatos de casos de fotoalergia e de fototoxicidade *in vivo* com estes tipos de preparações (LAUTENSCHLAGER, WOLF & PITTELKOW, 2007).

3.3.2. Filtros Orgânicos.

A maioria dos filtros orgânicos são compostos aromáticos, dissustituídos, com um grupamento carbonila (do tipo cetona ou éster), e um substituinte com par de elétrons livres (amina ou metoxila) doadores de elétrons, normalmente em posição *orto* ou *para* ao grupamento carbonila (FIGURA 6). Ao absorverem a radiação ultravioleta, os elétrons situados no orbital π HOMO (orbital molecular preenchido de mais alta energia) são excitados para o orbital π^* LUMO (orbital molecular vazio de mais baixa energia) e ao retornarem para o estado inicial, o excesso de energia é liberado em forma de calor. As transições eletrônicas que estão envolvidas durante a absorção da luz ultravioleta ocorrem entre a diferença de energia HOMO-LUMO (FLOR, DAVOLOS, & CORREA, 2007).

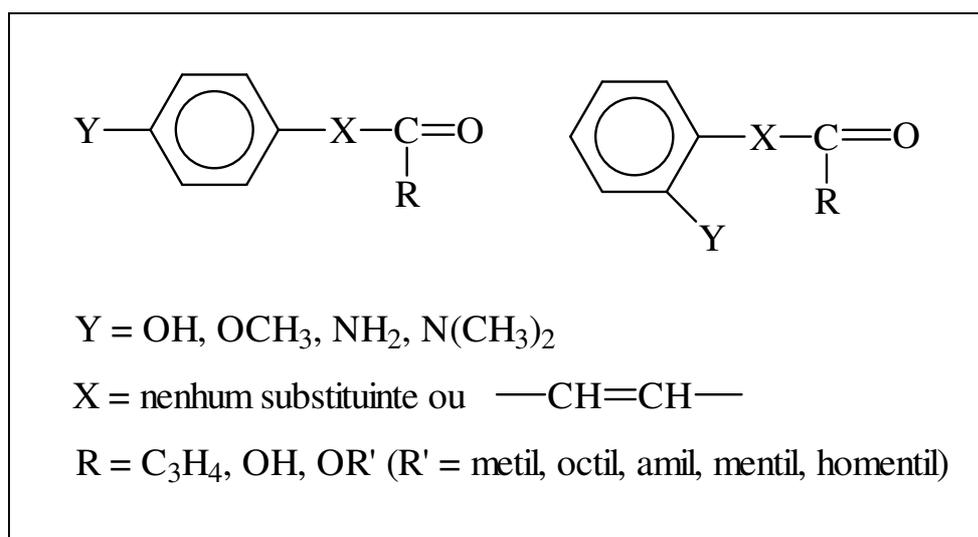


FIGURA 6 - Fórmula estrutural genérica da maioria dos filtros solares orgânicos.
Adaptado de SHAATH, 1997.

Sendo assim, substâncias que apresentam a configuração citada acima absorvem a radiação ultravioleta de menor comprimento de onda, ou seja, comprimento de onda que transporta alta energia, e liberam esta energia na forma de uma radiação de elevado comprimento de onda, ou seja, baixa energia. A energia absorvida da radiação

ultravioleta corresponde à energia requerida para causar uma excitação fotoquímica na molécula do filtro solar.

Os filtros solares orgânicos são classificados em filtros solares UVA e UVB dependendo do tipo de radiação a qual eles conferem proteção (SHAATH, 1997):

- Filtros solares UVA absorvem radiação entre 320 a 360 nm. Exemplo: benzofenonas e antranilatos.
- Filtros solares UVB absorvem radiação entre 290 e 320 nm. Exemplo: PABA, salicilatos e cinamatos.

Formulações antisolares contendo filtros solares UVB já são utilizadas com frequência por décadas, enquanto que as com filtros solares UVA e de amplo espectro foram desenvolvidas mais recentemente (LAUTENSCHLAGER, WULF & PITTELKOW, 2007).

3.3.3. *p*-Metoxicinamato de octila.

O *p*-metoxicinamato de octila ou *p*-metoxicinamato de 2-etil-hexila ou octilmetoxicinamato (MCO) (FIGURA 7) é um filtro solar químico derivado da classe dos cinamatos que absorve na faixa do UVB e apresenta absorção máxima em 310 nm.

Na estrutura molecular dos cinamatos há uma insaturação extra conjugada com o anel aromático e o grupamento carbonila que permite a maior distribuição eletrônica. A energia capaz de gerar essa transição eletrônica corresponde ao comprimento de onda nas proximidades de 305 nm. A presença do grupamento 2-etilhexil no carbono 8 da molécula do MCO diminui sua solubilidade em água aumentando a substantividade das formulações fotoprotetoras que o contém (SHAATH, 1997).

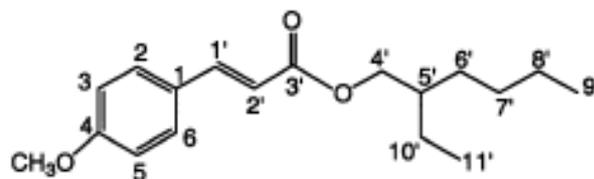


FIGURA 7: Estrutura do *p*-metoxicinamato de octila (SCALIA *et al.*, 2002).

O MCO foi desenvolvido na década de 50 e atualmente é empregado na maioria das preparações antisolares. De acordo Summers e colaboradores (2005), dentre os 105 produtos fotoprotetores analisados, 88,2% continham MCO. Além disso, foram relatados poucos casos de reações de fotoalergias e fotosensibilizações induzidos por esta molécula (PATTANAARGSON, 2004).

O MCO é um líquido oleoso, transparente, levemente amarelado, inodoro, insolúvel em água, solúvel em etanol e óleo mineral. Seu peso molecular é 290,4 e o ponto de ebulição está na faixa de 185-195°C (THE MERK INDEX, 2001; MARTINDALE, 1999).

O principal problema relacionado ao uso do MCO é a sua capacidade de sofrer fotoisomerização. O produto originado da foto decomposição do MCO é o *cis*-MCO. O isômero *cis* tem uma reduzida absorvidade no UV quando comparado com o *trans*-MCO (SUMMERS, 2005). Nos estudos de Huang (2007), foi verificado que uma taxa de isomerização de 20% do MCO acarretou a diminuição de aproximadamente 10% do FPS na formulação e, para uma taxa de isomerização de 60% do MCO, a queda no FPS pode variar entre 29% e 38%.

Segundo Schlumpf e colaboradores (2004) o MCO foi capaz de estimular a proliferação *in vitro* de células MCF-7 (células sensíveis ao estrogênio) e apresentar atividade estrogênica no teste uterotrófico com ratas *Long-Evans* jovens. Em relação a ações hormonais, este filtro apresentou atividade antiandrogênica nas concentrações de 1,0 nM até 10,0 nM, quando testados em receptores de células MDA-kb2 de carcinoma

de mama humana (MA *et al.*, 2003). Outro estudo demonstrou o aumento da produção de vitelogenina, um marcador clássico de atividade estrogênica, em peixes Medaka machos (INUI *et al.*, 2003).

Os fabricantes na tentativa de tornar os filtros solares mais resistentes à água os tornam mais lipofílicos. Sendo que o aumento da lipofilicidade destas moléculas pode favorecer a absorção cutânea das mesmas, o que não é desejável. O filtro solar deve cobrir e proteger a pele, desenvolvendo suas atividades nas camadas superiores do tecido cutâneo, no EC (PETRAZZUOLI, 2000; NOHYNEK & SCHAEFER, 2001; KULLAVANIJAYA & LIM, 2005).

Segundo Gonzalez (2006), uma formulação contendo 4% de benzofenona-3 (BP-3) que foi aplicada topicamente em 25 voluntários, cerca de 3,7 % desta quantidade de BP-3 foi encontrada na urina, durante os 10 dias da aplicação. Este ativo continuou sendo encontrado na urina, de 24 voluntários, cinco dias após a última aplicação. No estudo de Suzuki e colaboradores (2005), as benzofenonas hidroxiladas demonstraram uma atividade estrogênica *in vitro* sobre as células mamárias cancerígenas MCF-7.

De acordo com Sarveiya, Risk & Benson (2004) uma quantidade significativa dos filtros solares como oxibenzona, *p*-metoxicinamato de 2-etil-hexila, octilsalicilato e homosalato foram encontrados em camadas mais profundas do EC, 30 minutos após a aplicação em voluntários. Esta quantidade encontrada diminuiu 4 horas após a aplicação, sugerindo que pode ter ocorrido absorção para camadas mais profundas da pele, e aproximadamente 1% da dose aplicada de oxibenzona e seus metabólitos foram encontrados na urina após uma única aplicação. Além disso, estes filtros solares também foram detectados em amostras de leite materno de voluntárias (total de 16-417 ng/g de gordura) (HANY & NAGEL, 1995).

Sistemas nanoestruturados como lipossomas, ciclodextrinas, microsferas poliméricas e nanosferas, têm sido empregados para assegurar a presença de filtros solares nas últimas camadas da pele, proporcionando maior eficácia dos nanocosméticos. As vantagens da veiculação de ativos cosméticos em sistemas nanoestruturados são: melhoria das propriedades biofarmacotécnicas dos ativos, como o aumento da retenção dos ativos no EC, diminuindo sua permeação cutânea e aumentando seu Fator de Proteção Solar (FPS); controle da liberação e aumento da fotoestabilidade (GARCIA, 1998; SCALIA, 1998; PERUGINE, 2002; SCALIA, 2002; YENER, 2003; JIMÉNEZ, 2004; MOTA, 2005).

3.4. Lipossomas.

Bargham e colaboradores (1963) foram os primeiros a descrever o comportamento de fosfolipídios, quando colocados em solução aquosa, formando lipossomas a partir da agregação espontânea de moléculas (BARGHAM *et al.*, 1963).

Os lipossomas são vesículas, nas quais o veículo aquoso é totalmente cercado pela membrana composta de moléculas lipídicas (FIGURA 8). As vesículas possuem uma ou mais bicamadas lipídicas que aprisionam compartimentos aquosos. A estrutura básica em bicamada dos lipossomas é similar à das membranas celulares (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000; GÓMEZ-HENZ & FERNANDEZ-ROMERO, 2006).

Os lipossomas podem ser preparados a partir de moléculas de fosfolipídios que podem ser extraídas e purificadas de fontes naturais ou de síntese química e podem conter outros constituintes na bicamada, como o colesterol e os polímeros hidrofílicos (LIAM & HO, 2001).

Inicialmente, os lipossomas tiveram um grande interesse como carreadores de fármacos para a administração intravenosa, uma vez que os lipossomas podem fundir-se

com a membrana plasmática das células do sítio alvo. Entretanto, a meia-vida dessas substâncias foi encurtada devido aos mecanismos de defesa do sistema mononuclear fagocitário, retirando os lipossomas rapidamente da circulação (GLAVAS-DODOV *et al.*, 2002).

Nos últimos anos os lipossomas (FIGURA 8) passaram a assumir um papel importante nas áreas da dermatologia e cosmetologia. Os lipossomas têm sido amplamente utilizados como veículo em formulações cosméticas, em razão da sua estrutura, a qual proporciona a encapsulação de substâncias ativas hidrofílicas e lipofílicas. Os ativos lipofílicos podem ser incorporados na bicamada lipídica, e os ativos hidrofílicos são solubilizados no interior do espaço aquoso (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000; MEHNERT & MADER, 2001). Além disto, a sua estrutura de bicamada é semelhante à estrutura das membranas celulares, os que os tornam capazes de interagir com as células do organismo (RAMÓN *et al.*, 2005).

Sendo assim, as principais vantagens para a utilização dos lipossomas são: baixa toxicidade do sistema vesicular, diminuição de efeitos adversos de fármacos, aumento da eficácia terapêutica, que consiste na redução das concentrações dos ativos nas formulações lipossomais para a obtenção do mesmo efeito terapêutico e biodegradabilidade. A biodegradabilidade e a baixa toxicidade dos lipossomas são conferidas pelos fosfolipídios que os constituem, garantindo uma grande similaridade com as membranas celulares (SUZUKI & SAKON, 1990; NEW, 1997).

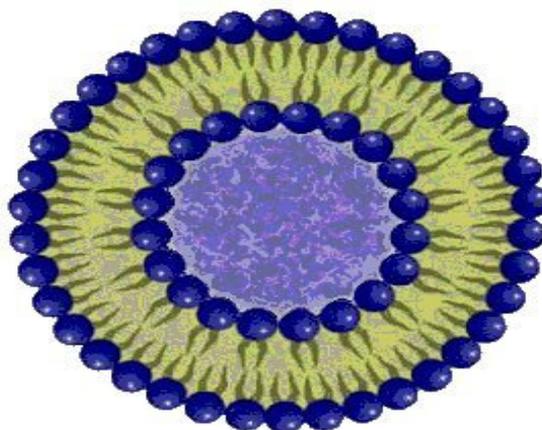


FIGURA 8: Estrutura do lipossoma. Disponível em <<http://www.uni-magdeburg.de>>.

Os lipossomas foram desenvolvidos para melhorar a biodistribuição de fármacos em locais específicos do corpo humano. Portanto, passaram a ser reconhecidos como transportadores de compostos biologicamente ativos, tendo a capacidade de potencializar e/ou modificar a atividade dos compostos com os quais eles estão associados. Este efeito é dependente da composição química e da estrutura fosfolipídica (GÓMEZ-HENZ & FERNANDEZ-ROMERO, 2006).

A transferência ou troca de lipídios tem um efeito especial na aplicação cosmética, já que os lipossomas podem alterar as propriedades cutâneas através do fornecimento de fosfolipídios, ceramidas e colesterol e outros componentes para a pele. Segundo Imbert e colaboradores (1994), os lipossomas aumentam as concentrações do ativo, tanto na epiderme como na derme, e reduzem a absorção sistêmica (BETZ *et al.*, 2005).

O caráter mimético do lipossoma em relação às estruturas lipídicas do EC sugere que os fosfolipídios deste sistema ligam-se superficialmente à camada de queratina do EC, recobrando a pele com um filme lipídico. A forte afinidade da queratina pelos lipossomas leva à ruptura de algumas vesículas, e, posteriormente, os fosfolipídios não ligados à bicamada lipídica, podem penetrar nas camadas mais profundas da pele,

podendo desorganizar a estrutura de bicamada do EC, diminuindo a função de barreira (ELSAYED *et al.*, 2007).

A analogia estrutural do EC com o lipossoma permite que o tecido cutâneo retenha este sistema nanoestruturado, promovendo um “efeito reservatório”, com liberação sustentada do ativo, proporcionando ação prolongada, melhorando a atividade do ativo no sítio alvo (VAN DER BERGH *et al.*, 1999; BETZ *et al.*, 2005).

A FIGURA 9 faz a comparação entre uma formulação de uso tópico convencional e outra contendo lipossoma. Na formulação com lipossoma pode-se observar maior concentração deste sistema na epiderme e conseqüentemente maior concentração de ativos, e menor absorção sistêmica, o que é desejável em uma formulação tópica (PUGLIA *et al.*, 2004; ELSAYED *et al.*, 2007).

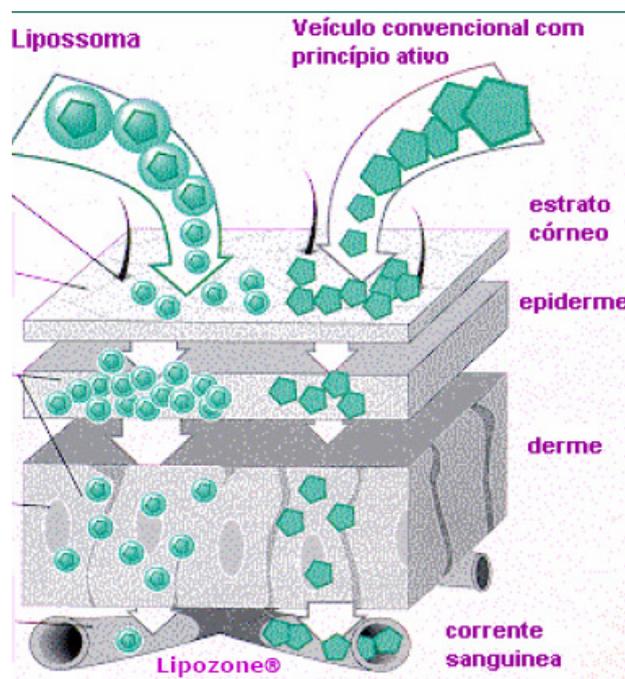


FIGURA 9: Demonstração do efeito reservatório do Lipossoma. Adaptado do Catálogo Lipo Chemicals INC. and Biozone Laboratories INC.

A forma e o tamanho dos lipossomas depende do método de preparação, da composição dos lipídios, da força iônica do meio e do pH. Portanto, os lipossomas

podem ser classificados com base na sua composição, tamanho e número das bicamadas lipídicas (NEW, 1997; ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000).

Dentre os diferentes fosfolipídios que podem fazer parte na formação das bicamadas vesiculares lipossomais pode-se citar: fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina hidrogenada, 1,2 dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), colesterol, 1,2-diolenoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) (MELO *et al.*, 2003). Entretanto, as moléculas de fosfatidilcolina (PC) são as mais utilizadas por possuírem carga neutra e inércia química. A PC obtida de fontes naturais é constituída por uma mistura de fosfatidilcolinas, cada uma com cadeias de tamanhos diferentes e com vários graus de insaturação (NEW, 1997). No mercado existe uma variedade de fosfolipídios sintéticos que podem ser utilizados nas preparações lipossomais (VEMURI & RHODES, 1995; GÓMEZ-HENS & FERNÁNDEZ-ROMERO, 2005).

O colesterol e os agentes indutores de carga facilitam a interação das bicamadas no processo de formação das vesículas, estabilizam os lipossomas evitando o processo de fusão e coalêscencia das vesículas e o esvaziamento do material incorporado. Portanto, o uso de colesterol aumenta a estabilidade, e a resistência das vesículas pela diminuição da fluidez da membrana lipossomal. Embora o colesterol não seja essencial para a formação dos lipossomas, ele traz outros benefícios, como o aumento da retenção de substâncias hidrossolúveis e resistência à biodegradação *in vivo*. Na literatura é descrita a faixa de 30%-50% como uma quantidade ótima de colesterol em relação à massa da membrana do lipossoma (YAROSH, 2001; LIAN & HO, 2001; ELSAYED *et al.*, 2007).

A FIGURA 10 mostra que o tamanho dos lipossomas pode variar de vesículas muito pequenas (0,025 μm) até vesículas grandes (3500 nm). Estes sistemas

nanoestruturados podem possuir membranas simples ou múltiplas bicamadas. Baseado nesses dois parâmetros, tamanho e número de bicamadas, os lipossomas podem ser classificados em três categorias: *vesículas multilamelares grandes* (VMG) são formadas por múltiplas bicamadas, com diâmetro que varia de 400 a 3500 nm e apresentam grande capacidade de encapsulação de ativos lipofílicos. Tem como principal vantagem, a facilidade de preparo, a qual requer um mínimo de equipamentos. Apresentam ainda maior estabilidade podendo ser armazenadas por longos tempos (SHARMA & SHARMA, 1997); *vesículas unilamelares pequenas* (VUP) são formadas por uma bicamada única, com diâmetro que varia de 25 a 50 nm. A principal vantagem é a população de vesículas relativamente homogênea. Porém, são consideradas termodinamicamente instáveis, susceptíveis a agregação e fusão. Existem também as *vesículas unilamelares grandes* (VUG), são formadas por uma bicamada única com elevada razão entre volume aquoso e taxa lipídica. Seu diâmetro varia de 200 a 1000 nm e sua vantagem é alta capacidade de encapsulamento de ativos hidrofílicos (SHARMA & SHARMA, 1997).

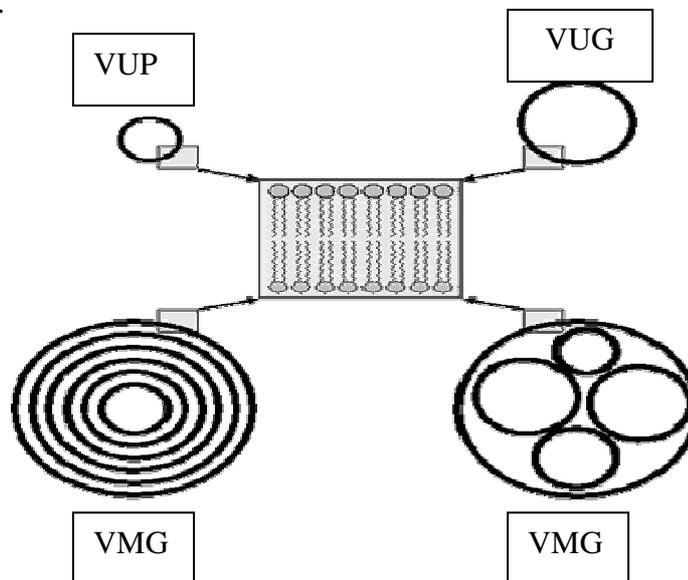


FIGURA 10: Classificação dos lipossomas de acordo com o tamanho e número de lamelas. Disponível em <<http://www.azonano.com/.../image002.gif>>.

A natureza e as características dos lipossomas são condicionadas pelo seu método de preparo. As VMGs geralmente são obtidas através do método de hidratação do filme lipídico (SANTOS & CASTANHO, 2002; ELSAYED *et al.*, 2007). As VUGs podem ser obtidas por diversos métodos, como: injeção de solvente (éter ou etanol), fusão induzida por cálcio e técnicas de evaporação em fase reversa (VEMURI & RHODES, 1995). As VUPs podem ser preparadas a partir das VMGs ou por técnicas comumente empregadas como sonicação das VUGs, extrusão, injeção de solvente ou por um método alternativo, através da injeção de etanol (SHARMA & SHARMA, 1997).

Algumas limitações são encontradas durante o processo de manufatura e desenvolvimento dos lipossomas, como a falta de reprodutibilidade do tamanho das vesículas, o alto custo dos processos de produção, a instabilidade e a baixa encapsulação dos ativos. A instabilidade física e química é um fator muito importante a ser considerado. A instabilidade física está relacionada com a fusão e com o crescimento dos lipossomas, formando vesículas maiores, este processo é conhecido como coalescência. Este processo pode levar ao rompimento das vesículas e ao extravasamento do material encapsulado (MEHNERT & MADER, 2001; EDWARDS & BAEUMNER, 2006). A instabilidade química está relacionada com a oxidação ou hidrólise dos lipídios utilizados na formação dos lipossomas. Na hidrólise, ocorre a formação da lisofosfatidilcolina. Estes processos químicos resultam em mudanças na permeabilidade da bicamada, podendo ser minimizados pela adição de antioxidantes como α -tocoferol ou BHT ou através da armazenagem dos lipossomas sob uma atmosfera de nitrogênio (HARRIGAN, MADDEN & CULLIS, 1990; EDWARDS & BAEUMNER, 2006).

A caracterização detalhada das estruturas dos lipossomas, incluindo distribuição de tamanho, número de bicamadas e volume de encapsulação é importante, pois, estes parâmetros fornecem informações sobre diferenças na estrutura causada por mudanças no método de preparo e na composição lipídica (RUOZI *et al.*, 2005).

A lamelaridade dos lipossomas pode ser avaliada através de RMN³¹P, microscopia eletrônica, técnicas baseadas nas mudanças de sinais visíveis e através da fluorescência de lipídios marcados com reagentes (EDWARDS & BAEUMNER, 2006). A determinação do tamanho médio dos lipossomas pode ser avaliada através do espalhamento dinâmico de luz laser (DLS), espectroscopia de correlação de fótons (ECF) e por diferentes tipos de microscopia, tais como: microscopia de transmissão (MET), microscopia de varredura (MEV), técnica de criofatura e microscopia de força atômica (RUOZI *et al.*, 2005).

O conteúdo de fosfolipídios dos lipossomas pode ser determinado através do ensaio de Bartlett, por métodos enzimáticos, por técnicas cromatográficas, como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG). Os métodos utilizados para a determinação da eficiência de encapsulação dependem da natureza do material encapsulado, entretanto, podem ser empregados: espectrofotometria, fluorescência, métodos enzimáticos, técnicas eletroquímicas e cromatográficas (EDWARDS & BAEUMNER, 2006).

3.5. Ciclodextrinas.

As ciclodextrinas (CDs) foram descobertas por Villiers em 1891 e caracterizadas no início do século XX por Schardinger. Entretanto, estes trabalhos não resultaram na aplicação da CD. Somente nos últimos vinte anos seu valor foi reconhecido, devido à

sua capacidade de incluir moléculas hóspedes na sua cavidade (SZEJTLI, 1988; BREWSTER & LOFTSSON, 2007).

Atualmente, as CDs constituem uma nova classe de excipientes farmacêuticos. Estas são utilizadas principalmente com a finalidade de aumentar a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade de medicamentos. A incorporação de CDs em sistemas farmacêuticos já é uma realidade consolidada. Existem mais de 30 medicamentos comercializados no mercado mundial com a presença deste excipiente em sua composição (CUNHA-FILHO & SÁ-BARRETO, 2007).

As CDs ou cicloamiloses são um grupo de moléculas naturais cíclicas constituídas por unidades de glicopiranosas unidas por ligações α 1-4. Estes oligossacarídeos são obtidos da degradação enzimática do amido através da ação da enzima ciclodextrina glicosil transferase (CGTase), que é proveniente de diversos tipos de bacilos (MASSON *et al.*, 1999; BREWSTER & LOFTSSON, 2007).

De acordo com espécie do bacilo e das condições da reação, três principais CDs podem ser produzidas: alfa (α -CD), beta (β -CD) e gama (γ -CD), formadas por 6, 7 ou 8 unidades de glicopiranosas, respectivamente (FIGURA 11). Portanto, estas três CDs naturais diferem em seu diâmetro, devido ao número de unidades de glicopiranosas (MASSON *et al.*, 1999; LOFTSSON & MASSON, 2001; LOPEZ *et al.*, 2000).

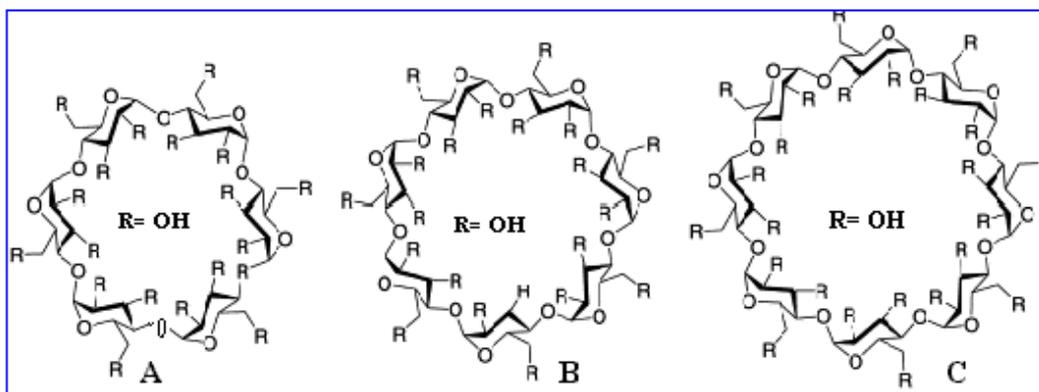


FIGURA 11: Estrutura das ciclodextrinas naturais: A- α -CD; B- β -CD e C- γ -CD. Disponível em <<http://www.pharmainfo.net/files/images/stories/artic>>

As CDs possuem forma tronco-cônica, como pode ser observado na FIGURA 12. Como conseqüência da conformação C1 das unidades de glicose (em forma de cadeira), as hidroxilas secundárias (ligados a C2 e C3 das unidades de glicose) estão localizadas no topo do lado mais largo da estrutura, enquanto que as hidroxilas primárias (ligados a C6) estão posicionadas do lado oposto (LOFTSSON & MASSON, 2001).

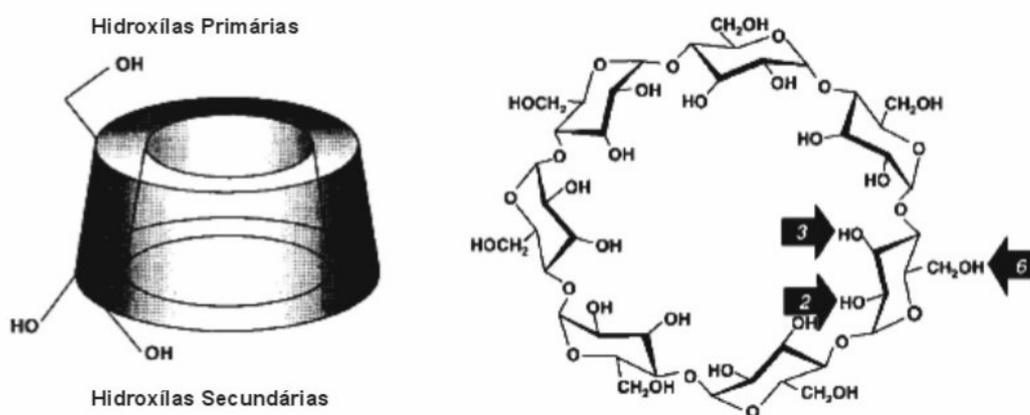


FIGURA 12: Estrutura da β -CD: (a) Estrutura tronco-cone e (b) Estrutura vista do topo (UEKAMA *et al.*, 1998).

Desta forma, as hidroxilas estão orientadas para o exterior da molécula, tornando-a relativamente hidrofílica; por outro lado, a cavidade da molécula apresenta-se hidrofóbica devido ao caráter apolar determinado pelos anéis dos grupos C-H (H₃ e H₅) e pelo anel dos átomos de oxigênio incluindo as ligações glicosídicas (O4 e O4') (VEIGA, 2002). Portanto, resultam moléculas de superfície exterior polar e uma cavidade apolar. Devido ao caráter hidrofílico da superfície exterior, as CDs são solúveis na água, ao mesmo tempo em que disponibilizam uma cavidade apolar capaz de formar complexo de inclusão com vários tipos de moléculas hóspedes.

Em solução aquosa, a cavidade apolar das CDs contém moléculas de água que se organizam em um agregado. Estas moléculas podem ser facilmente substituídas por outras, que sejam menos polares e possuam o tamanho adequado para se adaptarem ao

interior das CDs (MASSON *et al.*, 1999; LOPEZ *et al.*, 2000; VEIGA, 2002; DUCHENE *et al.*, 2003; SIMEONI *et al.*, 2004).

As CDs são moléculas relativamente grandes, com uma superfície externa hidratada e sob condições normais, não permeam as membranas biológicas. Portanto, as CDs e os seus complexos dificilmente podem ser absorvidos através da pele, isto é, apenas a fração livre de fármaco vai sendo absorvida após a descomplexação. Existe um equilíbrio dinâmico entre o fármaco ligado ao complexo e o fármaco em solução (LOFTSSON *et al.*, 1998b).

A membrana relativamente lipofílica tem baixa afinidade pelas moléculas de CDs hidrofílicas. As CDs solubilizam ativos lipofílicos em veículos aquosos e os disponibilizam na superfície da pele, que podem migrar para a barreira lipofílica do EC. Somente uma quantidade insignificante de CD e seus complexos são capazes de penetrar na pele intacta (LOFTSSON & MASSON, 2001).

As CDs também podem atuar como promotores de permeação por aumentar a biodisponibilidade do fármaco na superfície das barreiras biológicas. Segundo Loftsson & Masson (2001), as CDs podem interagir com o EC alterando a sua função de barreira, uma vez que, podem extrair alguns componentes lipofílicos desta estrutura como colesterol e fosfolipídios. Desta forma, aumentam a permeabilidade de fármacos através da pele, mas podem causar irritação cutânea, quando utilizadas em elevadas concentrações (BENTLEY *et al.*, 1997; MASSON *et al.*, 1999; LOFTSSON & MASSON, 2001).

3.5.1. Derivados das ciclodextrinas.

Recentemente, várias espécies de derivados das CDs têm sido preparadas com o objetivo de expandir suas propriedades físico-químicas e a capacidade de formação de complexo de inclusão.

Em geral, os derivados das CDs podem ser divididos em três grupos: hidrofílicos, hidrofóbicos e ionizáveis. Os derivados hidrofílicos incluem as CDs metiladas como a 2,6-dimetil- β -ciclodextrina (DM- β -CD), hidroxi-alkiladas, como a 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) e CDs ramificadas tais como maltosil- β -ciclodextrina (G₂- β -CD), que podem aumentar a solubilidade aquosa e a velocidade de dissolução de fármacos pouco solúveis em água (VEIGA, 2002).

Os derivados hidrofóbicos incluem as CDs etiladas tais como 2,6-dietil- β -ciclodextrina (DE- β -CD), que pode retardar a velocidade de dissolução de fármacos solúveis em água. Os derivados ionizáveis incluem *O*-carboximetil- β -ciclodextrina (CM- β -CD) e sulfato- β -ciclodextrina que podem realizar aumento da capacidade de inclusão, modificações na velocidade de dissolução de fármacos e a redução dos efeitos irritante de alguns fármacos, enquanto que os hidrofóbicos podem modular a liberação de fármacos dos veículos (MATSUDA & ARIMA, 1999).

3.5.2. Formação do complexo de inclusão.

Moléculas ou grupos funcionais das moléculas com dimensões adaptáveis a cavidade das CDs, que sejam menos hidrofílicas que a água, são candidatas à inclusão. Estes sistemas podem formar complexos de inclusão com muitas moléculas lipofílicas através de um processo, nos quais as moléculas de água localizadas dentro da sua cavidade são substituídas pelas moléculas do ativo, ou mais frequentemente, por

algumas estruturas lipofílicas da molécula (MASSON *et al.*, 1999; LOFTSSON & MASSON, 2001).

A força que dirige a formação do complexo, pelo menos no caso da β -CD e seus derivados parece ser a liberação das moléculas de água de dentro da cavidade da CD para o meio externo, pois não conseguem manter o potencial de ligação de hidrogênio. Sendo assim, a formação do sistema nanoestruturado ocorre através de interações do tipo Van der Waals e/ou interações hidrofóbicas. Estas interações podem promover a liberação estrutural das cadeias e mudanças na tensão superficial do ativo incluso. Ligações covalentes não estão envolvidas na formação do complexo e as moléculas localizadas dentro da cavidade estão em equilíbrio dinâmico com as moléculas do ativo livre que estão em solução (MASSON *et al.*, 1999; LOFTSSON & MASSON, 2001; SIMEONI, SCALIA & BENSON, 2004).

As vantagens da inclusão de ativos na cavidade das CDs têm sido descrita por vários autores (DUCHENE *et al.*, 1996; DUCHENE *et al.*, 2003; SIMEONI, SCALIA & BENSON, 2004):

- Aumento da estabilidade de um ativo frente à hidrólise, oxidação e fotólise;
- Proteção do fármaco incluso contra a ação enzimática;
- Aumento da solubilidade;
- Aumento da biodisponibilidade;
- Liberação controlada do ativo;
- Correção de sabor e odor desagradável;
- Modificação do estado físico do produto incluso;
- Diminuição de efeitos indesejáveis, efeitos secundários e toxicidade de ativos.

Não existe uma metodologia única para realizar a formação do sistema nanoestruturado. O método de preparo deve considerar: o rendimento, a simplicidade e

a rapidez (DUCHENE & WOUESSIDJEW, 1990; VEIGA, 2002; MURA, MAESTRELLI & CIRRI, 2003). Na literatura estão descritos vários métodos, como: complexação em solução, em suspensão, maceração, co-precipitação e liofilização (SZEJTLI, 1988, BUDAL, 2003; CUNHA-FILHO & SÁ BARRETO, 2007).

As propriedades físico-químicas das CDs e dos ativos livres são relativamente diferentes das que estes compostos possuem quando estão complexados. Portanto, qualquer metodologia que tenha sensibilidade suficiente pode ser utilizada para caracterizar o sistema nanoestruturado formado. A seguir, estão descritos os métodos mais empregados na caracterização destes complexos (LOFTSSON, 1995; FROMMING & SZEJTLI, 1994; BUDAL, 2003; CUNHA-FILHO & SÁ BARRETO, 2007): *no estado sólido*, os métodos de detecção e caracterização mais utilizados são: termogravimetria (TG), sistemas termoanalíticos (TAS), calorimetria diferencial exploratória (DSC), espectroscopia de infravermelho com transformata de Forrier e Raman e difração de raio-X; *complexos em solução* podem ser caracterizados por: espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de próton (^1H) ou de carbono (^{13}C), espectroscopia de fluorescência e UV-VIS.

3.6. Eficácia dos Filtros Solares.

A eficácia dos filtros solares depende de sua incorporação em veículos apropriados. As propriedades hidrofílicas e lipofílicas, pH, estabilidade em temperaturas elevadas e propriedades emolientes do veículo, influenciam o fator de proteção solar (FPS) (MARTINI & SEILLER, 2006). Além disto, a eficácia de uma formulação contendo filtro solar é comumente determinada através da maior ou menor proteção proporcionada contra a queimadura (PETRAZZUOLI, 2000; SCHULZ *et al.*, 2002).

De acordo com a ANVISA, o FPS é definido pela razão de tempo de exposição à radiação ultravioleta necessário para produzir dose mínima de eritema (DME) na pele protegida pelo tempo de aparecimento do mesmo eritema na pele desprotegida (EQUAÇÃO 4) (RUVOLLO JÚNIOR, 1997; ANVISA, 2006). A DME é definida como a dose mínima de radiação ultravioleta requerida para produzir a primeira reação eritematosa perceptível com bordas claramente definidas, observadas entre 16 e 24 horas após a exposição à radiação ultravioleta (ANVISA, 2006).

EQUAÇÃO 4: Fator de Proteção Solar.

$$\text{FPS} = \frac{\text{Dose mínima de eritema na pele protegida}}{\text{Dose mínima de eritema na pele não protegida}}$$

Além disto, para um filtro solar ser eficaz na pele humana, ele deve: absorver a radiação UV dissipando a energia absorvida com o mínimo impacto para os tecidos (epiderme e derme), impedindo a formação de espécies reativas; possuir um alto coeficiente de extinção molar (ϵ) na faixa de absorção do UV e ser fotoestável. Diversos filtros solares podem ser degradados pela radiação UV gerando subprodutos que ao entrarem em contato direto com a pele podem promover fototoxicidade ou dermatite de contato. A interação de produtos de fotodegradação com os demais excipientes ou com componentes da pele pode levar à formação de compostos com propriedades toxicológicas desconhecidas (GASPAR & MAIA CAMPOS, 2006). Os filtros solares devem ser resistentes à água, não devem penetrar na pele e devem permanecer aderidos na superfície cutânea, ou seja, no EC, formando um filme protetor.

Um fator que deve ser considerado durante a utilização de formulações fotoprotetoras é a quantidade aplicada na pele. Segundo Kullavanijaya & Lim (2005), a maioria das pessoas aplica uma quantidade em torno de 0,5 mg/cm² que é menor que a necessária para uma fotoproteção eficaz (2,0 mg/cm²). A reaplicação da formulação também poderá aumentar a eficácia da fotoproteção, e a principal razão para esta reaplicação é a de repor a quantidade de filtro solar que pode ter sido removido pela água, suor, fricção ou areia (DIFFEY, 2002).

A substantividade ou resistência à água de uma formulação antisolar é uma característica muito importante, uma vez que, os fotoprotetores são usados ao ar livre onde o suor é abundante e as imersões em água são freqüentes (SHAATH, 1997; PETRAZZUOLI, 2000).

De acordo com a ANVISA (2006), a eficácia das formulações antisolares pode ser avaliada empregando metodologias *in vivo*, pela determinação do FPS a seco e após imersão em água, em voluntários sadios (10 a 20) com diferentes tipos de pele (I, II, III e IV), de ambos os sexos, com sensibilidade mediana à radiação ultravioleta.

Devido aos custos envolvidos nos ensaios com voluntários, o emprego da metodologia *in vitro* é uma ferramenta normalmente utilizada para os estudos preliminares da determinação do FPS de novos filtros solares e na rotina do controle de qualidade destas formulações (MANSUR *et al.*, 1986; DIFFEY, 1997; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999; RIBEIRO *et al.*, 2004).

3.7. Segurança das Formulações Fotoprotetoras.

A segurança das formulações cosméticas pode ser avaliada por técnicas *in vitro*, empregando um modelo bicompartimental, conhecido como célula de difusão vertical e pele natural (humana ou animal) (WISSING & MULLER, 2002; SIMEONI, SCALIA & BENSON, 2004; JIMENEZ *et al.*, 2004; MARTINI & SEILLER, 2006).

Esta metodologia tem por objetivo: conhecer o fluxo, o perfil de penetração e/ou permeação da substância ativa na pele; determinar a quantidade do ativo retido nas diferentes camadas cutâneas (epiderme/derme) e a possível presença do ativo nos fluidos biológicos (TOUITOU *et al.*, 1998). Acredita-se que este comportamento observado *in vitro* reflita os aspectos determinantes do processo *in vivo*, e por isso, esta metodologia pode ser utilizada para determinar a disponibilidade relativa de produtos dermatológicos (SKELLY *et al.*, 1987).

A pele humana seria ideal para estes estudos, porém devido à baixa disponibilidade e questões éticas e legais, modelos animais têm sido bastante utilizados, como a pele de rato, cobaio, camundongo com e sem pêlo, macaco rhesus, cobra, coelho, cachorro e suínos (HAIGH & SMITH, 1994; SCHMOOK, 2001; SHAH, 2005).

A pele suína tem sido a mais empregada devido a sua similaridade com a pele humana (SCHMOOK, 2001; SEKKAT; KALIA & GUY, 2002; MEDI & SINGH, 2003). As características histológicas e bioquímicas da pele suína e humana são semelhantes em relação à espessura e composição da epiderme, densidade dos pêlos, conteúdo dos lipídios e morfologia em geral (FERRY, ARGENTIERI & LOCHNER, 1995; ANDEGA, KANIKKANNAN & SINGH, 2001).

A solução receptora deve fornecer condições *sink*, ou seja, o volume empregado deve ser cinco vezes maior que do ponto de saturação do fármaco (ZATZ, 1995). Uma solução tampão é mais adequada para substâncias hidrofílicas. Para substâncias lipofílicas, o uso de aditivos solubilizantes, como, por exemplo, tensoativos ou solventes orgânicos, às vezes se faz necessário (MOSER, 2001). A solução receptora deve ser compatível com a metodologia analítica empregada para a quantificação do ativo.

Por outro lado, a determinação da velocidade de liberação do ativo destas formulações pode prover o controle de qualidade das mesmas. Para tal, pode-se empregar o mesmo sistema bicompartimental com membranas artificiais como acetato de celulose, nitrato de celulose e polissulfona (UNITED STATES, 1997; HAIGH & SMITH, 1994), as quais não oferecem resistência à passagem do ativo do compartimento doador para o compartimento receptor, proporcionando, desta forma, sua quantificação neste último, em função da partição entre o veículo e o meio acceptor.

A membrana sintética serve como um suporte para separar a formulação do meio receptor, devendo ser quimicamente inerte para não reagir com a formulação ou com o meio acceptor e não deve ser velocidade limitante nos processos de liberação do ativo (HAIGH & SMITH, 1994).

Pesquisas crescentes têm sido realizadas em busca do aparato mais adequado para avaliar a velocidade de liberação/penetração/permeação *in vitro* para produtos tópicos dermatológicos, uma vez que, oficialmente, não existe uma padronização que possa ser aplicada para todas as formulações semi-sólidas.

Sendo assim, encontram-se descritos na literatura vários modelos de células de difusão, tipos de membranas artificiais, que são empregados na avaliação da velocidade de liberação *in vitro* de ativos em diferentes formas farmacêuticas (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2001; WISSING & MULLER, 2002; GODWIN, KIM & FELTON, 2002; YENER, INCEGÜL & YENER, 2003; JIMENEZ *et al.*, 2004; SIMEONI, SCALIA & BENSON, 2004; TURSILLI *et al.*, 2007; MONTENEGRO *et al.*, 2008).

Os principais objetivos deste trabalho consistiram em: desenvolver nanocosméticos contendo os sistemas nanoestruturados (lipossomas/MCO e β -ciclodextrina/MCO) desenvolvidos; avaliar a eficácia destes nanocosméticos desenvolvidos, através dos testes de *FPS in vivo* a seco e após a imersão em água; e

avaliar a segurança destes nanocosméticos, através dos testes de penetração e/ou permeação in vitro utilizando um sistema bicompartimental e membrana natural (pele suína).

4. Material

4.1. Equipamentos e Acessórios

- Agitador de tubos Phoenix modelo AP 56;
- Agitador magnético Marte modelo MAG 15;
- Agitador mecânico Fisaton modelo 713 D;
- Aparelho Zetasizer Malvern modelo 210L;
- Balança analítica Mettler Toledo modelo AG 204;
- Balança de precisão Bioprecisa modelo FA 2104N;
- Banho de água Bunchi modelo B-480;
- Banho termostatizado Quimis;
- Banho de ultra-som Thornton modelo T14;
- Células de difusão tipo Franz, com área de $1,96 \text{ cm}^2$ e 7 mL de capacidade;
- Centrífuga Beckman- Coulter modelo J-25;
- Cubeta de cristal de quartzo;
- Destilador Quimis modelo NT 425;
- Difrátômetro de raio- X Rigaku modelo Miniflex;
- Eletrodo Digimed modelo DME CVC1;
- Espectrofotômetro de Infravermelho ABB Inc modelo FTLA 2000-100;
- Espectrofotômetro de Ressonância Magnética Nuclear Varian Gemini 200 MHz;
- Espectrofotômetro Shimadzu UV modelo 1601;
- Membrana de acetato de celulose marca Sigma: 27 mm de diâmetro, tamanho do poro $0,2 \mu\text{m}$, 43 mm de espessura;
- Membrana Filtrante $0,45 \mu\text{m}$ Millipore;
- Membranas de policarbonato Isospore[®] com poro de $0,4 \mu\text{m}$;

- Microscópio óptico Olympus, modelo BH-100, com objetiva de 100X, equipado com câmera digital Olympus DP-100 e software de captura de imagem FlashPath;
- Microscópio óptico com luz polarizada Zeiss, modelo Axioplan 2 – acoplado a câmera digital Colorview XS e programa gerenciador de imagens Analysis;
- Moinho de bolas;
- Potenciômetro Digimed modelo DM 21;
- Placa de aquecimento com agitação magnética Corning;
- Pipetas automáticas 200, 1000 e 5000 μL (Gilson)
- Pipeta automática para semi-sólidos (modelo Transferpettor Digital 200 – 1000 μL , marca Brand);
- Rotaevaporador Büchi modelo R-114;
- Seringas descartáveis de 5,0 mL Beckton & Dickson;
- Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) isocrático:
 - ✓ Bomba para CLAE Waters 510
 - ✓ Coluna cromatográfica Hibar[®] LiChrosorb RP -18 de 5 μ e 25 cm;
 - ✓ Detector Ultravioleta Waters 486
 - ✓ Injetor manual Rheodyne 7725
 - ✓ Integrador Waters 746
- Sistema filtrante Millipore 142 mm filter holder;
- Ultra Turraz
- Unidade filtrante descartável 0,45 μm de poro, Millipore;

4.2. Reagentes

- Acetonitrila para CLAE;
- Ácido acético glacial;
- Ácido clorídrico P.A;
- Água destilada;
- Ácido sulfúrico P.A;
- Brometo de potássio;
- Cloreto de sódio;
- Clorofórmio P.A;
- Etanol P.A;
- Fosfato de sódio dibásico;
- Fosfato de potássio monobásico;
- Metanol para CLAE;
- Metanol P.A;
- Molibdato de amônio;
- Peróxido de Hidrogênio;
- Solução de etanol a 25% (v/v);
- Solução de molibdato de amônio;
- Solução padrão de fósforo 0,65 mM;
- Solução tampão TRIS pH = 6,8;
- TRIS – Tris [hidroximetil] aminometano;
- Tween 80 P.S;

4.3. Matérias Primas

- Ácido ascórbico;
- β – Ciclodextrina grau farmacêutico;
- Butilhidroxitolueno (BHT);
- Colesterol;
- Dispersão de metilparabeno, propilparabeno, etil e butilparabenos dispersos em fenoxietanol (Phenova);
- Fosfatidilcolina (Lipoid 100[®]);
- Fosfato de Hidroxipropilamido (Structure XL[®]);
- Lauril glucosido, poligliceril 2- dipolihidroxiestearato e glicerina (Emulgin VL 75);
- *p*- Metoxicinamato de Octila.

5. Métodos.

5.1. Caracterização Físico-Química do Filtro Solar *p*- Metoxicinamato de Octila (MCO).

No início deste trabalho, não havia no mercado substância química de referência para MCO, desta forma, utilizou-se como padrão de trabalho a matéria prima com teor de pureza declarado, adquirida através da empresa Galena. Esta matéria prima foi avaliada de acordo com os espectros de ultravioleta e infravermelho, sendo comparada com os resultados obtidos com especificações encontradas na literatura.

5.2.1 Análise do Espectro de Absorção na Região do Ultravioleta do MCO.

O espectro de absorção na região do ultravioleta visível (UV) pode auxiliar na confirmação de identidade de um composto comparando o espectro da substância em estudo com a identidade presumida do padrão. Os dados de λ máx e ϵ máx podem ser comparados com valores em tabelas e fornecer indicações sobre o tipo de cromóforo existente no composto (SOARES, 2006).

A análise do MCO foi realizada utilizando o espectrofotômetro SHIMADZU UV-1601PC. Os espectros no ultravioleta foram obtidos através da leitura em triplicata de soluções etanólicas a 8,22 mg/L, para a determinação do comprimento de onda máximo (λ máx) e cálculo do coeficiente de extinção molar (ϵ). Os parâmetros utilizados foram: varredura de 450 a 220 nm, usando cubetas de quartzo de um cm e etanol P.A. como branco.

Em estudos anteriores os valores de concentração e o λ máximo do MCO foram determinados e responderam linearmente a lei de Beer. Três curvas padrão foram construídas, cada uma com cinco pontos (2, 4, 6, 8 e 10 $\mu\text{g/mL}$), sendo utilizada uma curva padrão referente à média das três determinações.

Foram pesados 10 mg do MCO, os quais foram diluídos em balão volumétrico de 100 mL em etanol, avolumando-se o mesmo para obter uma solução de concentração igual a 100 µg/mL, considerada solução-mãe. Em seguida, tomaram-se alíquotas desta solução mãe com a finalidade de obter soluções de concentrações iguais às citadas acima. Foram realizadas medidas das absorvâncias das soluções no comprimento de onda de absorção máxima do MCO (310 nm).

O coeficiente de correlação e a equação da curva padrão foram calculados com auxílio do programa Excel[®] empregando os valores de absorvância.

5.2.2. Análise do MCO por Espectroscopia de Infravermelho.

A espectroscopia de infravermelho (IV) tem se mostrado uma ferramenta muito útil para a confirmação da identidade de grupos funcionais, através dos diferentes modos de vibração e rotação existentes na molécula. Portanto, esta técnica fornece informação estrutural a partir das frequências de absorção características de cada grupo funcional (SOARES, 2006).

Para a obtenção do espectro de absorção no IV, uma gota de MCO foi espalhada entre placas de cristal de cloreto de sódio e em seguida foi realizada a determinação no aparelho ABB Inc, modelo FTLA 2000- 100, na faixa de 400 a 4000 cm⁻¹, região de interesse para fins analíticos.

5.3. Formação do Sistema Nanoestruturado β-CD/MCO.

5.3.1. Sistema Nanoestruturado β-CD/MCO.

A inclusão do filtro MCO em β-CD foi realizada empregando o método de *kneading* ou empastagem. Esta técnica baseia-se na mistura da ciclodextrina com a molécula hóspede, seguida da adição de pequenas quantidades de solvente. O calor

gerado pelo atrito é a energia responsável por catalisar o processo de inclusão. Este método é o mais indicado para substâncias insolúveis em água (MARQUES, 1994; DUCHENE *et al.*, 1993, COELHO *et al.*, 2008).

Em um gral de porcelana foram misturados por cinco minutos, com auxílio de um pistilo, 14,6 g de β -CD e 7,4 g de MCO, na proporção de 2:1. Foi adicionado a esta mistura 1,0 mL de uma solução de etanol a 70%, adquirindo o conjunto um aspecto granuloso. O produto restante, 22 g da massa total, foi transferido para um moinho de bolas constituído de um cilindro de 11 cm de comprimento por 8 cm de diâmetro, que possui uma carga de bolas de porcelana igual a 75,35 g. A mistura foi deixada no moinho por 1 hora. A seguir foi seca em estufa a 55°C por 30 minutos.

5.3.2. Purificação do Sistema Nanoestruturado β -CD/MCO.

A purificação do sistema nanoestruturado β -CD/MCO foi realizada de acordo com Mota (2005). O produto foi colocado sobre o funil de Buncher e lavado com 20 mL de solução de metanol 50% v/v, objetivando purificar o complexo. Esta operação foi realizada apenas 1 vez. Após este procedimento, o complexo foi triturado em um gral e levado por mais 1 hora a estufa a 40° C, para retirar o excesso de solvente.

5.3.3. Caracterização do Sistema Nanoestruturado β -CD/MCO.

a) Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H).

Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) representa uma das ferramentas mais poderosas para a caracterização do complexo de inclusão. Esta técnica fornece informações estruturais únicas sobre a estequiometria, a constante de estabilidade e a orientação molecular do fármaco dentro da cavidade da CD (FIELDING, 2000). Uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região

de radiofrequência (rf), sendo que esta absorção será proporcional aos núcleos da molécula (SILVERSTEIN *et al.*, 1994).

As amostras da matéria prima MCO e do sistema nanoestruturado β -CD/MCO purificado foram solubilizadas a uma concentração de 10 mM em DMSO-d⁶ e analisados por espectrofotômetro de ressonância magnética nuclear – Varian Gemini - 200 MHZ, uma dimensão.

b) Difração de Raios X (XDR).

A difração de raio X (DRX) é uma técnica cristalográfica muito empregada devido a sua simplicidade e rapidez. Na DRX a interação entre o vetor elétrico de radiação X e os elétrons do material a ser analisado resultam em uma dispersão. Sendo assim, quando os raios X sofrem dispersões devido a estruturas organizadas presentes no cristal, ambas as interferências, construtiva e destrutiva, surgem entre os raios dispersos, uma vez que as distâncias entre os centros de dispersão são de mesma ordem de magnitude do comprimento de onda da radiação, resultando deste modo na difração (SOARES, 2006).

As amostras da matéria prima β -CD, β -CD mistura física, ou seja, que foi submetida ao mesmo processo de inclusão que o sistema nanoestruturado β -CD/MCO e o sistema nanoestruturado β -CD/MCO foram analisadas em Difrátômetro de Raios X operado a 40KV e 30mA. O ângulo de difração 2θ foi registrado de 1 a 20° em temperatura ambiente e a radiação $\text{CuK}\alpha$ foi utilizada como fonte dos raios X.

c) Espectrometria de Infravermelho.

A técnica de espectroscopia de infravermelho é muito utilizada na caracterização de sistemas sólidos com CDs, por serem determinações rápidas e

precisas. Baseiam-se na diferença vibracional das ligações químicas presentes em diversas substâncias. Diferenças de polimorfismo, estrutura cristalina, grau de hidratação ou outras características macroscópicas das substâncias podem gerar diferenças no espectro, já pequenas impurezas presentes na amostra não alteram significativamente o espectro (SILVERSTEIN *et al.*, 1994; CUNHA-FILHO & SÁ-BARRETO, 2007).

Nesta metodologia, a região intermediária na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} do espectro eletromagnético é a mais empregada para fins de identificação. Cerca de 3 mg do sistema nanoestruturado β -CD/MCO (amostra sólida) foram triturados com 300 mg de brometo de potássio seco e pulverizado, homogeneizado e introduzido em molde para a compressão em prensa hidráulica. A pastilha obtida foi fixada em suporte e submetida à leitura. Também foi realizada a análise das matérias primas MCO e β -CD por espectrometria de infravermelho com a finalidade de comparar as diferenças existentes entre o espectro de infravermelho destas matérias primas com o espectro de IV do sistema nanoestruturado β -CD/MCO.

5.3.4. Determinação da Quantidade de MCO Incorporado no Sistema Nanoestruturado β -CD/MCO.

A espectrofotometria de UV é um método que se caracteriza por realizar medidas quantitativas com elevada sensibilidade. Por isso, é uma técnica bastante utilizada nos estudos de inclusão (CUNHA-FILHO & SÁ-BARRETO, 2007).

Para o sólido proveniente do método de inclusão *kneading*, foram pesados 60 mg de cada uma das amostras secas, dissolvidas em 100 mL de solvente (o mesmo utilizado para a inclusão) e dessa solução, foram retiradas alíquotas de 1 mL com a pipeta volumétrica e posteriormente diluídas a 100 mL. Foi realizada a leitura no UV no

comprimento de onda de absorção máxima para a molécula hóspede (310 nm). A concentração foi calculada de acordo com a equação da reta encontrada para o MCO.

5.4. Formação do Sistema Nanoestruturado Lipo/MCO.

Os lipossomas foram obtidos através do método de hidratação do filme lipídico. Este método já foi descrito em estudos anteriores com filtros solares (GARCIA, 1998; MOTA, 2005), além disso, permite uma alta capacidade de incorporar substâncias lipofílicas, como por exemplo, o MCO. A concentração de 72,00 mM de MCO (20% em relação ao total de lipídios) foi utilizada por já ter sido escolhida como a melhor em estudos anteriores (GARCIA, 1998).

A fase oleosa foi composta de 280 mMol/mL de fosfatidilcolina (LIPOID 100%®), 80 mMol/mL de colesterol e 72 mMol/mL de MCO (TABELA 1). Foram calculadas as massas de todos os constituintes utilizados para obter 50 mL da suspensão lipossomal.

A FIGURA 13 descreve o processo de produção dos lipossomas pelo método do filme fosfolipídico. Foram pesados exatamente cerca de 10,85 g de Lipoid 100%®, 1,55 g de colesterol e 3,6 g de MCO diretamente em um balão com fundo redondo de 1 L. Esta fase oleosa foi dissolvida com auxílio de aproximadamente 20 mL de clorofórmio P.A, sendo que a utilização de solventes orgânicos também garante a distribuição uniforme dos lipídios da bicamada lipídica. Agitou-se a mistura até completa solubilização dos constituintes.

Em seguida o balão de fundo redondo contendo a mistura foi levado ao rota evaporador, sob vácuo, onde permaneceu sob aquecimento em banho-maria à temperatura de aproximadamente 40 °C, com rotação lenta por 2 horas e inclinação do

balão de forma a obter um filme fino e homogêneo na parede interna. Para garantir toda a retirada do solvente, o balão permaneceu por 24 horas no dessecador a vácuo. Após este tempo, foi verificada a presença de solvente residual, e se ainda houvesse solvente o balão era levado novamente ao rota evaporador, com a finalidade de removê-lo por completo.

Somente após a evaporação completa do solvente, foi adicionado aproximadamente 50 mL de solução tampão TRIS pH 6,8, e algumas pérolas de vidro com o objetivo de hidratar o filme lipídico. Este balão foi submetido a agitação em vórtex até observar o completo desprendimento do filme através do atrito destas perólas com o filme lipídico. Com a hidratação do filme lipídico, as vesículas desprendidas irão se fechar formando as primeiras vesículas. Este processo é lento, portanto o balão foi deixado em repouso por 96 horas sob refrigeração (4°C). Estudos recentes demonstraram que o aumento do tempo de hidratação de vinte quatro para noventa e seis horas permitiu a formação de um maior número de vesículas, com a liberação de todo filme aderido ao balão (SANTOS, 2007).

TABELA 1: Composição da suspensão lipossomal.

Componentes	Concentrações
Fase Oleosa	
Lipoid 100%	280,00 mM/mL
Colesterol	80,00 mM/mL
<i>p</i> -metoxicinamato de octila	72,00 mM/mL
Fase Aquosa	
Tampão TRIS	50 mL

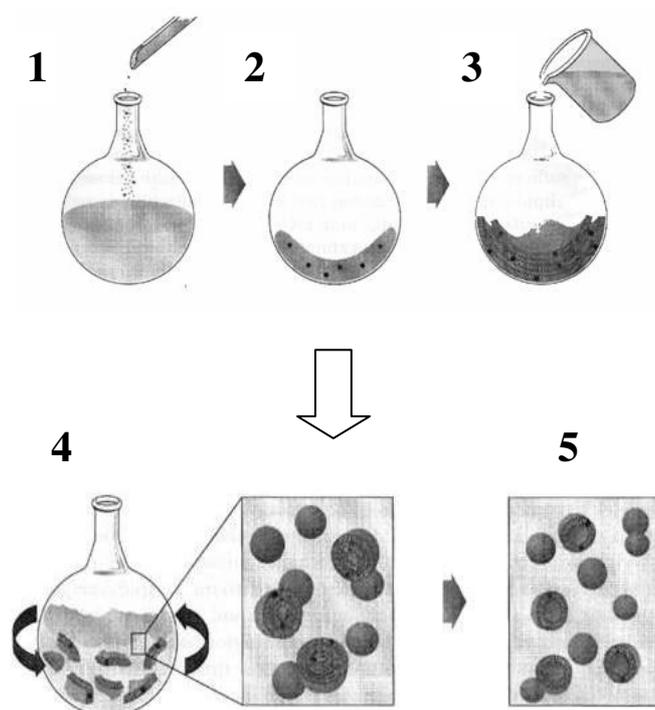


FIGURA 13: Processo de obtenção dos lipossomas através do método de hidratação do filme lípidico. Etapa 1: Adição dos componentes. Etapa 2: Formação do filme lípidico. Etapa 3: Adição de solução aquosa. Etapa 4: Agitação da mistura. Etapa 5: Uniformização dos lipossomas (MIRANDA, 2005).

5.4.1. Normalização dos Lipossomas.

Os lipossomas preparados foram filtrados em filtro Millipore[®] com membrana de policarbonato de 0,4 μm e gás nitrogênio para pressionar a passagem do material, objetivando a normalização do seu tamanho. A filtração nesta membrana deveria ser realizada duas vezes, porém a suspensão lipossomal era muito viscosa e requeria uma pressão muito grande no sistema, impedindo a realização da mesma, além de promover grande perda do material.

Sendo assim, as suspensões lipossomais foram homogeneizadas no Ultra Turrax a 10000 rpm durante 1 minuto. Em seguida, foram filtrados na membrana de 0,4 μm , e por último, os lipossomas foram passados novamente no ultra Turrax a 10000 rpm, durante 1 minuto, a fim de completar a normalização de seu tamanho.

5.4.2. Verificação da Formação dos Lipossomas por Microscopia Óptica.

A técnica de microscopia óptica não é descrita na literatura como uma técnica utilizada para avaliar as propriedades morfológicas dos lipossomas, devido ao tamanho das vesículas lipossomais estarem na faixa de nanômetros. Entretanto, esta metodologia pode ser utilizada como uma ferramenta capaz de evidenciar a forma das vesículas lipossomais grandes, na faixa de micrômetros.

A microscopia óptica foi realizada em microscópio Axoplan 2 da Zeiss, com sistema de captura de imagem e câmeras de vídeo e fotográfica acopladas ao microscópio e ao computador. Após o preparo e a normalização da suspensão contendo os lipossomas, esta foi submetida à microscopia óptica de luz polarizada para confirmar a formação dos lipossomas. A primeira microscopia foi realizada com a suspensão lipossomal *in natura*. A amostra foi depositada sobre uma lâmina e coberta com uma lamínula, para a observação em microscópio, utilizando objetiva com aumento de 100 vezes.

A suspensão lipossomal *in natura* foi diluída objetivando aumentar a resolução da visualização. A diluição foi realizada no momento da visualização, utilizando uma solução de etanol a 25%. Esta diluição deve ser realizada no momento da determinação, pois o etanol tende a romper as vesículas com o passar do tempo.

Seguindo a metodologia de HENRIQUES (2008) foram pipetados 200 μ L da amostra, em um balão volumétrico de 25,0 mL, com etanol a 25 % (v/v). Após a homogeneização com auxílio da pipeta *Pasteur*, foi retirada uma gota desta solução e colocada sobre a lâmina e coberta com lamínula. As lâminas foram observadas utilizando uma objetiva de 100 vezes, imediatamente após sua preparação, para evitar o rompimento das vesículas.

5.4.3. Espalhamento Dinâmico da Luz.

O espalhamento dinâmico da luz está baseado no comportamento de um feixe de luz emitido por uma lâmpada de laser de hélio-neon, por partículas menores que 1 μm suspensas em um meio.

Quando o feixe laser encontra as partículas em suspensão, a luz é espalhada, podendo ser medida a intensidade e a frequência deste espalhamento, sendo estas medidas convertidas para o tamanho médio das partículas em suspensão. Desta forma, as medidas feitas pelo DLS fornecem os diâmetros das partículas em suspensão de três formas diferentes: diâmetro hidrodinâmico (Z), diâmetro médio pelo volume e diâmetro médio pela intensidade. Caso estes diâmetros se assemelhem, pode-se dizer que se tem uma dispersão homogênea (LOBO, 2005).

O tamanho, a distribuição do tamanho e o índice de polidispersividade dos lipossomas foram determinados por equipamento de luz a laser (Multi Angle Particle Sizing Option, Brookhaven, USA). O ângulo de detecção foi de 90° e o comprimento de onda para as leituras foi de 633 nm (ESPOSITO *et al*, 2007). As amostras foram diluídas em água purificada na concentração de 1:1000, sendo procedida à leitura em uma cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A temperatura foi controlada e mantida a 25°C . As amostras foram analisadas três vezes. E os dados obtidos foram integrados com auxílio do software MAS OPTION.

5.4.4. Determinação da Quantidade de MCO Incorporado no Sistema Nanoestruturado Lipo/MCO.

A determinação da quantidade de MCO incluso no sistema nanoestruturado Lipo/MCO foi realizada por espectrofotometria de UV. Os valores de absorvância

foram determinados no λ máx (310 nm) característico deste filtro solar. Inicialmente, foi pesada uma quantidade de filtro solar para o preparo do lipossoma; posteriormente, foram realizadas diluições das amostras em etanol P.A objetivando obter concentrações próximas a do ponto central da curva padrão (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

A análise do sistema nanoestruturado Lipo/MCO foi realizada em triplicata, utilizando etanol P.A como branco. A concentração e o percentual do MCO encapsulado foram determinados através da equação da reta da curva padrão do filtro solar.

5.4.5. Determinação da Quantidade de Fosfolipídio na Matéria-Prima Fosfatidilcolina e na Suspensão Lipossomal.

O método utilizado para a análise de fósforo foi o método de Bartlett (BARTLETT, 1959). É um método indireto e colorimétrico utilizado para dosar a quantidade dos fosfolipídios nos lipossomas e nas lecitinas comerciais, através da avaliação do conteúdo de fósforo na amostra.

O ensaio foi realizado em uma placa de aquecimento para tubos de ensaio, na qual foram colocados 3 tubos para o branco, 3 tubos para cada fração da amostra analisada (Lipoid 100%[®]) e 4 tubos contendo um volume crescente de uma solução padrão de fósforo 0,65 mM (50, 100, 150 e 200 μL). O mesmo procedimento foi utilizado para a determinação do teor de fosfatidilcolina nos lipossomas.

As amostras em triplicata foram diluídas em etanol, baseando-se na massa inicial de fosfolipídio presente, para obter soluções finais com concentração de aproximadamente 1 μg de fósforo/mL (Lipoid 100%[®]) e soluções finais com a concentração de 2,1 μg de fósforo/mL (Lipossoma). Foram pipetados 1,0 mL de cada solução diluída para cada tubo de ensaio; em três tubos foram pipetados 1,0 mL de

etanol que serviram de brancos enquanto quatro tubos continham volumes crescentes de solução padrão de fósforo para a construção da curva padrão (FIGURA 14).

Em seguida, foram adicionados 400 μL de uma solução de ácido sulfúrico a 10% em todos os tubos de ensaio, com a temperatura variando de 180 a 195°C durante trinta minutos. Os tubos foram resfriados. Nesta etapa as amostras contendo fosfolipídio sofreram uma hidrólise ácida, transformando os fosfolipídios em fosfato inorgânico.

Na segunda etapa, foram adicionados a todos os tubos de ensaio, 100 μL de solução de peróxido de hidrogênio a 10% v/v. Os tubos foram aquecidos novamente com a temperatura variando de 180 a 195°C durante trinta minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados novamente.

A terceira etapa foi realizada adicionando 4,6 mL da solução de molibdato de amônio em todos os tubos. E a última etapa consistiu na adição de 500 μL de solução de ácido ascórbico a 10% p/v. Os tubos foram aquecidos a 90 °C em placa de aquecimento durante 20 minutos. Na etapa final o fosfato inorgânico formado anteriormente reage com o molibdato de amônio formando o ácido fosfomolibdico. Este por sua vez forma um complexo azul, na presença de ácido ascórbico como agente redutor.

A intensidade da cor azul é diretamente proporcional à quantidade de fósforo presente e é medida espectrofotometricamente. As absorbâncias das amostras, branco e do padrão de fósforo foram determinadas em λ de 800 nm. Dessa forma, foi fornecido o conteúdo de fósforo e, conseqüentemente, o conteúdo de fosfolipídio através de uma curva padrão construída.

Portanto, o objetivo desta análise para o fosfolipídio (Lipoid 100%®) foi determinar o teor real de fosfatidilcolina na matéria prima comparando com o teor declarado pelo fabricante. No caso da suspensão lipossomal contendo o fosfolipídio, o

objetivo foi verificar o rendimento da preparação comparando a quantidade real de fosfatidilcolina com a massa adicionada.

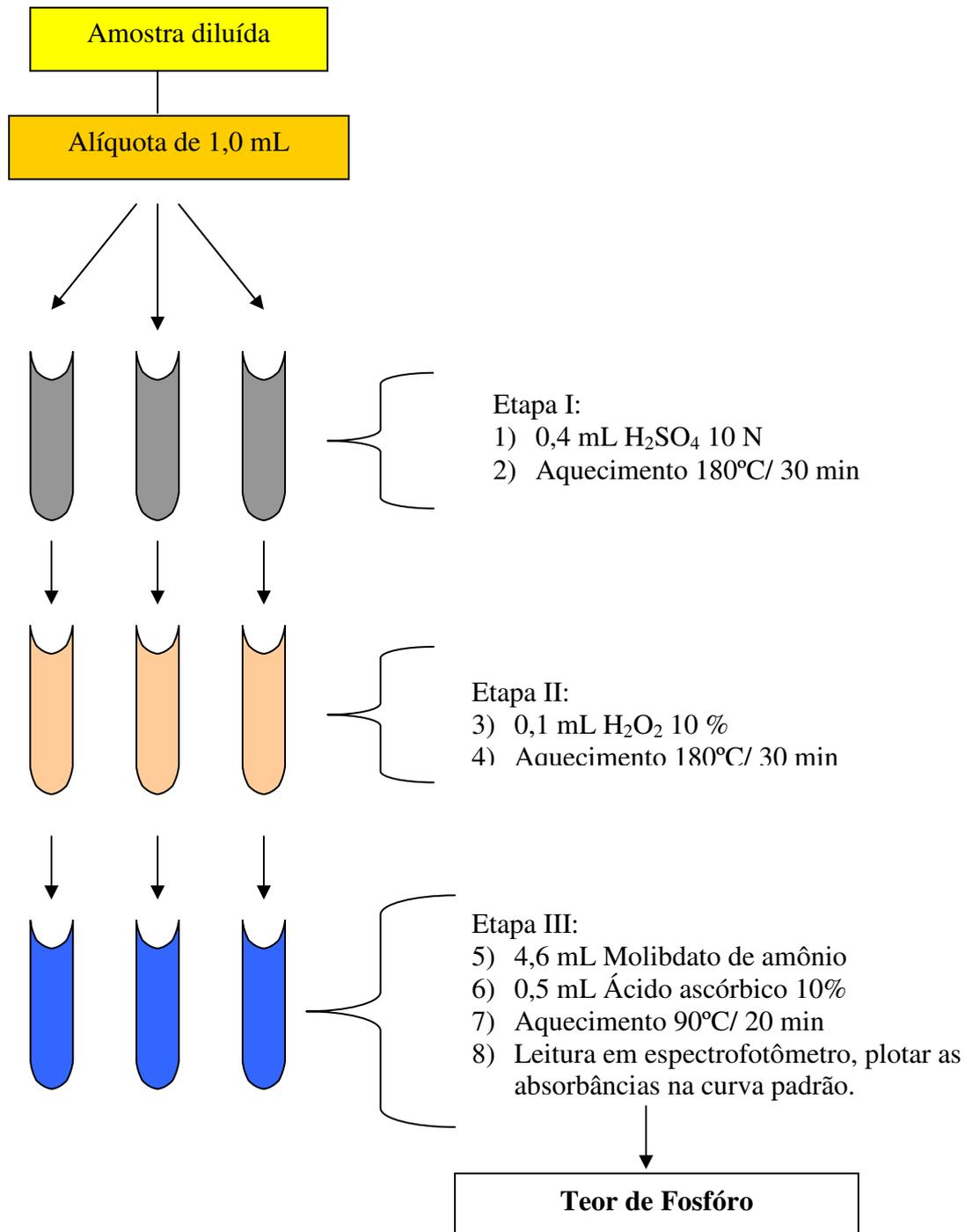


FIGURA 14: Representação esquemática do método de Bartlett para a determinação do teor de fósforo (SANTOS, 2007).

5.5. Desenvolvimento das Formulações.

As formulações do tipo gel creme são constituídas por uma base em gel, emulsificantes e substâncias oleosas, adquirindo um aspecto leitoso. O gel creme é uma emulsão cuja fase aquosa é previamente gelificada pelo polímero hidrófilo gelificante. Os agentes gelificantes empregados na formação do gel creme são geralmente os mesmos utilizados para a obtenção de um hidrogel convencional (FERREIRA, 2002; MARTINI, 2005).

Neste trabalho, o polímero gelificante utilizado foi o fosfato de hidroxipropilamido, que possui um carácter não iônico, derivado do amido, compatível com a fosfatidilcolina e com a β -ciclodextrina; desse modo não interage com os complexos de inclusão e conseqüentemente protege a integridade destes sistemas e dos nanocosméticos desenvolvidos. Além de apresentar outras vantagens como a facilidade de preparo e resistência a uma ampla faixa de pH.

Inicialmente, foi preparado um gel creme contendo 8% do filtro solar livre (MCO) (TABELA 2), objetivando comparar a segurança e a eficácia desta formulação com o gel creme contendo os sistemas nanoestruturados (β -CD/MCO e lipo/MCO).

TABELA 2: Composição do gel creme: com MCO livre e com os sistemas nanoestruturados β -CD/MCO, Lipo/MCO e com ambos β -CD/MCO + Lipo/MCO.

Composição	MCO Livre	β-CD/MCO	LIPO/MCO	β-CD/MCO + LIPO/ MCO
Fase A				
Fosfato de Hidroxipropilamido	5 %	5 %	5 %	5 %
Água	q.s.p 100 mL	q.s.p 100 mL	q.s.p 100 mL	q.s.p 100 mL
Fase B				
Lauril glucosido, poligliceril 2-dipoli-hidroxiestearato e glicerina	3%	3 %	3 %	3 %
Dispersão de metilparabeno, propilparabeno, etil e butilparabenos dispersos em fenoxietanol	0,5%	0,5 %	0,5 %	0,5 %
<i>p</i> - Metoxicinamato de octila	8%	4 %	4,75 %	4,38 %
Butilhidroxitolueno	0,05%	0,05 %	0,05 %	0,05 %
Complexo β -CD/MCO	-	13,26 g = 4 g de MCO	-	6,63 g = 2 g de MCO
Complexo Lipo/MCO	-	-	50 mL = 3,25 g de MCO	25 mL = 1,62 g de MCO

No preparo do gel creme com MCO livre, o polímero fosfato de hidroxipropilamido foi disperso na água, lentamente, sob agitação constante. Separadamente, foi preparada a fase B, solubilizando o MCO com auxílio do lauril glucosido-poligliceril 2-dipolihidroxiestearato-glicerina, em seguida foi adicionada à dispersão de parabenos dispersos em fenoxietanol e o butilhidroxitolueno. A fase A foi vertida na fase B e mantida sob lenta agitação, até completa homogeneização das duas fases.

Na formulação gel creme contendo o sistema nanoestruturado β -CD/ MCO parte dos 8% de MCO (aproximadamente 50%) está incluso na β -CD e a quantidade restante do MCO foi incorporada como filtro livre (TABELA 2). No preparo deste nanocosmético, o polímero, fosfato de hidroxipropilamido, foi disperso na água, lentamente, sob agitação constante. Separadamente, foi preparada a fase B, solubilizando o filtro MCO com auxílio do lauril glucosido-poligliceril 2-dipolihidroxiestearato-glicerina. O sistema nanoestruturado β -CD/MCO foi solubilizado com água e agitado lentamente. Verteu-se a fase A sob o complexo solubilizado, mantendo a agitação até completa homogeneização. A mistura resultante foi vertida sobre a fase B e homogeneizada.

Na formulação contendo o sistema nanoestruturado Lipo/MCO parte dos 8% do MCO (aproximadamente 50%) foi inclusa no lipossoma e o restante foi incorporado como filtro livre (TABELA 2). O polímero, fosfato de hidroxipropilamido, foi disperso na água, lentamente, sob agitação constante. Separadamente, foi preparada a fase B, solubilizando o filtro MCO com auxílio do lauril glucosido-poligliceril 2-dipolihidroxiestearato-glicerina. Adicionou-se o complexo Lipo/MCO formado sobre a

fase B. Em seguida, foi adicionada a fase A sob a fase anterior. O sistema foi agitado, por alguns minutos e em seguida, homogeneizado no ultra turrax.

Na formulação gel creme contendo ambos os sistemas nanoestruturados, β -CD/MCO e Lipo/MCO, parte dos 8% de MCO, aproximadamente 25% do filtro foi incluso no lipossoma, aproximadamente 25% do filtro incluso em β -CD e aproximadamente 50% estava sob a forma de filtro livre (TABELA 2). Esta formulação contendo os dois sistemas foi desenvolvida com o objetivo de avaliar um possível sinergismo e/ou interação entre os complexos de inclusão desenvolvidos. Nesta formulação, o polímero fosfato de hidroxipropilamido, foi disperso na água, lentamente, sob agitação constante. Separadamente, foi preparada a fase B, solubilizando o filtro MCO com auxílio do lauril glucosido-poligliceril 2-dipoli-hidroxiestearato-glicerina. O sistema nanoestruturado β -CD/MCO foi solubilizado em água e adicionado sobre a fase B. Em seguida adicionou-se o sistema Lipo/MCO sobre esta fase. Ver-teu-se a fase A sobre a fase B e deixou se sob agitação por alguns minutos. Em seguida, foi homogeneizado no ultra turrax.

5.6. Padronização da Metodologia de Análise do MCO nas Formulações Desenvolvidas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

O MCO possui peso molecular de 290,4 e o ponto de ebulição na faixa de 185-195° C, a 1 mbar. É um líquido oleoso, insolúvel em água, propilenoglicol e glicerina, muito solúvel em etanol, óleo mineral, isopropanol, éter, óleos vegetais e óleos de silicones. O coeficiente de partição octanol-água, é de $\log P = 5,96$ (MARTINDALE, 1999; JIMÉNEZ *et al.*, 2004).

A metodologia analítica utilizada para identificar e quantificar o MCO nos nanocosméticos desenvolvidos foi baseado nos estudos realizados por MOTA (2005);

parâmetros como seletividade, linearidade e precisão do método foram co-validados segundo a legislação vigente (ANVISA, 2003).

Esta análise foi realizada no cromatógrafo Waters, com injetor manual, provido de detector ultravioleta e integrador eletrônico. Foi utilizado um sistema CLAE isocrático, equipado com a coluna cromatográfica Hibar[®] LiChrosorb RP 18 de 5 μ e 25 cm, pré-coluna (C18), mantida a temperatura ambiente, loop de 20 μ L, fluxo de 1,0 mL/min, tempo de retenção de 7,8 minutos e fase móvel composta por metanol: água na proporção de 87:13. O comprimento de onda de detecção foi fixado em 310 nm, correspondente ao $\lambda_{\text{máx}}$ encontrado por espectrofotometria de varredura na região do UV, de uma solução de MCO a 10 μ g/mL preparada na fase móvel metanol: água (87:13).

As amostras provenientes dos ensaios de liberação e dos ensaios de penetração/permeação cutânea também foram analisadas por CLAE, utilizando à mesma metodologia descrita acima.

5.6.1 Preparo das Soluções de Trabalho.

Uma solução de estoque contendo 250 μ g/mL de MCO foi preparada por meio da solubilização de cerca de 0,025 g de MCO, exatamente pesados, em 100 mL de fase móvel. A partir dessa solução, foram realizadas cinco diluições, utilizando a fase móvel como solvente, de modo a obter concentrações de 2,5; 5; 10; 15 e 20 μ g/mL de MCO. Todas as soluções foram filtradas em filtros Millipore com 0,45 μ m antes da injeção no cromatógrafo.

5.6.2. Preparo das Amostras para a Quantificação do Teor de MCO nos Nanocosméticos Desenvolvidos.

Foram pesados com exatidão cerca de 0,125 g de cada nanocosmético desenvolvido, transferidos para balão volumétrico de 100 mL e diluída com a fase móvel. As soluções foram levadas ao banho de ultra-som por 12 minutos, até a total solubilização, e completou-se o volume com a fase móvel. Foi retirada uma alíquota de 1,0 mL dessa solução e transferida para um balão de 10,0 mL, e o volume completado com a fase móvel. Esta solução foi filtrada em filtros Millipore com 0,45 µm antes da injeção no cromatógrafo.

5.6.3 Parâmetros Avaliados por CLAE.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003), a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Normalmente, os parâmetros analíticos encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez (RIBANI *et al.*, 2004).

A) Seletividade ou Especificidade.

A *seletividade* ou *especificidade* de um método instrumental de separação é a sua capacidade de diferenciar e quantificar a substância de interesse na presença de outros componentes na amostra (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1995; ANVISA, 2003). A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Esta foi avaliada comparando uma matriz isenta da substância de interesse (branco) e uma matriz adicionada com esta

substância (padrão) na concentração de 8%, sendo que nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, ficando separada dos demais compostos presentes na amostra.

B) Linearidade.

A *linearidade* de um procedimento corresponde a sua capacidade em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de aplicação (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1995; ANVISA, 2003). A linearidade da curva padrão foi avaliada por meio do coeficiente de determinação (r^2).

O intervalo da curva padrão deriva do estudo de linearidade do método e depende do objetivo de sua aplicação (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1995; ANVISA, 2003). A faixa de variação corresponde ao intervalo entre a concentração superior e inferior da substância analisada que atenda aos requisitos de precisão, exatidão e linearidade (RIBANI *et al.*, 2004). O intervalo de concentração (2,5, 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$ de MCO) foi obtido avaliando-se esses parâmetros para os valores utilizados para a construção da curva padrão obtida em cada experimento com padrão de trabalho de MCO lote CIQ 0609021702/MERCK.

C) Precisão.

A *precisão* representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1995; ANVISA, 2003). A precisão é uma medida, normalmente expressa quantitativamente em termos de imprecisão e computada como desvio padrão (s), desvio padrão relativo

(DPR) ou coeficiente de variação (CV). É considerada em três níveis: repetitividade (precisão intra-dia), precisão intermediária (precisão inter-dia) e reprodutibilidade. A precisão foi avaliada pelo desvio padrão (s) e desvio padrão relativo (DPR) e repetitividade.

D) Exatidão.

A *exatidão* representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1995; ANVISA, 2003). Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação e adição de padrão (RIBANI *et al.*, 2004). A exatidão do método foi avaliada pelo ensaio de recuperação da quantidade de MCO extraída, adicionada a um branco da matriz em análise (pele suína).

5.7. Eficácia das Formulações Anti-solares.

A eficácia de uma formulação contendo filtro solar é comumente determinada através da maior ou menor proteção proporcionada contra a queimadura. De acordo com ANVISA, o FPS é definido pela razão de tempo de exposição à radiação ultravioleta necessária para produzir dose mínima de eritema (DME) na pele protegida pelo tempo de aparecimento do mesmo eritema na pele desprotegida (após aplicação de 2 mg/cm² do produto) (RUVOLO JÚNIOR, 1997; ANVISA, 2006).

Sendo assim, a eficácia das formulações anti-solares pode ser avaliada empregando metodologias *in vivo*, determinação do FPS a seco e após imersão em água,

em voluntários sadios (10 a 20) com diferentes tipos de pele (I, II, III e IV), de ambos os sexos, com sensibilidade mediana à radiação ultravioleta (ANVISA, 2006).

Devido aos custos envolvidos nos ensaios com voluntários, o emprego da metodologia *in vitro* é uma ferramenta normalmente utilizada para os estudos preliminares da determinação do FPS de novos filtros solares e na rotina do controle de qualidade destas formulações (MANSUR *et al.*, 1986; DIFFEY, 1997; SPRINGSTEEN *et al.*, 1999; RIBEIRO *et al.*, 2004).

5.7.1. Determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) *in vitro*.

O FPS *in vitro* das quatro formulações desenvolvidas foi determinado através do método de Mansur (MANSUR *et al.*, 1986).

Cada formulação citada acima foi submetida a uma diluição de modo a obter uma concentração final de 0,2 µl/ml do gel creme em etanol P.A. A seguir, procedeu-se à determinação da absorvância desta diluição frente ao solvente. Este procedimento foi realizado em triplicata e a determinação espectrofotométrica do FPS foi avaliada empregando o espectrofotômetro (modelo UV - 1601, marca Shimadzu). Os valores de absorvância destas amostras foram determinados nos comprimentos de onda de 290 a 320 nm, com um intervalo de cinco nm. Para o cálculo do FPS, foi utilizada a equação matemática (EQUAÇÃO 5), que relaciona o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda (EE x I) (TABELA 3) (MANSUR *et al.*, 1986; SANTOS *et al.*, 1999; FREITAS *et al.*, 2001):

EQUAÇÃO 5: Cálculo do FPS segundo Mansur *et al.*, 1986.

$$\text{FPS}_{\text{espectrofotométrico}} = \text{FC} \cdot \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \cdot \text{I}(\lambda) \cdot \text{abs}(\lambda)$$

Onde: FC =10 (fator de correção), EE (λ) = efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda (λ) definido pela Tabela 3. I (λ) = intensidade da luz solar no comprimento de onda (λ) definido pela Tabela 3. Abs (λ) = valor espectrofotométrico da absorvância da solução da preparação no comprimento de onda (λ) definido pela Tabela 3 (Mansur *et al.*, 1986).

TABELA 3: Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda (Mansur *et al.*, 1986).

λ (nm)	EE (λ) x I (λ)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
	1,0000

5.7.2. Determinação do FPS *in vivo* a seco.

O FPS *in vivo* a seco das quatro formulações desenvolvidas foi determinado de acordo com o protocolo da associação europeia The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association (COLIPA, 2006). Foram avaliados 10 voluntários sadios do sexo feminino, com idades entre 18 e 59 anos, com fototipos I, II, III, utilizando um simulador ultravioleta multiport 601 (Solar Light Company, Philadelphia, USA).

Nas costas de cada voluntário foi demarcada uma área (0,3 m x 0,3 m). Um quadrado foi selecionado e utilizado para se determinar a DME na pele não tratada. Após 16 a 24 horas, aplicou-se 0,05g (2 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$) da formulação contendo os filtros solares padrão (TABELA 4) e a formulação a ser testada no quadrado adjacente; este foi subdividido em sub-áreas de aproximadamente 1 cm^2 (FIGURA 15), onde as amostras foram aplicadas com a ajuda de uma dedeira e espalhadas de maneira uniforme. Após

TABELA 4: Fórmula da emulsão padrão utilizada nos testes de FPS *in vivo*.

Composição	Concentração (g)
Fase I	
Lanolina	4,5
Manteiga de Cacau	2,0
Monoestearato de Glicerila SE	3,0
Ácido esteárico	2,0
Octil Dimetil PABA	7,0
Benzofenona -3 (“Oxibenzona”)	3,0
Fase II	
Água	71,6
Sorbitol	5,0
Trietanolamina	1,0
Metilparabeno	0,3
Propilparabeno	0,1
Fase III	
Álcool benzílico	0,5

5.7.3. Determinação do FPS *in vivo* Após a Imersão em Água.

Após a aplicação da radiação ultravioleta nas áreas demarcadas nas costas de cada voluntário (0,3 m x 0,3 m), tanto para a formulação testada quanto para o controle, aplicou-se o produto novamente em área intacta. Após 15 minutos, cada voluntário entrou na banheira de hidromassagem, com água na temperatura entre 23°C e 32°C por um período inicial de 20 minutos com agitação moderada da água. A seguir, cada voluntário permaneceu 20 minutos em repouso fora da banheira. Repetiu-se, o procedimento de agitação por mais 20 minutos. Os voluntários foram acompanhados durante a imersão para assegurar que as áreas de testes não fossem tocadas. Após totalizar 40 minutos em contato com a água, o voluntário foi seco com secador elétrico nas áreas de teste e com toalha macia nas demais áreas. Os locais de teste foram expostos à luz ultravioleta, utilizando-se o mesmo método aplicado para a determinação do FPS *in vivo* a seco.

5.8. Análise Estatística.

Os dados experimentais consistem do resultado da média \pm desvio padrão, os quais foram submetidos a análise estatística (um fator – ANOVA, $\alpha = 0,05$), utilizando o software SigmaStat para Windows 3.11.

5.9. Segurança das Formulações Fotoprotetoras.

A segurança das formulações cosméticas pode ser avaliada por técnicas *in vitro*, empregando um modelo bicompartimental, conhecido como célula de difusão vertical e pele natural (humana ou animal) (WISSING & MULLER, 2002; SIMEONI, SCALIA & BENSON, 2004; JIMENEZ *et al.*, 2004; MARTINI & SEILLER, 2006).

Por outro lado, a determinação da velocidade de liberação do ativo destas formulações pode prover o controle de qualidade das mesmas. Para tal, pode-se empregar o mesmo sistema bicompartimental com membranas artificiais como acetato de celulose, nitrato de celulose e polissulfona (UNITED STATES, 1997; HAIGH & SMITH, 1994), as quais não oferecem resistência à passagem do ativo do compartimento doador para o compartimento receptor, proporcionando, desta forma, sua quantificação neste último, em função da partição entre o veículo e o meio receptor.

5.9.1. Estudo da Solubilidade do MCO e Escolha da Solução Receptora.

Inicialmente, a solubilidade do MCO foi estudada em diferentes meios, com a finalidade de escolher a melhor solução receptora para ser utilizada nos estudos de liberação e penetração e/ou permeação. As soluções receptoras analisadas foram as citadas abaixo:

- Tampão fosfato pH 7,4;

- Tampão fosfato pH 7,4, com polissorbato 80, nas concentrações de 2,0; 4,0 e 5,0 % (p/v);
- Tampão fosfato pH 7,4, com 2,0 % (p/v) de polissorbato 80 e etanol a 30 % (MOTA, 2005).

As amostras para a determinação da solubilidade foram preparadas adicionando-se uma quantidade em excesso de MCO a 5 mL de cada meio a ser testado. Estas amostras foram mantidas sob agitação magnética durante 24 horas, a uma temperatura ambiente em torno de 25°C. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos. Foram retiradas alíquotas de 1,0 mL de cada amostra e diluídas nas soluções receptoras descritas acima. A determinação da solubilidade do MCO nestas soluções foi realizada por espectrofotometria de absorção no UV-vísivel (λ máx de 310 nm).

A partir das absorbâncias encontradas de cada amostra e da curva de calibração obtida para cada meio, foram encontradas as concentrações de MCO em $\mu\text{g/mL}$, que multiplicadas pelo fator de diluição, forneceram a concentração de saturação do MCO em cada meio, nas condições utilizadas.

5.9.2. Estudos de Liberação *in vitro*.

Células de difusão vertical tipo Franz foram empregadas. Estas células consistem de um compartimento doador e um receptor, entre os quais é colocado uma membrana (FRANZ, 1975). A área para difusão foi de $1,96 \text{ cm}^2$ e o compartimento receptor possuía um volume de 7,5 mL.

A solução receptora empregada foi uma mistura de tampão fosfato pH 7,4 contendo 5% de polissorbato 80. As membranas de acetato de celulose com tamanho do poro de $0,2 \mu\text{m}$ foram submetidas à hidratação (em água, a 100°C , durante cinco

minutos por três vezes) e montadas nas células de difusão (HAIGH & SMITH, 1994). Cada compartimento receptor foi mantido sob agitação constante (900 rpm) por meio de pequena barra magnética. A presença de bolhas abaixo da membrana foi sempre monitorada. O sistema de difusão foi preparado 30 minutos antes da aplicação da amostra no compartimento doador (aproximadamente um grama) para efetuar o equilíbrio entre a membrana e o meio receptor. Em intervalos de tempo pré-determinados, uma alíquota de 1 mL foi retirada para análise, havendo reposição do volume com solução receptora. A presença do MCO na solução receptora foi monitorada por 3 horas. As amostras foram submetidas à análise por CLAE de acordo com as condições estabelecidas em 5.6.

O transporte foi expresso através do fluxo, após equilíbrio, definido como quantidade de fármaco liberado por unidade de área e por tempo. Os resultados plotados nas figuras são a média \pm desvio padrão (d.p) de seis experimentos e os dados obtidos foram analisados estatisticamente empregando-se análise de variância (ANOVA – um fator) com nível de significância (α) de 5%, com auxílio do programa Sigma Stat for Windows 1.0 (Jandel Corporation, 1994).

5.10. Estudo de Penetração e/ou Permeação Cutânea .

5.10.1. Obtenção e Limpeza da Pele Suína.

Orelhas retiradas de suínos de até seis meses de idade foram obtidas no matadouro da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizado no município de Seropédica.

Logo após o abate, as orelhas foram retiradas antes do animal prosseguir para etapa de banho quente. No menor tempo possível, foram transportadas, sob refrigeração, ao laboratório, onde foram lavadas sob água corrente para remoção de manchas de

sangue. A pele da parte posterior da orelha foi excisada com auxílio de bisturi e pinça e, com auxílio de tesoura e pinça, o excesso de tecido adiposo foi retirado da parte inferior da pele. A seguir, pedaços de pele circulares de aproximadamente 11,0 cm² foram acondicionados em filme de cloreto de polivinila (PVC) e papel alumínio, com remoção de ar e devidamente etiquetados e armazenados, a -20°C, por no máximo quatro semanas antes do uso (FIGURA 16).

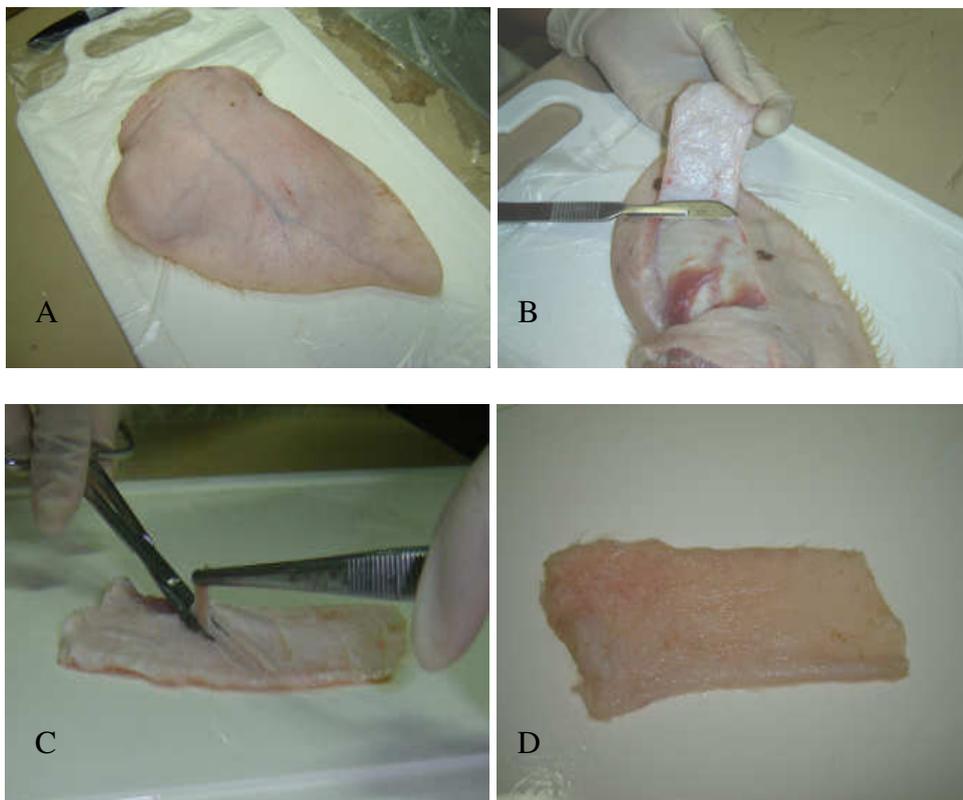


FIGURA 16: Limpeza da orelha suína. (A) Orelha suína lavada. (B) Retirada da pele com auxílio de bisturi. (C) Retirada do excesso de gordura subcutânea. (D) Segmento de pele limpo (BEMVINDO, 2006).

5.10.2. Validação da Metodologia para a Extração e Quantificação de MCO na Epiderme e Derme Suína.

Inicialmente, segmentos de pele suína de um cm² foram imersos em água destilada a 60°C, por 60 segundos (BHATIA, GAO & SINGH, 1997), com o objetivo de

separar a epiderme da derme com auxílio de bisturi. Os dois estratos cutâneos (epiderme e derme) foram transferidos para tubos de eppendorf.

Adicionou-se 20 µL de diferentes soluções padrão de MCO, diretamente sobre cada segmento de pele (epiderme e derme), de modo a obter 3 níveis de concentração de MCO (1,6; 3,2 e 6,4 µg). O procedimento foi realizado em triplicata para cada nível de concentração e para o branco (segmento cutâneo mais fase móvel).

Como dito anteriormente, diferentes quantidades de MCO foram adicionados aos segmentos de um cm², tanto para a epiderme quanto para a derme:

1,6 µg: 20 µL de solução de MCO a 80 µg em fase móvel.

3,2 µg: 20 µL de solução de MCO a 160 µg em fase móvel.

6,4 µg: 20 µL de solução de MCO a 160 µg em fase móvel.

5.10.3. Metodologia de Extração de MCO na Epiderme e Derme Suína.

Após três horas de contato para a impregnação do MCO no tecido e para a evaporação total do solvente, procedeu-se a extração do MCO. Cada um dos estratos cutâneos (epiderme e derme) foram transferidos para um tubo eppendorf e adicionados 1,5 mL de fase móvel, agitados por 30 segundos em vortex, seguido de 12 minutos de banho de ultrassom, e nova agitação. Os eppendorfs foram centrifugados a 6400 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado por unidade filtrante com poro de 0,45 µm e analisados por CLAE.

A precisão foi avaliada pelo desvio padrão, pelo desvio padrão relativo e pela repetitividade das análises. A média do coeficiente de correlação (r) foi realizada para n= 5, para verificação da linearidade dentro da faixa de concentração de 0,1 a 20 µg/mL.

5.10.4. Protocolo da Penetração/Permeação Cutânea das Formulações Contendo

MCO.

Os estudos de penetração/permeação do MCO foram realizados em célula de difusão vertical. As células de difusão foram montadas da mesma forma que no estudo de liberação *in vitro*, descrito no item 5.9.2. Após o descongelamento, a pele suína total excisada foi montada horizontalmente sobre a célula de difusão vertical, com o EC faceando o compartimento doador e a derme em contato com a solução receptora, evitando sempre a formação de bolhas.

O compartimento receptor foi preenchido com solução receptora (tampão fosfato pH 7,4 adicionado de polissorbato 80 a 5%). Ao longo do experimento, a solução receptora permaneceu sob agitação contínua de 900 rpm, por meio de uma pequena barra magnética, a fim de conservar a homogeneidade. As células foram mantidas a 37° C ± 0,5 por banho termostaticado.

As peles permaneceram durante 1 hora em contato com a solução receptora, permitindo estabelecer um equilíbrio no ambiente. Após esse tempo, foi realizada a coleta de uma alíquota de 1 mL de solução receptora. Em seguida, foi aplicada no compartimento doador, ou seja, sobre o EC aproximadamente 400 µl de formulação, com auxílio de uma pipeta automática para semi-sólidos. Sendo que uma célula era sempre utilizada como branco, isto é, isenta de formulação. A cada 1 hora era coletada uma alíquota de 1 mL de solução receptora, perfazendo um período de 6 horas. A cada alíquota retirada o volume era repostado com nova solução receptora.

Essas amostras foram filtradas por unidade filtrante com poro de 0,45 µm e analisadas por CLAE, com a finalidade de verificar se ocorreu permeação do MCO.

Ao término das 6 horas de experimento, o sistema foi desmontado, a pele foi retirada da célula com auxílio de uma pinça. O excesso de formulação foi retirado da

superfície da pele, limpando-a duas vezes com algodão umedecido e mais uma vez com algodão seco. A epiderme foi separada da derme com auxílio do bisturi (FIGURA 17).

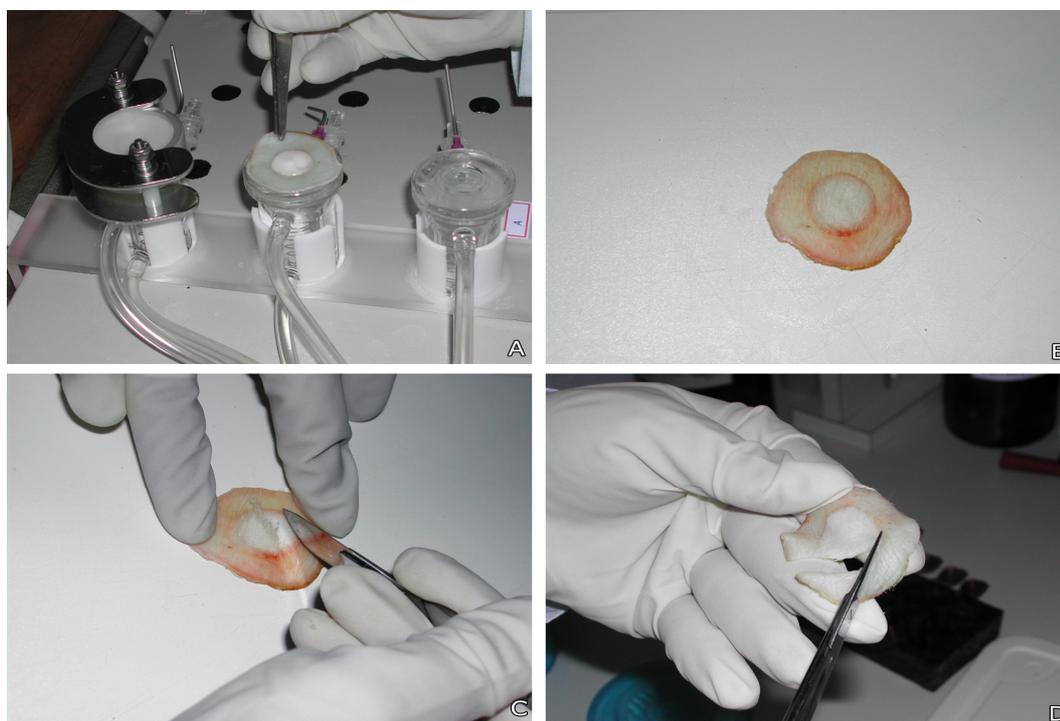


FIGURA 17: (A) Retirada do segmento da pele; (B) Pele após a remoção da formulação; (C) Separação dos estratos cutâneos; (D) (FREITAS, 2005).

Após a separação dos segmentos cutâneos (epiderme e derme) foram submetidos ao processo de extração do MCO conforme descrito no item 5.10.3. As amostras foram submetidas à análise por CLAE de acordo com as condições estabelecidas em 5.6.

6. Resultados e Discussão.

6.1. Caracterização Físico-Química MCO.

A Farmacopéia Brasileira não disponibiliza padrões primários para filtros solares, além disso, existe a dificuldade em se obter padrões farmacopéicos internacionais. Desta forma, foram realizados testes de caracterização da matéria prima MCO adquirida pela empresa GALENA com procedência da MERCK, e esta foi utilizada como padrão de trabalho.

O filtro UV utilizado neste trabalho apresentou teor de pureza de 98,4%, e é permitido seu uso em cosméticos, perfumes e produtos de higiene pessoal, de acordo com a resolução RDC Nº 47, de 16 de março de 2006.

6.1.1. Determinação dos Parâmetros de Absorção na Região do UV.

A análise realizada no espectro de absorção na região do UV tornou possível a determinação de alguns parâmetros, permitindo a identificação da substância. O espectro de absorção obtido a partir de uma solução de MCO a 8,22 µg/mL em etanol mostrou que a molécula apresenta uma absorção máxima em 310 nm (FIGURA 18).

Na avaliação do espectro de MCO foi possível determinar o λ máximo, a absorbância máxima e calcular o coeficiente de extinção molar (ϵ), resultados que contribuem para sua identificação. O ϵ indica o poder de absorção da radiação UV pela molécula (TABELA 5).

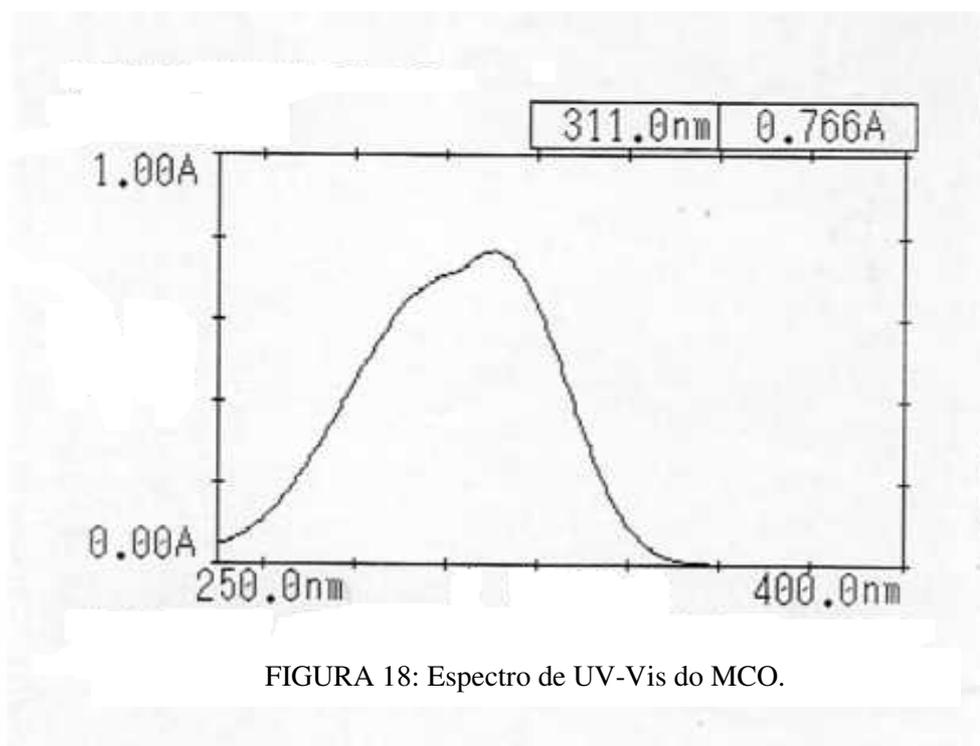


FIGURA 18: Espectro de UV-Vis do MCO.

TABELA 5: Parâmetros observados na análise por ultravioleta do MCO.

Parâmetros do MCO Avaliados	
Teor	98,4%
Solvente	Etanol P.A
Concentração	8,22 µg/ mL
λ máximo	311 nm
λ máximo literatura *	311 nm
Abs. Máx.	0,766
ε	23297
ε literatura *	23300

*(SHAAT, 1995)

Com os resultados encontrados na análise do MCO por espectrofotometria de UV pode-se concluir que o λ máximo e ϵ obtido na análise estão de acordo com os valores de referência da literatura. Sendo, portanto, um indicativo da identidade para esta molécula.

Segundo Garcia (1998), na elaboração da curva-padrão do MCO devem ser utilizadas concentrações determinadas pela curva de Ringbom. Portanto, a curva de calibração foi realizada com cinco pontos (2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 µg/mL).

A reta de calibração apresentou coeficiente de correlação (r) de 0,996 e equação da reta $y = 0,1008x - 0,0413$, indicando uma boa linearidade (FIGURA 19). O coeficiente de determinação (R^2) de 0,993 demonstrou uma relação linear para as concentrações escolhidas (NETO *et al.*, 2002).

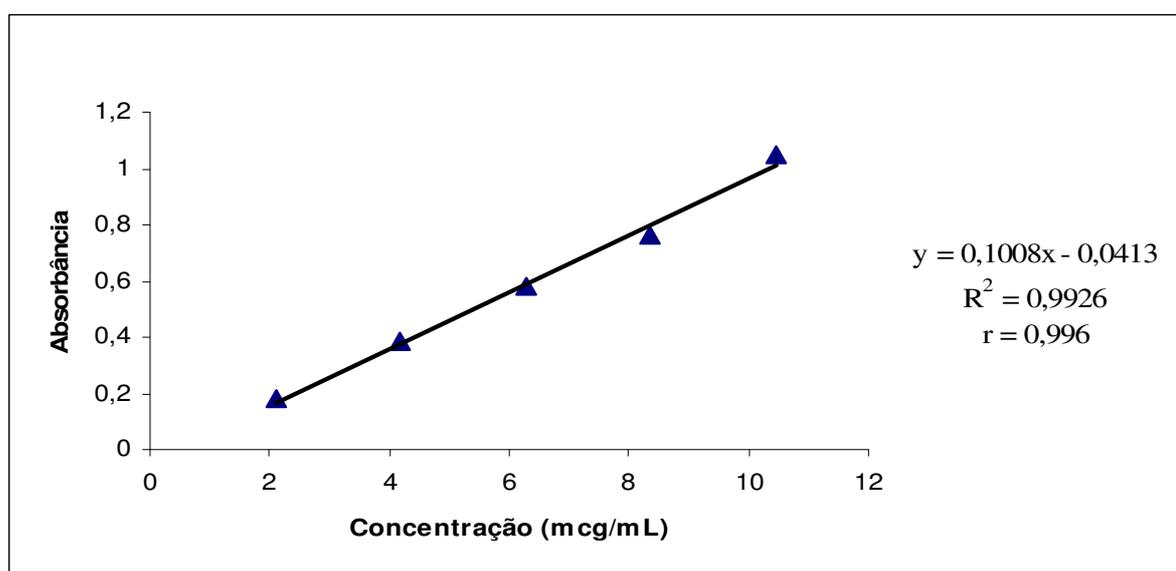


FIGURA 19: Representação da curva padrão média do MCO por espectroscopia de ultravioleta (UV) utilizando como solvente etanol P.A. $y = ax + b$; onde y = variável dependente (absorbância); x = variável independente (concentração µg/mL); a ou coeficiente angular da reta = 0,1008; b ou coeficiente linear da reta = 0,0413; r ou coeficiente de correlação = 0,996 e R^2 ou coeficiente de determinação = 0,9926.

6.1.2. Determinação dos Parâmetros do Espectro de Absorção do MCO na Região do Infravermelho.

Os espectros de IV são considerados a impressão digital do composto, pois demonstram as diferentes interações que a radiação eletromagnética pode exercer com a molécula (vibração e rotação) (SOARES, 2006).

No espectro foram selecionadas as principais bandas de absorção e comparadas com os valores encontrados na literatura. De acordo com a TABELA 6, a amostra apresentou bandas de absorção com valores próximos ao seu padrão da literatura, sendo um indicativo da similaridade entre a estrutura química da amostra e seu respectivo padrão. Foram observadas bandas características de deformação axial na faixa de 1710 a 1422 cm^{-1} correspondentes aos grupamentos CH=CH de ésteres α , β insaturados; C=O de carbonila de ésteres e C=C do anel aromático, indicando os principais grupamentos cromóforos do MCO responsáveis pela absorção na região do UV. Estas bandas características estão demonstradas na FIGURA 20, que corresponde ao Espectro de Infravermelho do MCO.

TABELA 6: Comparação das principais bandas de absorção do espectro infravermelho do MCO.

Principais bandas de absorção	
Amostra	Literatura (BP, 2004)
1710 cm^{-1}	1700 cm^{-1} (C=O)
1604 cm^{-1}	1610 cm^{-1} (C=C aromático)
1254 cm^{-1}	1200 cm^{-1} (C-O)

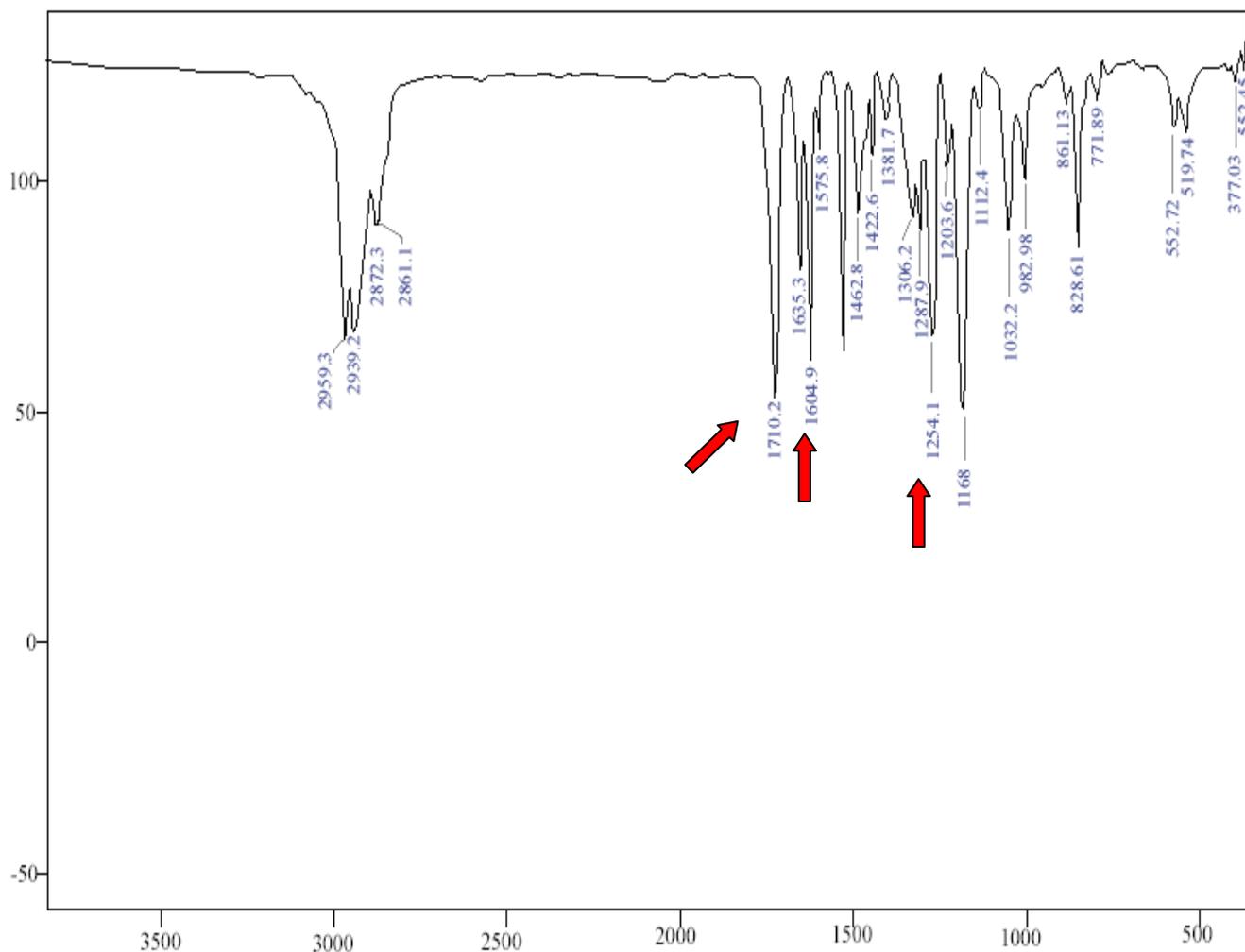


FIGURA 20: Espectro de Infravermelho do MCO (filme entre cristais de NaCl).

6.2. Formação e Purificação do Sistema Nanoestruturado β -CD/MCO.

O preparo do nanossistema β -CD/MCO foi realizado pelo método de *kneading* (empastagem), e a purificação com solução de metanol a 50% (MOTA, 2005).

6.2.1. Caracterização do Sistema Nanoestruturado β -CD/MCO por Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H).

A interação entre o MCO e a β -CD foi investigada por espectroscopia de RMN- ^1H , que garante as evidências mais conclusivas da formação do complexo. Sendo que,

os deslocamentos químicos nos prótons diretamente envolvidos na encapsulação fornecem importantes informações sobre a geometria de complexação (CAMERON & FIELDING, 2001).

A técnica RMN-¹H demonstrou a interação do MCO com a cavidade da β-CD, esta inclusão foi evidenciada pela comparação do deslocamento químico dos principais hidrogênios do MCO livre, H₃,H₅, H₂,H₆, H₁ e H₂' (demarcados na FIGURA 21), com o deslocamento químico destes mesmos hidrogênios após a inclusão do MCO na cavidade da β-CD (demarcados na FIGURA 22) (PERTINHEZ *et al.*, 2007).

A TABELA 7 demonstra as mudanças que ocorreram nos valores do deslocamento químico dos prótons do MCO livre e induzida pela presença da β-CD. Os sinais dos prótons que tiveram valores de deslocamento negativos indicam a inserção dessas porções da molécula de MCO na cavidade da CD (CHAN *et al.*, 2000). A FIGURA 23 demonstra que a porção aromática da molécula do filtro solar está localizada dentro da cavidade da CD, com o grupo éster perto da superfície externa do macrociclo (SCALIA *et al.*, 2002).

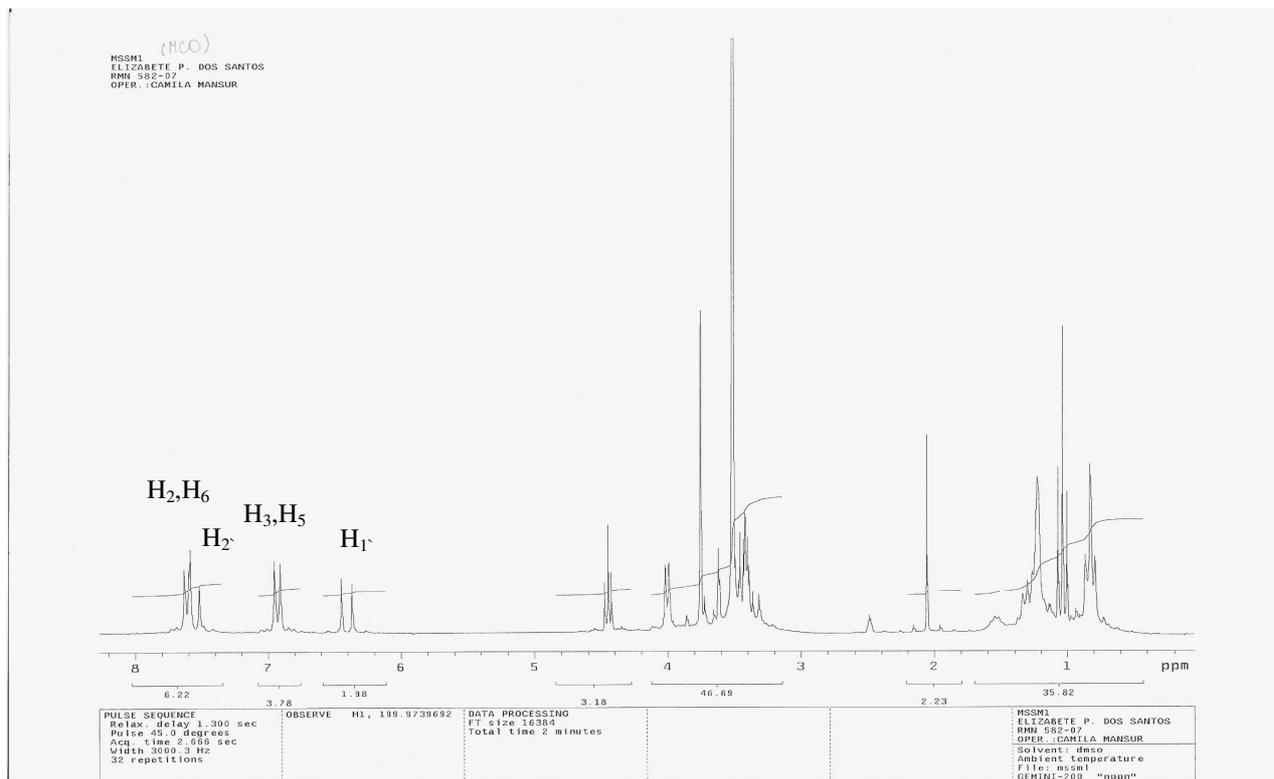


FIGURA 21: Espectro de RMN ^1H do *p*-metoxicinamato de octila.

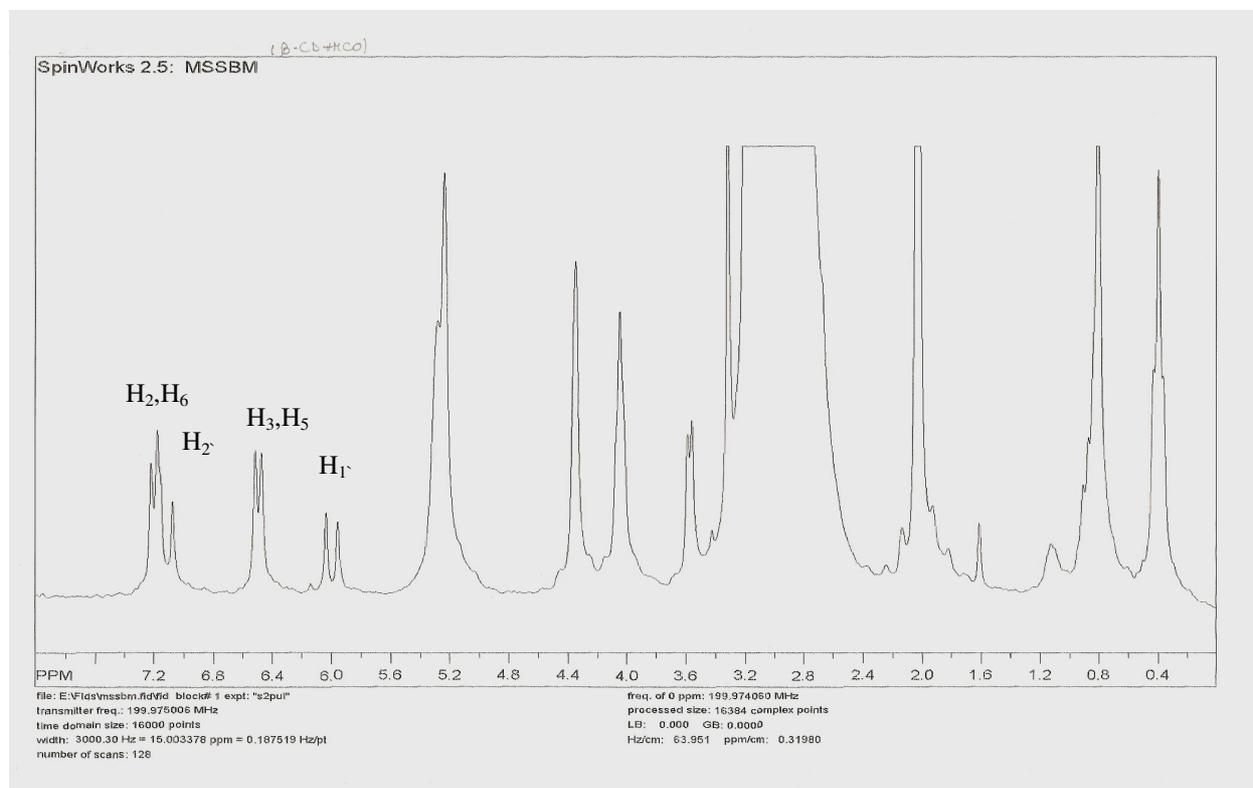


FIGURA 22: Espectro de RMN ^1H do complexo β -CD/MCO.

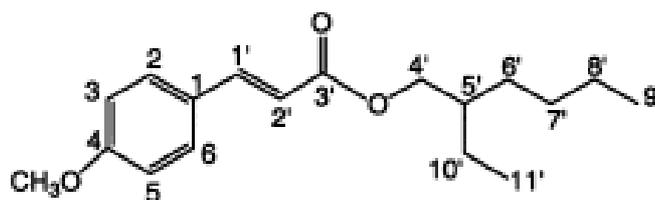


FIGURA 23: Molécula de MCO (SCALIA, 2002).

TABELA 7: Alterações nos deslocamentos químicos do *p*- metoxicinamato de octila incluso.

Prótons	MCO (valores de δ dos prótons marcados)	Complexo β - CD/MCO (valores de δ dos prótons marcados)	Complexo β - CD/MCO (valores de $\Delta\delta = \delta$ complexo – δ MCO)
H ₃ H ₅	6,8 ppm	6,5 ppm	- 0,30 ppm
H ₂ H ₆	7,6 ppm	7,2 ppm	- 0,40 ppm
H ₁ '	6,4 ppm	6,0 ppm	- 0,40 ppm
H ₂ '	7,6 ppm	7,1 ppm	- 0,50 ppm

6.2.2. Caracterização do Sistema Nanoestruturado β -CD/MCO por Difração de Raio X.

A difração de raio X baseia-se na comparação dos difratogramas das substâncias puras e do complexo formado (BUDAL, 2003). Os padrões de difração do complexo formado foram diferentes dos obtidos a partir dos componentes individuais, como pode ser verificado ao comparar os difratogramas apresentados nas FIGURAS 24, 25 e 26. As diferenças entre esses difratogramas são evidenciadas através do surgimento e o desaparecimento de picos ou através das mudanças na intensidade relativa. Estas mudanças constituem indícios da formação do complexo (CAO *et al.*, 2005).

A FIGURA 24 corresponde ao difratograma da matéria prima β -CD, que é um pó branco. A FIGURA 25 corresponde ao difratograma da matéria prima β -CD que foi

submetida ao processo de *kneading* ou empastagem, o qual o complexo de inclusão β -CD/MCO foi submetido. Esta amostra foi denominada de mistura física. Este procedimento foi realizado para verificar se a matéria prima β -CD quando submetida ao processo de *kneading* ou empastagem seria capaz de gerar picos que mascarassem os picos gerados pelo complexo formado. A FIGURA 26 corresponde ao difratograma do sistema β -CD/MCO.

O padrão de difração de raio X do sistema β -CD/MCO difere consideravelmente da matéria-prima β -CD (FIGURA 24 e 26). As principais diferenças são observadas pelo aparecimento de picos mais intensos na região de 18 a 20 θ do difratograma e deslocamento de novos picos na região inicial do difratograma, significando que houve a inclusão do MCO na cavidade da CD. O difratograma do complexo indica uma nova fase sólida, a do complexo de inclusão.

Houve uma pequena mudança no difratograma da mistura física em relação ao difratograma da matéria prima β -CD, que foi evidenciada através da diminuição do sinal do pico existente na região inicial do difratograma da mistura física. Entretanto, não houve outras alterações significativas neste difratograma, desse modo indicando que a β -CD não gera picos que interfiram na identificação do complexo formado.

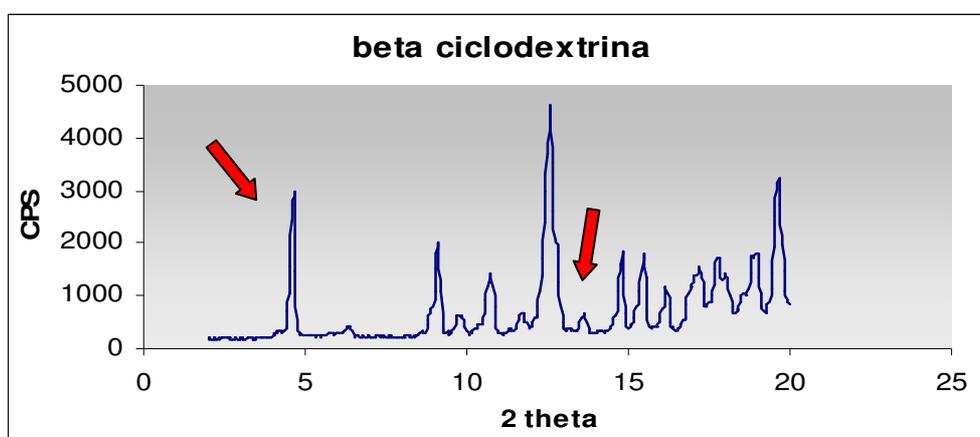


FIGURA 24: Difratograma da β -CD.

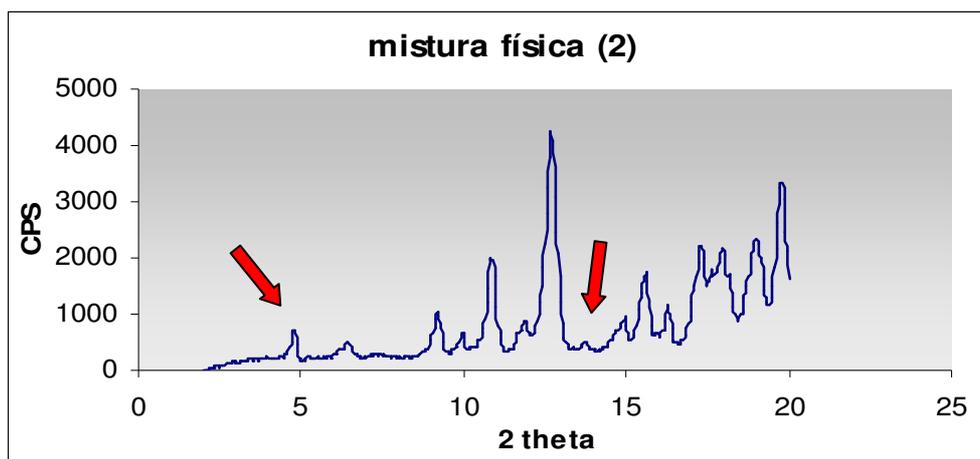


FIGURA 25: Difratoograma da β -CD/mistura física.

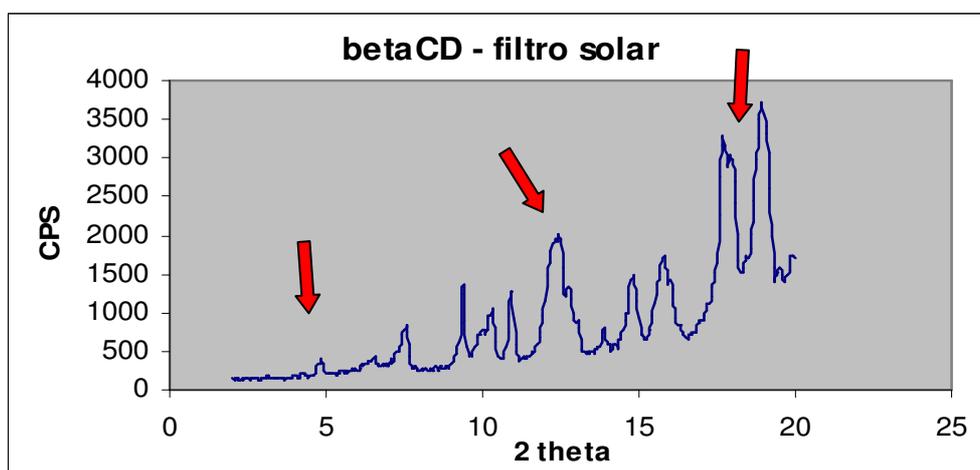


FIGURA 26: Difratoograma do sistema β -CD/MCO.

6.2.3. Caracterização do Sistema Nanoestruturado β -CD/MCO por Espectroscopia de Infravermelho.

A espectroscopia de infravermelho baseia-se nos deslocamentos das bandas de absorção do ativo quando este está incluído na cavidade da CD. O deslocamento é causado pela interação entre grupos de átomos da molécula hóspede com a CD, evidenciando a formação do complexo de inclusão (UEKAMA & OTAGIRI, 1987).

O espectro de IV do sistema nanoestruturado β -CD/MCO (FIGURA 28) foi comparado com o do *p*-metoxicinamato de octila (FIGURA 20) e com o da β -CD (FIGURA 27). O espectro de absorção do sistema β -CD/MCO apresentou alargamento dos picos característicos do MCO (bandas demarcadas com setas vermelhas na FIGURA 28). O alargamento dos picos provavelmente ocorreu devido à limitação das vibrações da molécula de MCO quando incluída na cavidade da β -CD. Também observase o deslocamento de algumas bandas de absorção do MCO para uma região de menor frequência. As bandas 1710 cm^{-1} e 1168 cm^{-1} , características do MCO, foram deslocadas após a inclusão em β -CD, para a região de 1708 cm^{-1} e 1161 cm^{-1} , respectivamente. Estes efeitos podem ser atribuídos a formação do sistema β -CD/MCO, portanto este método evidenciou a formação do complexo.

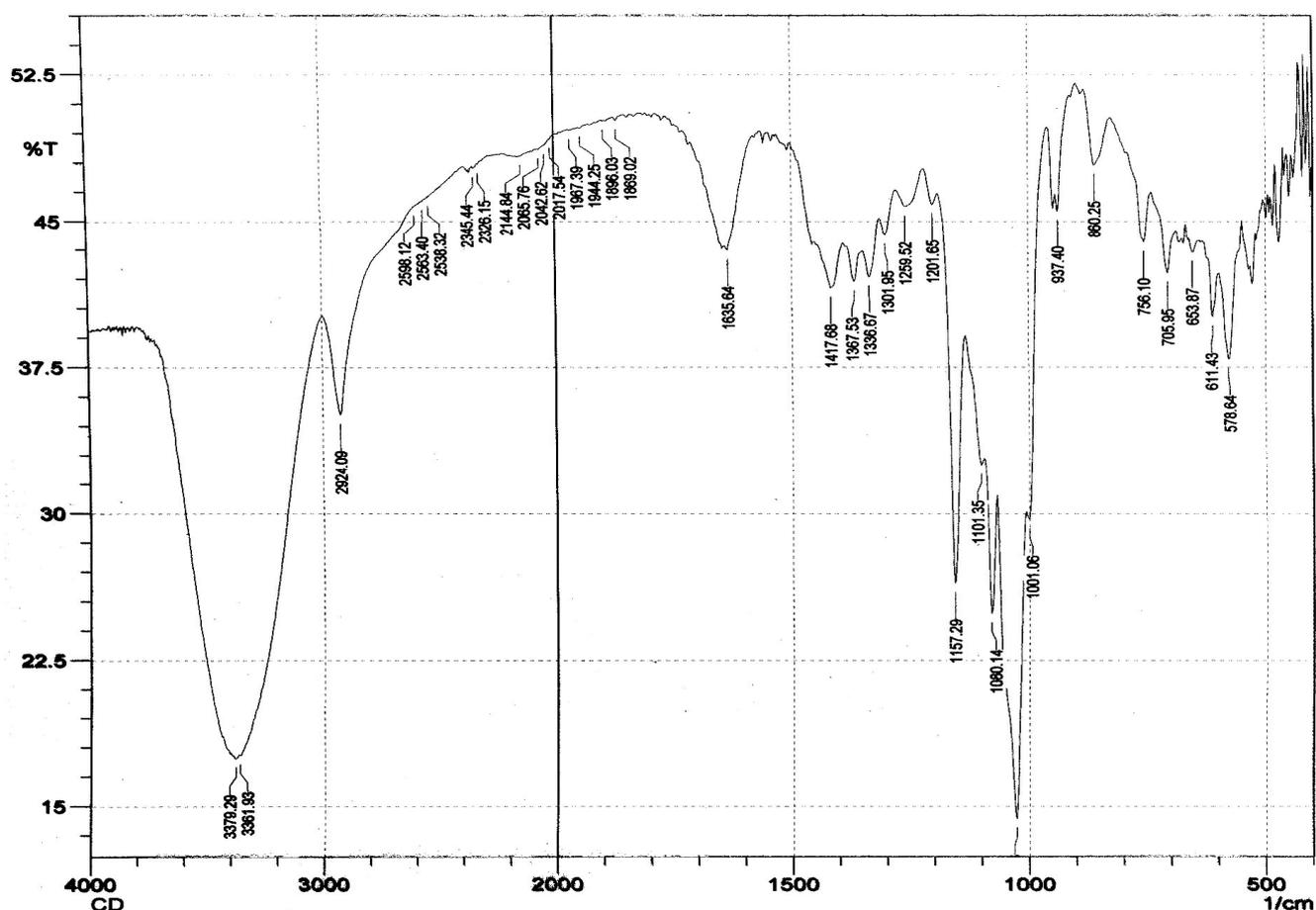


FIGURA 27: Espectro de IV da matéria prima β -CD.

As bandas de absorção compreendidas na faixa de 846-1640 cm^{-1} são características das vibrações da molécula de β -CD. A TABELA 8 descreve as bandas características da β -CD e do MCO.

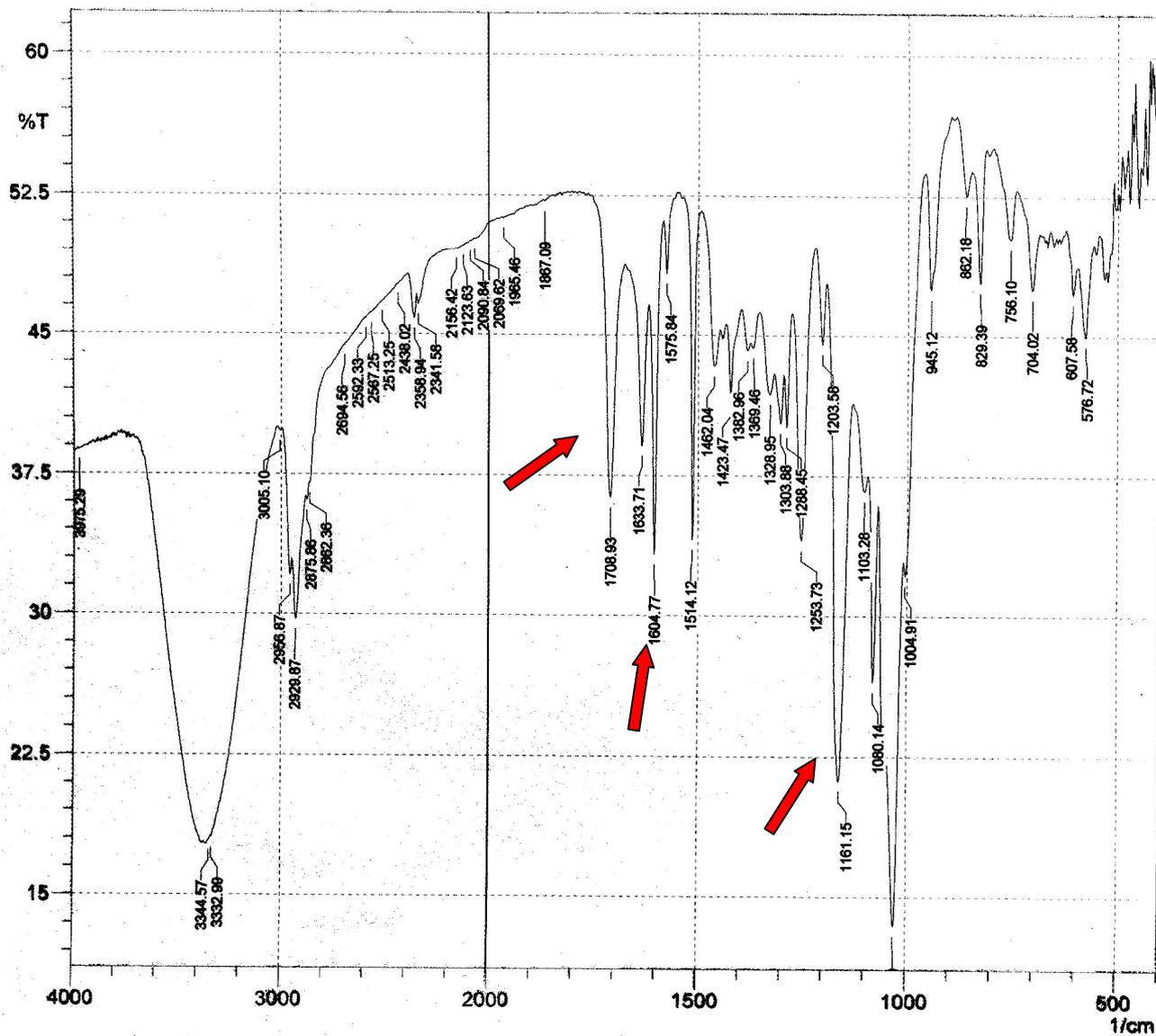


FIGURA 28: Espectro de IV do complexo β -CD/ MCO.

TABELA 8: Principais bandas de absorção da β -CD e do MCO.

Principais bandas de absorção		
β -CD	MCO	
3379 cm^{-1}		OH primárias
3361 cm^{-1}		OH secundárias
	1710 cm^{-1}	(C=O)
	1604 cm^{-1}	(C=C aromático)
1420 cm^{-1}		(OCH, CCH)
	1254 cm^{-1}	(C-O)
1157 cm^{-1}		(C-O-C)
1110 cm^{-1}		(C-O-C)

6.2.4 Determinação do Rendimento de Inclusão do Sistema Nanoestruturado β -CD/MCO por Espectrometria de Ultravioleta.

A quantidade de MCO incorporado no sistema β -CD/MCO foi determinada por espectrofotometria de UV e as absorvâncias encontradas foram plotadas na curva padrão, realizada no momento do ensaio. A TABELA 9 demonstra a concentração de MCO encontrada no sistema β -CD/MCO. O rendimento médio encontrado foi de 89% da massa inicial de MCO, este é um percentual satisfatório e corresponde a 6,70 g do filtro solar presente no nanosistema. Este resultado indica que o método de *kneading* ou empastagem e a posterior purificação do complexo formado foram eficazes.

TABELA 9: Determinação do rendimento da inclusão do complexo β -CD/MCO por espectrofotometria de UV.

Absorbância encontrada	Concentração (mg/ mL)	Rendimento (%)	Rendimento médio
0,175 \pm 0,005	1,78 \pm 0,055	86 \pm 3,10	
0,181 \pm 0,005	1,84 \pm 0,055	88,88 \pm 3,10	89 %
0,186 \pm 0,005	1,89 \pm 0,055	92,20 \pm 3,10	

6.3. Caracterização dos Lipossomas.

6.3.1. Verificação da Formação dos Lipossomas por Microscopia Óptica.

A microscopia óptica foi realizada após a normalização dos lipossomas em filtro Millipore[®], objetivando verificar a formação destas vesículas. Todas as fotomicroscopias foram realizadas por microscopia óptica com aumento de 100 vezes.

Na primeira fotomicroscopia (FIGURA 29), observam-se os lipossomas *in natura*, ou seja, sem sofrer nenhuma diluição. Nesta fotomicroscopia foi verificado que as vesículas estavam muito próximas, comprovando que as mesmas tendem a agrupar-se formando grandes aglomerados, além de possuírem uma grande mobilidade na lâmina dificultando a visualização da forma. Esta microscopia foi realizada com a finalidade de comprovar a formação dos lipossomas; entretanto, não foi possível verificar nenhuma característica mais específica, como tamanho e a população. Somente foi possível verificar o agrupamento das vesículas grandes.

A segunda e a terceira fotomicroscopias (FIGURA 30 e 31) correspondem à suspensão lipossomal diluída em aproximadamente 10 mL e 20 mL de uma solução etanólica a 25%, respectivamente. As frações lipossomais diluídas permitiram visualizar com maior nitidez a morfologia dos lipossomas. Em ambas as fotomicroscopias foram observadas vesículas muito heterogêneas e a existência de diversas

populações, sendo que uma população era composta por vesículas menores e outra população por vesículas maiores. Entretanto, todas se apresentaram esféricas e arredondadas. Contudo, avaliou-se que a diluição dificultou a visualização no microscópio óptico, pois os lipossomas continuaram a se movimentar intensamente tornando difícil a fixação na lâmina e a focalização das imagens.

De acordo com Sinko (2008) é possível utilizar um microscópio óptico para medir o tamanho de partículas na faixa de 0,2 a 100 μm , aproximadamente. Com auxílio de um programa gerenciador de imagens acoplado ao microscópio óptico de luz polarizada, foi possível realizar medidas aleatórias dos tamanhos das vesículas. A FIGURA 32 mostra a fotomicroscopia da fração lipossomal, filtrada em membrana 0,4 μm dos lipossomas com MCO a 72,00 mM, diluídos em 10 mL de solução etanólica a 25 % contendo as medidas aleatórias.

Embora as medidas tenham sido realizadas aleatoriamente, foi observado um tamanho médio das vesículas na ordem de 1000 nm ou 1 μm . Além de comprovar a heterogeneidade da amostra, pois o tamanho destas vesículas apresentou grandes variações.

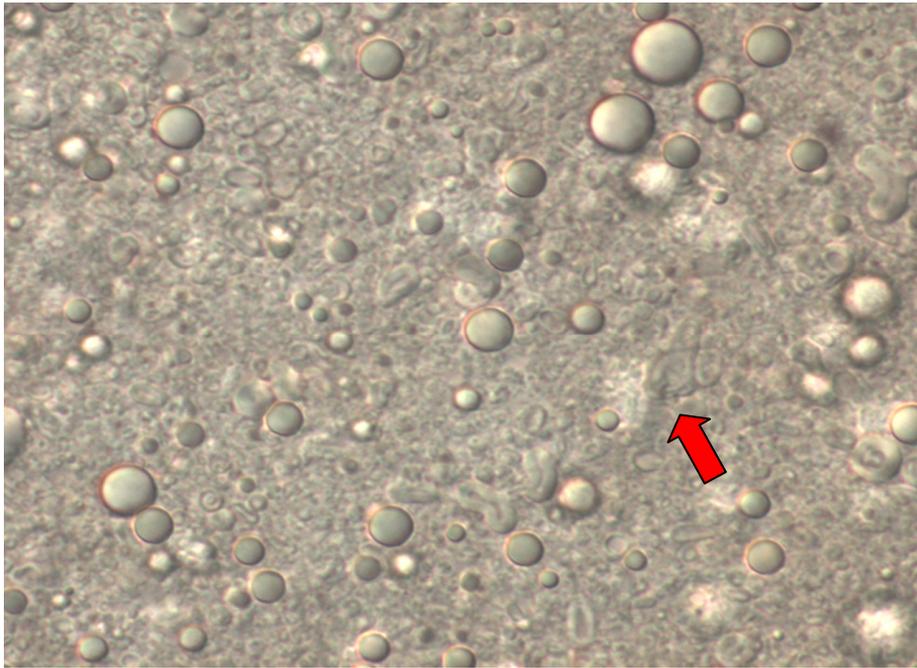


FIGURA 29: Foto microscopia óptica dos lipossomas com MCO a 72,00 mM – fração sem sofrer diluição. Aumento de 100 x, seta vermelha indica as vesículas.

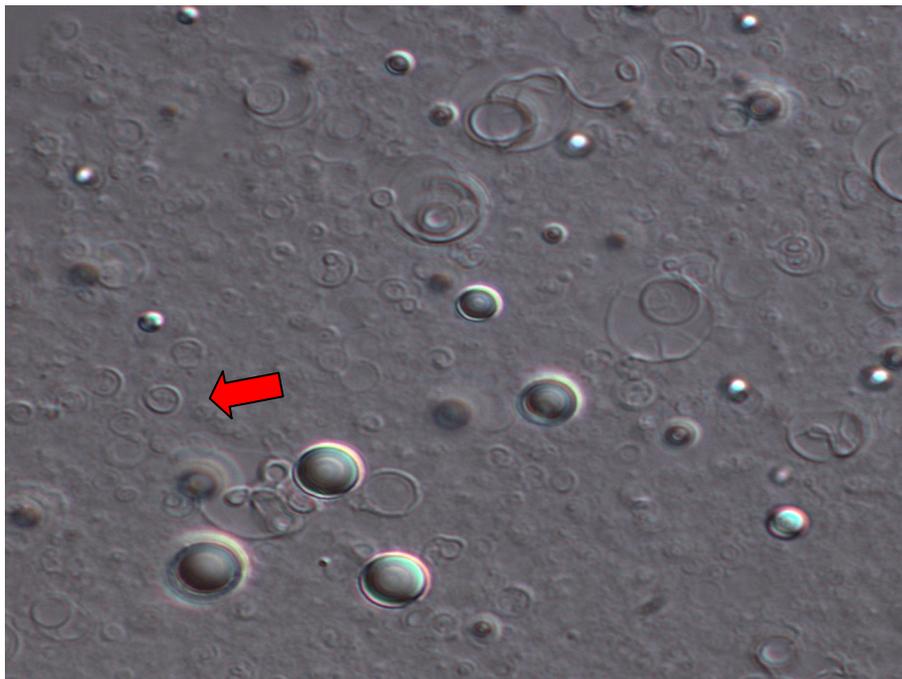


FIGURA 30: Foto microscopia óptica da fração filtrada em membrana 0,4 µm dos lipossomas com MCO a 72,00 mM diluídos em 10 mL de solução etanólica a 25 %. Aumento de 100x, seta vermelha indica as vesículas.



FIGURA 31: Foto microscopia óptica da fração filtrada em membrana 0,4 μm dos lipossomas com MCO a 72,00 mM diluídos em 20 mL de solução etanólica a 25 %. Aumento de 100x, seta vermelha indica as vesículas.

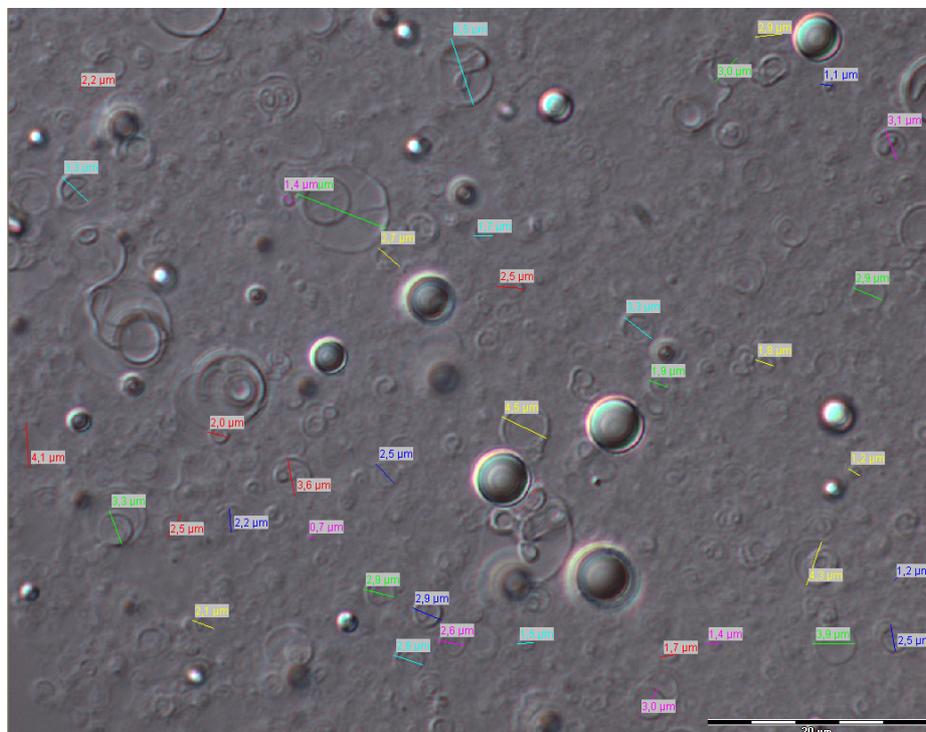


FIGURA 32: Foto microscopia óptica contendo medidas aleatórias da fração filtrada em membrana 0,4 μm dos lipossomas com MCO a 72,00 mM diluídos em 10 mL de solução etanólica a 25 %. Aumento de 100x.

6.3.2. Determinação do Tamanho dos Lipossomas por Espalhamento Dinâmico da Luz Laser.

O diâmetro médio dos lipossomas preparados com MCO a 72,00 mM foi caracterizado por espalhamento dinâmico de luz laser (DLS).

A FIGURA 33 apresenta os dados de distribuição média do diâmetro das vesículas lipossomais. Verificou-se que a fração da suspensão lipossomal apresentou uma variação de diâmetro de 85,8 nm a 1061 nm. Foram encontradas duas populações principais, sendo que a primeira apresentou um diâmetro médio de 104,9 nm e a segunda população apresentou um diâmetro médio de 867,5 nm. Entretanto, a segunda população apresentou uma intensidade mais alta, conseqüentemente esta população representou a maior parte das vesículas na suspensão lipossomal.

A FIGURA 34 corresponde ao gráfico de distribuição e a média (MD) do tamanho dos lipossomas (nm) estudado. Observou-se que este gráfico possui um comportamento bimodal, comprovando as duas populações existentes na amostra. Porém, quando calculado o diâmetro médio das duas populações existentes, observou-se um valor em torno de 600 nm. Diante dos valores de diâmetro observados podem-se classificar as vesículas como vesículas multilamelares grandes (VML).

A polidispersidade pode ser definida como a medida da largura da distribuição do tamanho das vesículas (MULLER *et al.*, 2004). Os lipossomas estudados apresentaram uma polidispersividade mediana (RICCI, 2005) indicando uma adequada distribuição do tamanho das vesículas (0,376, à temperatura de 25°C).

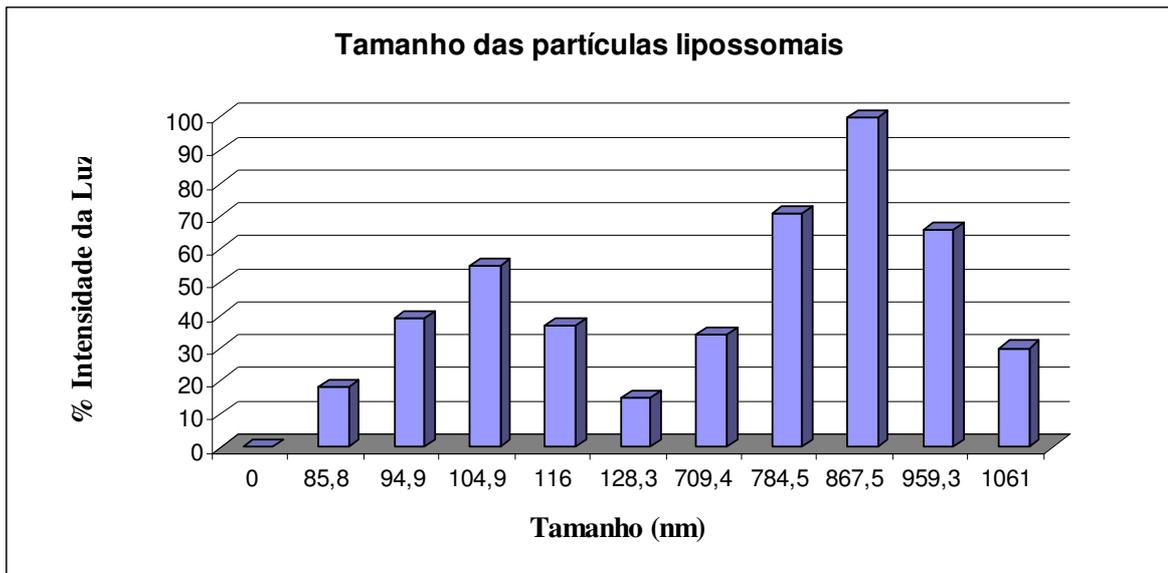


FIGURA 33: Tamanho das partículas nos lipossomas com MCO 72,00 mM - fração filtrada.

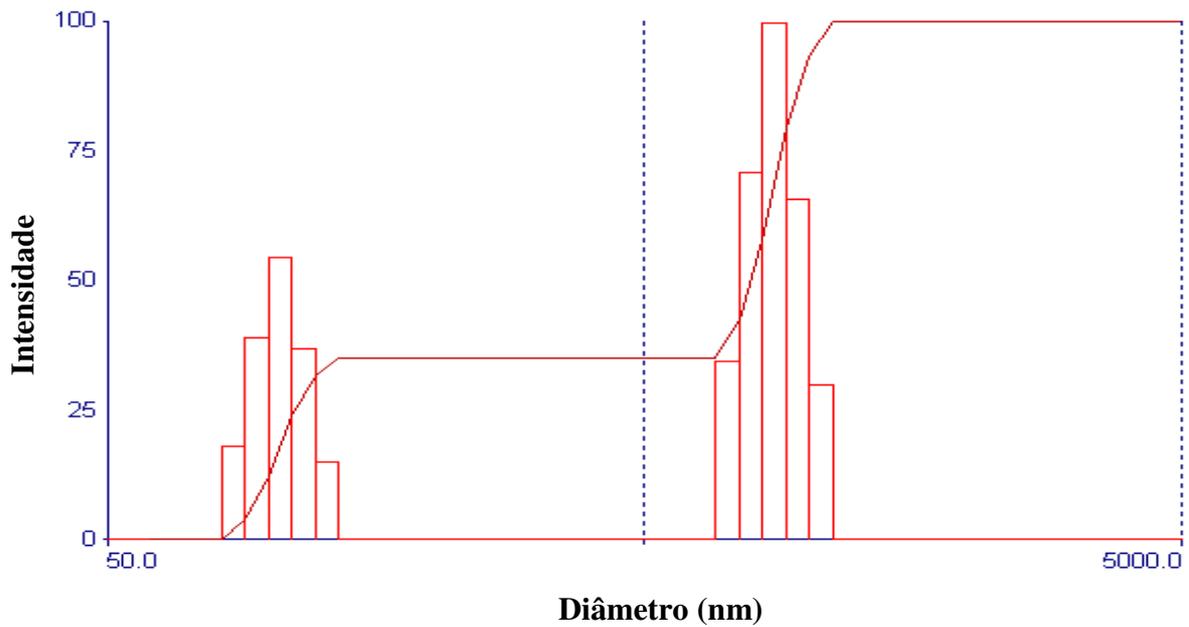


FIGURA 34: Distribuição do tamanho dos lipossomas MCO 72,00 mM – fração filtrada. MD = $600,8 \pm 10,5$.

O valor encontrado para o diâmetro médio das vesículas lipossomais demonstrou uma variação pela técnica de DL e de MO. As vesículas após serem filtradas, foram medidas por MO e apresentaram um diâmetro médio na faixa de 1000 nm, enquanto, as

medidas feitas por DL se apresentaram na faixa de 867,5 nm para a maior parte da população. Esta variação provavelmente ocorreu pela diferença do solvente utilizado em ambas as técnicas. Pois, na MO o diluente utilizado foi uma solução de etanol a 25% (v/v) e no DLS foi utilizada água ultra pura.

Segundo Betz e colaboradores (2005) foi demonstrado que o tamanho médio dos lipossomas diluídos com água ultra pura era aproximadamente duas vezes menor que o dos lipossomas diluídos com uma solução de etanol a 25 % (v/v). Segundo Henriques (2008) também foi demonstrado que o contato da solução etanólica com a amostra promove um aumento do tamanho das vesículas, e um inchamento, que pode levar a ruptura das mesmas. Este aumento de tamanho dos lipossomas pode ser explicado pela redução da tensão interfacial ocasionada pela presença do etanol.

Na MO o diâmetro das vesículas lipossomais foi avaliado com auxílio de um programa gerenciador de imagens acoplado ao MO, no qual foram realizadas medidas aleatórias dos tamanhos das vesículas. Dessa forma, as medidas foram realizadas somente no campo visualizado o que já gera uma resposta limitada sobre a população que está sendo analisada. Além disto, esta técnica mede com mais facilidade as vesículas maiores, já que as medidas são realizadas manualmente, o que acaba gerando uma resposta imprecisa em relação ao tamanho das vesículas.

Ambos os métodos utilizados, MO e DL, mostraram-se úteis. Entretanto, eles podem ser considerados complementares entre si. Pois, o DL caracteriza a suspensão lipossomal como um todo, permitindo avaliar se esta é homogênea ou não e se apresenta vesículas lipossomais na faixa de 1 a 5000 nm, enquanto que a MO permite visualizar e analisar a morfologia das vesículas.

6.3.3 Determinação da Quantidade de MCO Incorporado na Suspensão Lipossomal.

A quantidade de MCO incorporado na suspensão lipossomal foi realizada por espectrofotometria de UV, em triplicata, no $\lambda_{\text{máx}}$ do MCO (310 nm). As absorbâncias encontradas foram plotadas na curva padrão, preparada no momento do ensaio. A TABELA 10 mostra a concentração de MCO encontrada na suspensão lipossomal, e através da concentração foi possível calcular o rendimento das amostras.

O rendimento médio de MCO encontrado na suspensão lipossomal foi de 88,88%. Portanto, foi obtida a inclusão de 88,88% da massa inicial de MCO, que era 3,66 g, neste nanosistema. O alto rendimento de encapsulação do MCO no lipossoma demonstrou que o método de hidratação do filme lipídico é eficaz. Este método utilizado foi rápido e de fácil realização e apresentou boa reprodutibilidade.

Além disso, não foi observada nenhuma interferência neste método, já que os lipídios utilizados na preparação dos lipossomas são detectados na região de 203-205 nm do espectro de absorção (VEMURI & RHODES, 1995). Portanto, este método é adequado para análise quantitativa da suspensão lipossomal contendo MCO.

TABELA 10: Determinação da quantidade de filtro solar incorporado na suspensão lipossomal por espectrofotometria de ultravioleta.

Absorbância Encontrada	Concentração (mg/mL)	Rendimento (%)	Rendimento Médio
0,550 ± 0,03	5,66 ± 0,3	94,33 ± 4,9	
0,510 ± 0,03	5,25 ± 0,3	87,5 ± 4,9	88,88%
0,495 ± 0,03	5,09 ± 0,3	84,83 ± 4,9	

6.3.4 Análise de Fósforo nos Fosfolipídios (Lipoid 100%[®]) e no Lipossoma.

O método de Bartlett foi empregado com a finalidade de determinar a concentração de fosfolipídios presente na matéria prima Lipoid 100%[®] e no lipossoma. A cada análise foi realizada uma curva de calibração para o conteúdo de fósforo, já que o percentual de fosfolipídios presentes na amostra foi estabelecido através da curva de calibração construída.

Além disso, para o cálculo do teor de fosfolipídio é necessário utilizar a massa da matéria prima Lipoid 100%[®], pesada no preparo do lipossoma, e os valores de absorbância obtidos para cada amostra analisada. A curva de calibração de fósforo apresenta quatro pontos com as concentrações variando de 0,9988 µg/mL a 3,991 µg/mL (FIGURA 35). A absorbância de cada padrão foi determinada por espectroscopia de UV/VIS no λ de 800 nm.

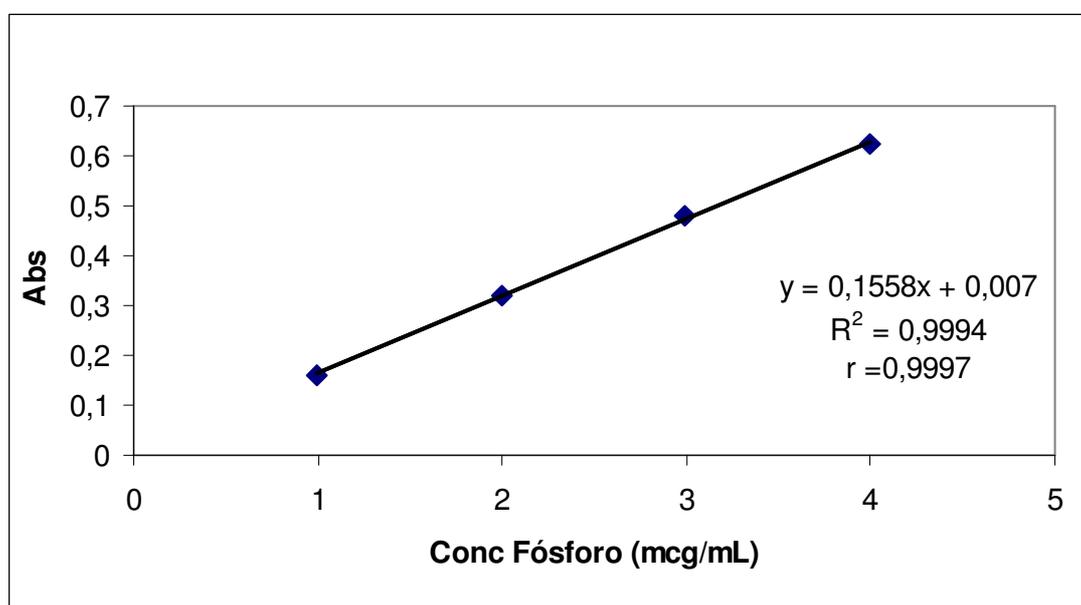


FIGURA 35: Representação de uma das curvas padrão de fósforo utilizada para a determinação do teor de fosfolipídios na fração lipossomal por espectroscopia de UV/VIS. $y = ax + b$; onde y = variável dependente (absorbância); x = variável independente (concentração µg/mL); a ou coeficiente angular da reta = 0,1558; b ou coeficiente linear da reta = 0,007; r ou coeficiente de correlação = 0,9997 e R^2 ou coeficiente de determinação = 0,9994.

A TABELA 11 mostra que o teor de fosfatidilcolina na matéria prima Lipoid 100% foi de 107,4%. Este alto teor indica a pureza desta matéria prima, conseqüentemente seu alto conteúdo de fosfolipídios.

Para a análise de fósforo do lipossoma foram retirados 100 µL de amostra os quais foram diluídos em balão volumétrico de 20,0 mL com etanol. Deste foi retirado uma alíquota de 1 mL para balão volumétrico de 20,0 mL. Esta solução final com uma concentração de 2,1 µg/mL de fósforo foi submetida à análise de fósforo. A absorvância média encontrada para o lipossoma foi de 0,178. A TABELA 11 mostra o teor de fósforo encontrado no lipossoma que foi de 60,40%.

Quando comparamos os resultados do teor de fósforo da matéria prima Lipoid 100%® com o teor de fósforo no lipossoma, constatamos uma perda do fosfolipídio, que indica uma perda do material de formação das lamelas dos lipossomas. Essa perda pode ser atribuída ao processo de filtração, no qual houve muita perda da fração lipossomal. Entretanto, mesmo com a perda significativa de fosfolípidos, ainda foi possível aprisionar uma quantidade significativa de MCO, como foi demonstrado na TABELA 10.

TABELA 11: Resultados obtidos na determinação da concentração de fosfolipídios na matéria-prima Lipoid 100%® e no Lipossoma.

	Teor de Fósforo (%) (n=3)
Lipoid 100%®	107,4 ± 1,54
Lipossoma	60,40 ± 3,57

6.4. Análise Quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

A CLAE é a técnica analítica de separação mais utilizada, devido a sua sensibilidade, a fácil adaptação para determinações quantitativas, sua adequação a separação de substâncias e acima de tudo, sua ampla aplicabilidade.

6.4.1 Condições Cromatográficas para Análise do MCO.

A metodologia seguiu os seguintes parâmetros cromatográficos:

1. Coluna cromatográfica: Hibar[®] LiChrosorb RP -18 de 5 μ e 25 cm;
2. Fase Móvel = Metanol: água (87: 13);
3. Fluxo = 1,0 mL/min;
4. Comprimento de onda de detecção (λ) = 310 nm;
5. Loop = 20 μ L;
6. Temperatura: ambiente (em torno de 25°C)
7. Tempo de retenção: 7,8 minutos.

6.4.2. Seletividade

A FIGURA 36 A e B mostra os cromatogramas obtidos no ensaio de seletividade. Este parâmetro foi determinado pela injeção da formulação gel creme base, ou seja, isenta de MCO, no cromatógrafo, com a finalidade de verificar a interferência dos excipientes no comprimento de onda máximo do MCO (310 nm). O cromatograma B da FIGURA 36 corresponde à injeção da formulação contendo MCO, no cromatógrafo. Este cromatograma foi demonstrado para um efeito comparativo.

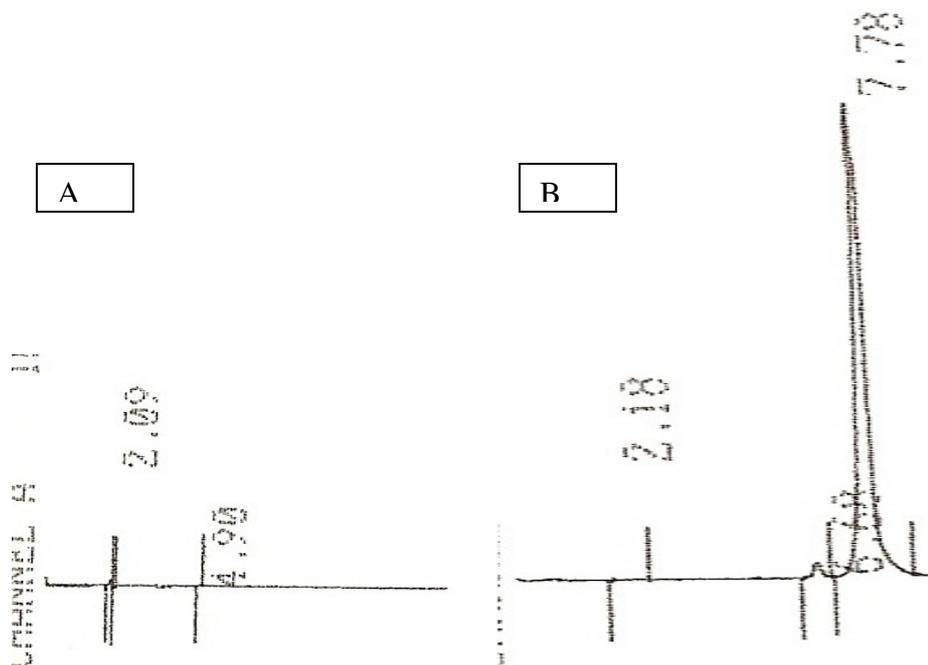


Figura 36 – (A): Cromatograma do branco na concentração de 10 µg/mL obtido por CLAE com λ de 310 nm. (B): Cromatograma da formulação contendo o filtro solar MCO livre na concentração de 10 µg/mL realizada nas mesmas condições cromatográficas.

Conforme observado na FIGURA 36 A e B, o método proposto é seletivo para a determinação do MCO na formulação gel creme desenvolvida. Pois não se observa a presença de picos interferentes na região de retenção correspondente ao MCO. Por se tratar de uma formulação com muitos excipientes, foi de grande importância à comprovação da seletividade.

6.4.3. Linearidade

De acordo com a ANVISA (2003), a linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos em um ensaio são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. A legislação preconiza que a determinação da linearidade seja realizada através da análise de cinco

concentrações diferentes, no mínimo, e que o coeficiente de correlação (r) mínimo aceitável deve ser de 0,99.

Portanto, a linearidade foi avaliada calculando-se os valores do intercepto (a), da inclinação (b) e coeficiente de correlação (r). A linearidade do método foi comprovada com a determinação de três curvas de calibração, em três dias diferentes, com injeção em triplicata, na faixa de concentração de 2,5 - 20,0 µg/mL para o MCO. A FIGURA 37 e a TABELA 12 demonstram os resultados de linearidade referentes às concentrações de trabalho escolhidas para o MCO.

A TABELA 12 mostrou que os coeficientes de correlação foram adequados. Uma vez que os coeficientes de correlação (r) obtidos para cada dia de trabalho foram superiores a 0,99, que é o recomendado pela legislação vigente (BRASIL, 2003). Portanto, o método demonstrou uma boa linearidade para a faixa de 2,5 a 20 µg/mL de MCO, confirmando uma baixa dispersão dos dados (RIBANI *et al.*, 2004).

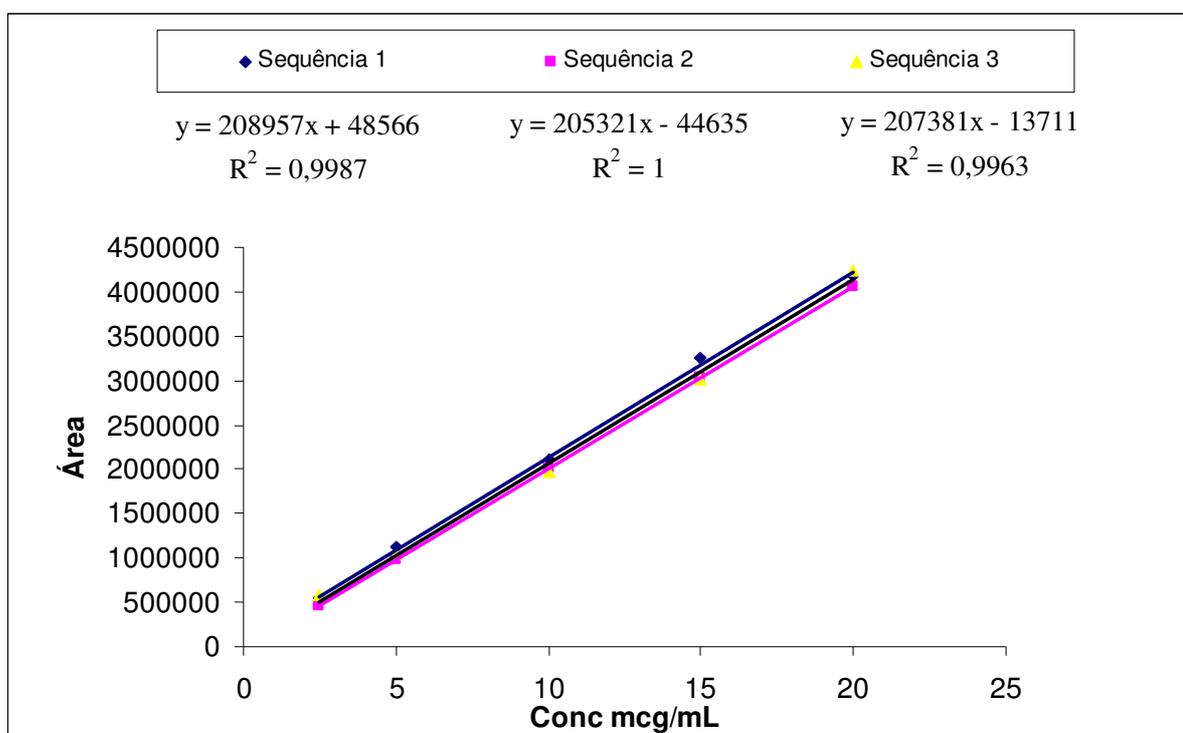


FIGURA 37: Representação das três curvas padrão obtidas na faixa de concentração de 2,5 a 20 µg/mL de MCO.

TABELA 12: Respostas obtidas para as três curvas padrão obtidas na faixa de concentração de 2,5 a 20 µg/mL de MCO.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Média ± dp
Inclinação	208957	205321	207381	207219 ± 1823
Intercepto	48566	-44635	-13711	- 3260 ± 47471,3
Coefficiente de determinação (R ²)	0,9987	1	0,9963	0,9983 ± 0,0018
Coefficiente de correlação (r)	0,999	0,9999	0,999	0,9995 ± 0,0003

6.4.4. Precisão Intra e Inter Dia.

A precisão de um método é definida como a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas e pode ser expressa como desvio padrão ou como desvio padrão relativo, de acordo com RE 899/2003 (ANVISA, 2003). De acordo com a TABELA 13, observou-se que todos os valores obtidos de DPR, para os cinco níveis de concentração da curva padrão, foram satisfatórios. Ou seja, apresentaram-se abaixo de 5%, o que é preconizado pela legislação vigente (ANVISA, 2003). Pode-se concluir que este método é preciso.

TABELA 13: Análise da precisão inter e intra dia nos cinco níveis de concentração de MCO.

Concentração (µg/ mL)	Dia	Área sob o pico	Área média sob o pico ± DP	Precisão intra-dia DPR (%)	Precisão inter-dia DPR (%)
2,5	1	531550	535839 ± 5878,60	1,10	3,30
		542540			
		533427			
	2	564103	567059,7 ± 8048,20	1,42	
560908					
576168					
5,0	1	1027814	1030770 ± 7417,74	0,72	2,22
		1039210			
		1025286			
	2	989848	990860 ± 1951,25	0,19	
993109					
989622					
10,0	1	2003272	2002215 ± 7930,97	0,40	0,49
		2009565			
		1993809			
	2	2003439	2012108 ± 10462,30	0,52	
2023729					
2009155					
15,0	1	3124418	2991902 ± 122194,10	4,1	2,79
		2967610			
		2883679			
	2	3072747	3033973 ± 37164,95	1,22	
2998659					
3030514					
20,0	1	4710263	4681947 ± 104885,30	2,24	4,48
		4769785			
		4565824			
	2	4277967	4326137 ± 123177,50	3,56	
4466120					
4234323					

6.4.5. Determinação da Concentração de MCO nas Formulações Desenvolvidas por CLAE.

As concentrações de MCO nas formulações desenvolvidas foram quantificadas por CLAE, utilizando os parâmetros cromatográficos já descritos anteriormente. Dessa forma, foi utilizada a mesma metodologia para quantificar o teor de MCO na formulação com o filtro livre e nas formulações com o MCO nos sistemas

nanoestruturados. Isto foi possível, pois a β -ciclodextrina e os lipídios utilizados na preparação dos lipossomas não interferem na leitura da amostra, que é realizada no $\lambda_{\text{máx}}$ do MCO que é de 310 nm.

O valor das áreas encontradas foi plotado na curva padrão realizado a cada dia de experimento e desse modo foi obtido o valor da concentração da amostra.

A TABELA 14 demonstra os resultados encontrados nas análises do teor de MCO nas formulações desenvolvidas. Sendo que o percentual de MCO encontrado em todas as formulações está de acordo com a especificação usual para o teor, a qual abrange a faixa de 90,0% a 100,0% da quantidade declarada de ativos.

TABELA 14: Concentrações de MCO nas formulações desenvolvidas obtidas por CLAE.

Formulação*	Concentração real de MCO nas formulações	Teor de MCO nas formulações
MCO livre	8,11 g	101,32 \pm 0,65
β -CD/MCO	7,88 g	98,45 \pm 1,02
Lipo / MCO	7,98 g	99,75 \pm 1,38
β -CD/MCO + Lipo/MCO	7,92 g	99,01 \pm 1,74

* Concentração teórica de MCO na formulação = 8 %

6.5. Eficácia das Formulações Anti-solares.

6.5.1. Determinação do FPS *in vitro*.

Na TABELA 15 estão apresentadas as absorvâncias e os valores de FPS calculados para as quatro formulações desenvolvidas. A formulação com MCO livre apresentou valor de FPS *in vitro* de 14,65 \pm 0,09; a formulação contendo o sistema nanoestruturado β -CD/MCO apresentou valor de FPS de 14,80 \pm 0,51; a formulação contendo o sistema Lipo/MCO apresentou valor de FPS de 15,05 \pm 0,53 e a formulação contendo ambos os sistemas β -CD/MCO e Lipo/MCO apresentou valor de FPS de

14,67 ± 0,26. Portanto, não existe diferença estatisticamente significativa para os valores de FPS *in vitro* entre as formulações anti-solares desenvolvidas (p = 0,600).

Este método não detectou diferença entre a formulação com MCO livre e as formulações contendo os sistemas. Este resultado pode estar relacionado com a impossibilidade do método em não avaliar a interação da formulação ou do sistema com a pele, determinando apenas o conteúdo total de MCO na formulação, já que as amostras são diluídas em etanol P.A, levando ao rompimento dos complexos formados.

A vantagem deste método *in vitro* é ser uma ferramenta útil, pois pode ser utilizado como um pré-teste para a determinação do FPS, no controle em processo durante a fabricação de formulações fotoprotetoras, sendo ainda um método fácil, de rápida execução, de baixo custo além de ter apresentado resultados com pequeno desvio padrão.

TABELA 15: Valores de absorbância e do FPS *in vitro* das formulações desenvolvidas: gel creme com MCO livre, gel creme com o sistema β-CD/MCO, gel creme com o sistema Lipo/MCO e gel creme com ambos os sistemas (média ± desvio padrão relativo).

λ	MCO livre	β-CD/MCO	Lipo/MCO	β-CD/MCO + Lipo/MCO
290	1,270 ± 0,007	1,283 ± 0,043	1,310 ± 0,047	1,279 ± 0,030
295	1,366 ± 0,008	1,381 ± 0,047	1,407 ± 0,050	1,375 ± 0,032
300	1,433 ± 0,009	1,477 ± 0,049	1,473 ± 0,050	1,441 ± 0,033
305	1,486 ± 0,009	1,503 ± 0,050	1,526 ± 0,054	1,495 ± 0,033
310	1,547 ± 0,007	1,565 ± 0,056	1,588 ± 0,056	1,555 ± 0,036
315	1,472 ± 0,009	1,489 ± 0,052	1,511 ± 0,054	1,414 ± 0,090
320	1,271 ± 0,007	1,286 ± 0,045	1,308 ± 0,047	1,279 ± 0,030
FPS	14,65 ± 0,09	14,80 ± 0,51	15,05 ± 0,53	14,67 ± 0,26

6.5.2 Determinação do FPS *in vivo* a Seco.

A determinação do FPS *in vivo* a seco das formulações demonstrou que existe diferença no valor de FPS entre a formulação com MCO livre e as formulações contendo os sistemas nanoestruturados. Isto se deve ao fato que na determinação do FPS *in vivo*, pode-se verificar a interação destes sistemas com a pele.

Os valores de FPS *in vivo* a seco das emulsões desenvolvidas estão apresentados na TABELA 16. A análise estatística dos dados demonstrou que os valores de FPS *in vivo* das preparações anti-solares desenvolvidas foram significativamente diferentes ($p < 0.001$).

A formulação com MCO livre apresentou FPS = $8,4 \pm 1,7$, a formulação contendo o sistema β -CD/MCO apresentou FPS = $8,5 \pm 1,5$, a formulação contendo o sistema Lipo/MCO apresentou FPS = $11,0 \pm 1,3$ e a formulação contendo ambos os sistemas de liberação apresentou FPS = $11,6 \pm 1,6$.

A análise estatística demonstrou que não há diferença estatisticamente significativa entre a formulação contendo ambos os sistemas nanoestruturados β -CD/MCO + Lipo/MCO e a formulação contendo o sistema nanoestruturado Lipo/MCO ($p > 0.05$). Também não existe diferença estatisticamente significativa entre a formulação com o MCO livre e a formulação contendo o sistema nanoestruturado β -CD/MCO ($p > 0.05$).

A TABELA 16 mostra que a formulação que contém ambos os sistemas nanoestruturados β -CD/MCO e Lipo/MCO e a formulação que contém Lipo/MCO apresentaram os maiores valores de FPS *in vivo* a seco. Os lipossomas são capazes de proteger a molécula do filtro solar da absorção sistêmica, da degradação metabólica e físico química; com isso, a molécula do filtro solar permanece intacta por um longo período de tempo na pele (GARCIA, 1998; SCALIA *et al.*, 2002). Além disto, existe

uma interação entre o lipossoma e o estrato córneo, promovendo um efeito reservatório do ativo nesta camada, conseqüentemente aumentando o FPS (EDWARDS & BAEUMNER, 2006).

TABELA 16: Valores de FPS *in vivo* das formulações desenvolvidas: gel creme com MCO livre, gel creme com o sistema β -CD/MCO, gel creme com o sistema Lipo/MCO e gel creme com ambos os sistemas.

Voluntário	MCO Livre	β -CD/MCO	Lipo/MCO	β -CD/MCO + Lipo/MCO
1	8,0	8,0	12,6	12,6
2	10,0	10,0	12,4	8,0
3	6,4	8,0	10,0	12,6
4	8,0	10,0	12,6	10,0
5	8,0	8,0	10,0	10,0
6	8,0	10,0	10,0	12,6
7	6,4	5,1	10,0	12,6
8	8,0	10,0	10,0	12,6
9	12,6	8,0	10,0	12,6
10	8,0	8,0	12,6	12,6
FPS	8,4 \pm 1,7	8,5 \pm 1,5	11,0 \pm 1,3	11,6 \pm 1,6

6.5.3 Determinação do FPS *in vivo* após Imersão em Água.

A determinação do FPS *in vivo* após a imersão em água possibilita demonstrar se existe ou não maior interação das formulações cosméticas com a pele, possibilitando assim avaliar uma possível resistência à água destas preparações.

A TABELA 17 demonstra todos os valores de FPS *in vivo* encontrados após a imersão em água, para todas as formulações desenvolvidas.

TABELA 17: Valores de FPS *in vivo* após a imersão em água das formulações desenvolvidas: gel creme com MCO livre, gel creme com o sistema β -CD/MCO, gel creme com o sistema Lipo/MCO e gel creme com ambos os sistemas.

Voluntários	MCO Livre	β -CD/MCO	Lipo/MCO	β -CD/MCO + Lipo/MCO
1	6,4	6,4	12,6	8,0
2	10,0	6,4	6,4	8,0
3	8,0	5,2	8,0	8,0
4	5,2	7,9	12,6	12,6
5	10,0	6,4	10,0	10,0
6	6,4	8,0	12,6	10,0
7	6,4	6,4	8,0	10,0
8	6,4	6,4	12,6	8,0
9	8,0	6,4	10,0	10,0
10	6,4	5,2	10,0	10,0
FPS	7,3 \pm 1,6	6,5 \pm 0,9	10,3 \pm 2,2	9,5 \pm 1,4

Os valores de FPS *in vivo* após a imersão em água demonstraram uma diferença estatisticamente significativa entre a formulação contendo ambos os sistemas nanoestruturados (β -CD/MCO e Lipo/MCO) e a formulação com MCO livre e contendo o sistema β -CD/MCO ($p < 0.05$). Também existe uma diferença estatisticamente significativa entre a formulação contendo o sistema nanoestruturado Lipo/MCO e a formulação com MCO livre e contendo o sistema β -CD/MCO ($p < 0.05$).

Porém, novamente não há uma diferença estatisticamente significativa entre a formulação contendo ambos os sistemas nanoestruturados (β -CD/MCO e Lipo/MCO) e a formulação contendo o sistema Lipo/MCO. Assim como, não existe diferença estatisticamente significativa entre a formulação com MCO livre e a formulação com o sistema β -CD/MCO ($p > 0.05$).

O sistema nanoestruturado β -CD/MCO não apresentou resistência à água, pois apresentou menor FPS *in vivo* após a imersão em água quando comparada com a

formulação contendo o MCO livre. A CD não aumentou a resistência à água da formulação, devido a sua propriedade em aumentar a solubilidade de ativos (SCALIA *et al.*, 2002; SCALIA *et al.*, 2006).

O valor do FPS *in vivo* a seco da formulação com o sistema nanoestruturado β -CD/MCO foi maior quando comparado com a formulação com MCO livre, sugerindo a possibilidade da estabilização da molécula de filtro solar ou sua menor metabolização. A vantagem de se utilizar o sistema nanoestruturado β -CD, é que este pode reduzir a capacidade do MCO de sofrer isomerização e se converter no seu isômero *cis*, que tem reduzida absorvidade no UV (SUMMERS & SUMMERS, 2005).

A formulação que possui ambos os sistemas nanoestruturado β -CD/MCO e Lipo/MCO apresentou um resultado relevante no teste do FPS *in vivo* a seco. Entretanto, esta formulação apresentou uma perda no valor do FPS *in vivo* após a imersão em água ($p < 0.05$). Esta perda pode ser atribuída ao fato da CD solubilizar seus inclusos. A combinação de ambos os sistemas pode ser utilizada em formulações onde não é necessária a resistência à água.

A FIGURA 38 demonstra que a inclusão do MCO em Lipo aumentou o FPS *in vivo* ($p < 0.05$) e demonstrou uma resistência à água ($p > 0.05$). A inclusão de MCO em β -CD não promoveu o aumento do FPS *in vivo* ($p > 0.05$) e não demonstrou resistência a água ($p < 0.05$). A formulação contendo o complexo Lipo/MCO demonstrou o melhor resultado no teste de FPS *in vivo* após a imersão em água, devido ao fato de possuir somente este complexo.

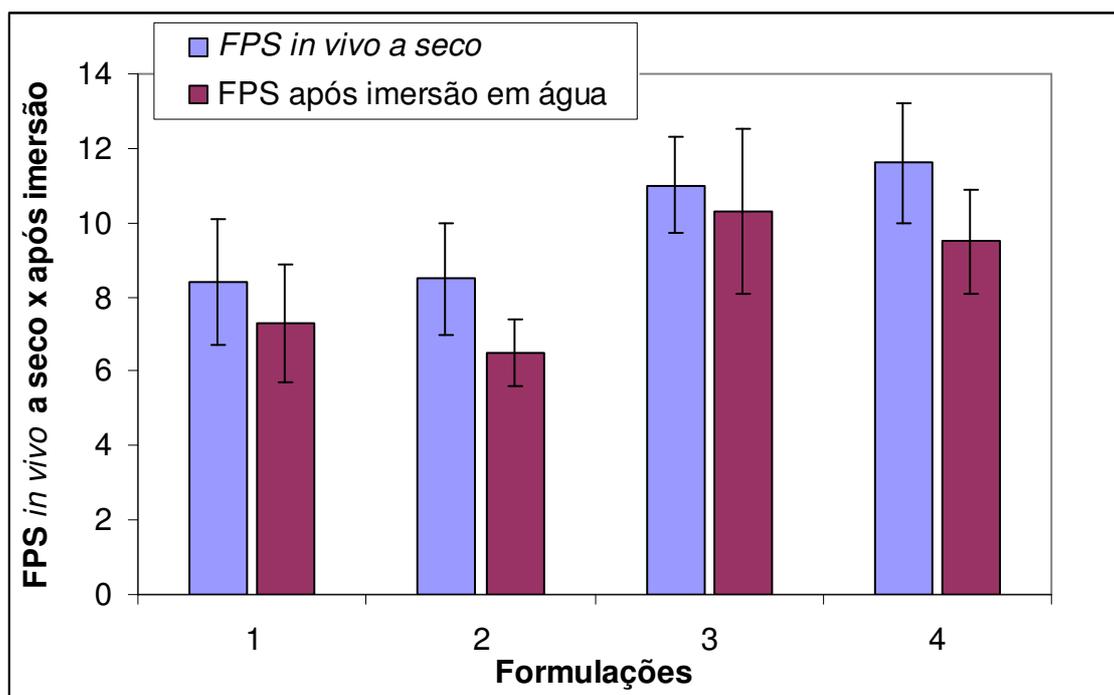


FIGURA 38: Valores de FPS *in vivo* a seco a após a imersão em água nas formulações desenvolvidas (média; n = 10). 1- formulação com MCO livre; 2 - formulação com β -CD/MCO; 3 - formulação com Lipo/MCO; 4 – formulação com β -CD/MCO + Lipo/MCO.

6.6. Segurança das Formulações Anti-Solares.

6.6.1. Estudo da Solubilidade do MCO e Escolha da Solução Receptora.

Na avaliação da liberação *in vitro* de produtos farmacêuticos contendo ativos com baixa solubilidade em água, geralmente são utilizadas soluções receptoras contendo surfactantes ou solventes orgânicos para aumentar sua solubilidade e garantir a manutenção da condição sink (BEMVINDO, 2006).

O FDA (1997) recomenda a utilização de tampão aquoso e misturas hidroalcolicas, como solução receptora no sistema de células bicompartimentais (CDER/U.S. FDA, 1997). De acordo com AAPS (2003) dependendo da solubilidade do ativo, o meio receptor pode conter surfactantes (FIP/AAPS, 2003).

A TABELA 18 demonstra os valores de solubilidade do MCO obtidos nas soluções receptoras testadas neste trabalho (solução tampão fosfato pH 7,4 com 30% de

etanol (v/v) e 2 % de polissorbato 80, solução tampão fosfato pH 7,4 e solução tampão fosfato pH 7,4 com 2, 4 e 5 % de polissorbato 80).

TABELA 18: Valores obtidos para a solubilidade do MCO nas soluções receptoras testadas.

Solução Receptora	Solubilidade determinada do MCO ($\mu\text{g/mL}$)
Solução tampão fosfato pH 7,4	37,2
Solução tampão fosfato pH 7,4 com 2 % de Tween [®] 80	111,8
Solução tampão fosfato pH 7,4 com 4 % de Tween [®] 80	215,0
Solução tampão fosfato pH 7,4 com 5 % de Tween [®] 80	271,0
Solução tampão fosfato com pH 7,4 com 30 % de etanol (v/v) e 2 % de Tween [®] 80	341,9

De acordo com a TABELA 18, o valor máximo de solubilidade do MCO foi encontrado na solução tampão fosfato pH 7,4, contendo 30% de etanol (v/v) e 2% de Tween[®] 80. Entretanto, esta solução não foi escolhida como solução receptora, pois o etanol pode interferir na análise da formulação gel creme contendo lipossomas. Henriques (2008) verificou que uma solução receptora contendo 25% de etanol (v/v) destruiu as vesículas lipossomais durante o experimento de liberação *in vitro*.

A solubilidade do MCO em solução tampão fosfato pH 7,4 foi de 37,2 $\mu\text{g/mL}$ (TABELA 18). Esta baixa solubilidade pode ser explicada pelo fato do ativo ser praticamente insolúvel em água. O filtro solar apresentou valores intermediários de solubilidade (111,8 $\mu\text{g/mL}$) no meio contendo baixa concentração de tensoativos, ou

seja, 2% de Tween[®] 80. Portanto, os maiores valores de solubilidade para o referido ativo foram alcançados nos meios contendo altas concentrações de tensoativos, 4 % e 5% de Tween[®] 80 (TABELA 18).

Desta forma, a solução receptora escolhida foi tampão fosfato pH 7,4 contendo 5% de Tween[®] 80, que proporcionou uma concentração de saturação de 271 µg/mL de MCO. A concentração no meio receptor não deve exceder 54,2 µg/mL (o que representa 1/5 de 271 µg/mL), para garantir a manutenção da condição *sink*. Uma vez que, 50 µg/mL de MCO correspondem à quantidade máxima deste ativo que poderá ser liberado do compartimento doador para o receptor, portanto admite-se que a condição *sink* foi obedecida, não ocasionando aumento apreciável da concentração de modo a ocasionar redução do fluxo de difusão do MCO do compartimento doador para o receptor

Esta solução receptora também foi empregada nos estudos de permeação/penetração *in vivo*, pois o uso de solventes, como por exemplo, o etanol, poderia interferir muito na integridade da pele suína, modificando as suas estruturas e conseqüentemente interferindo na passagem do ativo.

Os tensoativos têm a capacidade de diminuir a tensão interfacial entre o soluto e o solvente em que está contido, já que estes agentes contem grupos hidrofílicos e lipofílicos. O Tween[®] 80 é um tensoativo lipofílico, por isto foi empregado na solução receptora, com o objetivo de aumentar a solubilidade do MCO na solução tampão fosfato (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000). O MCO apresenta um caráter muito lipofílico, como pode ser verificado através do seu coeficiente de partição (log P) de 5,96 (GODWIN, KIM & FELTON, 2002), explicando sua afinidade pelas micelas de Tween[®] 80 formadas e conseqüentemente aumentando sua solubilidade nos meios que contêm o referido tensoativo.

6.6.2. Estudo de Liberação *in vitro*.

O modelo bicompartimental, conhecido como célula de difusão vertical tipo Franz e membrana sintética (acetato de celulose), têm sido empregado para realizar estudos de liberação *in vitro* de filtros solares em diferentes formulações (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2001; WISSING & MULLER, 2002; YENER, INCEGÜL & YENER, 2003; WANG, KASICHAYANULA & GU, 2006).

Na determinação da liberação *in vitro* do MCO, uma amostra de aproximadamente 400 µg de cada formulação desenvolvida (MCO livre, β-CD/MCO, Lipo/MCO e β-CD/MCO + Lipo/MCO) foi aplicada no compartimento doador e, por conseguinte, ocorreu a difusão deste ativo para a solução receptora.

Após um pequeno *lag time* inicial, observou-se um perfil linear com o tempo, permitindo o cálculo do fluxo no estado estacionário (J_{ss}) (TABELA 19). Os fluxos foram calculados para cada célula, por regressão linear, a partir do tempo 60 minutos, considerando-se que a partir deste ponto o equilíbrio já estaria alcançado.

TABELA 19: Fluxo no estado estacionário (J_{ss}) para cada uma das formulações estudadas.

Formulação	Fluxo (J_{ss}) durante 3 h ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)*
MCO livre	1,431 ± 0,536
β-CD/MCO	0,222 ± 0,043
Lipossoma/MCO	0,689 ± 0,185
β-CD/MCO + Lipossoma/MCO	0,796 ± 0,169

*Corresponde à média ± d.p de seis unidades de ensaio.

Os resultados plotados na FIGURA 39 e os resultados apresentados na TABELA 20 representam a média da concentração de MCO liberada em cada tempo ± d.p, de seis unidades de ensaio, para cada formulação desenvolvida.

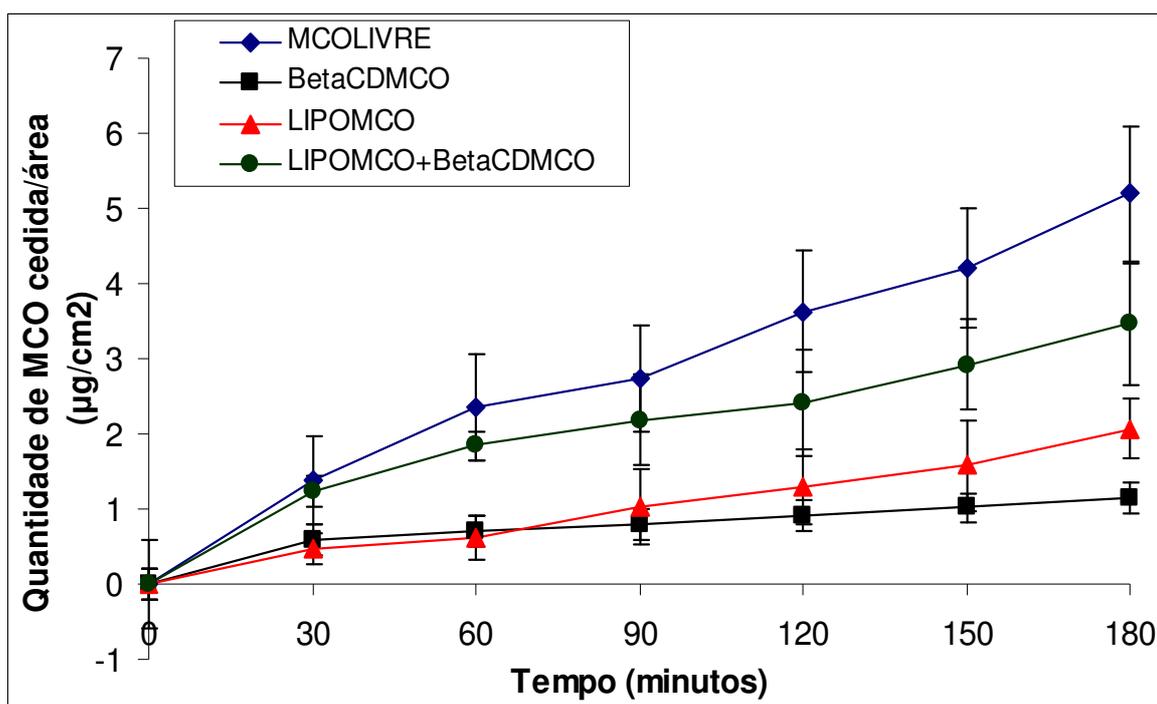


FIGURA 39: Perfil de liberação in vitro do MCO a partir das formulações desenvolvidas. Erro das barras indica média \pm desvio padrão.

TABELA 20: Quantidade média de MCO cedida de cada formulação em cada tempo \pm d.p (n = 6).

Tempo (min)	Quantidade cedida/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) \pm d.p			
	MCO livre	β -CD/MCO	Lipo/MCO	β -CD/MCO + Lipo/MCO
30	1,38 \pm 1,31	0,59 \pm 0,21	0,47 \pm 0,34	1,24 \pm 0,76
60	2,36 \pm 1,48	0,71 \pm 0,20	0,62 \pm 0,34	1,84 \pm 0,74
90	2,73 \pm 1,62	0,80 \pm 0,17	1,04 \pm 0,51	2,18 \pm 0,86
120	3,63 \pm 1,49	0,91 \pm 0,19	1,28 \pm 0,52	2,41 \pm 0,83
150	4,20 \pm 1,68	1,02 \pm 0,19	1,58 \pm 0,65	2,92 \pm 0,66
180	5,20 \pm 1,36	1,15 \pm 0,18	2,07 \pm 0,49	3,46 \pm 0,79

Os dados mostram que o gel creme contendo MCO livre apresentou maior fluxo $1,431 \pm 0,536 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, cedendo maior quantidade deste ativo para a solução receptora $5,20 \pm 1,36 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ em 180 minutos. A formulação apresentou um alto desvio padrão entre as seis células indicando uma variabilidade entre as réplicas do ensaio de liberação. Pelos valores de fluxos encontrados, existe uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre a formulação contendo o filtro livre e as formulações

contendo os sistemas nanoestruturados. Isto pode ser explicado pela característica lipofílica do ativo, que favoreceu sua liberação da base hidrofílica para o compartimento receptor.

O nanocosmético contendo β -CD/MCO apresentou o menor fluxo $0,222 \pm 0,0436 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, cedendo menor quantidade do ativo para a solução receptora $1,15 \pm 0,18 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ em 180 minutos. Pelos valores de fluxo encontrados existe uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre esta formulação e as demais formulações (MCO livre; Lipo/MCO e β -CD/MCO + Lipo/MCO). Além disto, apresentou um baixo desvio-padrão entre as seis células, indicando uma pequena variabilidade entre as réplicas do ensaio de liberação.

Provavelmente, a inclusão do MCO na cavidade da β -CD pode ter alterado a atividade termodinâmica do ativo. Isto pode ser explicado pela sua menor partição da formulação para a solução receptora, uma vez que a solubilidade e o coeficiente de partição do ativo podem ser modificados pela formação do sistema nanoestruturado, β -CD/MCO (AULTON, 2005; PUSKÁS & CSEMPESZ, 2007). Além disto, esta formulação contém aproximadamente 13,26 g do sistema, que aumentou visualmente a consistência deste nanocosmético em relação aos demais desenvolvidos. Provavelmente, a atividade termodinâmica do ativo e a consistência da formulação atuaram em conjunto para promover uma menor taxa de liberação do MCO.

A formulação contendo o Lipo/MCO apresentou fluxo de $0,689 \pm 0,185 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ e a quantidade do ativo cedida para a solução receptora foi de $2,07 \pm 0,49 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ em 180 minutos. Esta formulação também apresentou um baixo desvio-padrão entre as seis células, indicando uma pequena variabilidade entre as réplicas do ensaio de liberação. Os valores de fluxo demonstraram que existe uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre esta formulação e as formulações contendo o filtro livre e

o sistema β -CD/MCO e que não existe uma diferença estatisticamente significativa ($p>0,001$) para a formulação contendo o sistema β -CD/MCO + Lipo/MCO.

Provavelmente, o lipossoma alterou a atividade termodinâmica do ativo na formulação, pois o filtro livre possui afinidade pela bicamada fosfolípida do lipossoma, dificultando assim, sua partição da formulação para a solução receptora (LEONARDI & CHORILLI, 2006).

A formulação contendo os sistemas nanoestruturados β -CD/MCO + Lipo/MCO apresentou fluxo de $0,796 \pm 0,169 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ e a quantidade do ativo cedida para a solução receptora foi de $3,46 \pm 0,79 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, em 180 minutos. Os valores de fluxo demonstraram que existe uma diferença estatisticamente significativa ($p<0.001$) entre esta formulação e as formulações contendo o filtro livre e o sistema β -CD/MCO e não existe uma diferença estatisticamente significativa ($p>0,001$) para a formulação que contém o sistema Lipo/MCO.

A inclusão do ativo em ambos os sistemas nanoestruturados β -CD e lipossomas em uma mesma formulação também alterou sua atividade termodinâmica, este fato pode ser evidenciado através da menor quantidade de MCO cedido para o compartimento doador. A β -CD pode ter interagido com os componentes lipídicos das membranas dos lipossomas quando presentes em uma dispersão aquosa, causando danos e desestabilização da bicamada fosfolípida dos lipossomas, permitindo a liberação completa ou parcial do ativo a partir das vesículas (PUSKÁS & CSEMPESZ, 2007).

6.6.3. Estudo de Permeação/Penetração *in vitro* Utilizando a Pele Suína.

A pele de orelha de suínos tem sido empregada nos estudos de permeação/penetração *in vitro* de produtos dermatológicos e cosméticos, devido a sua similaridade com a pele humana (MEYER & ZSCHEMISC, 2002).

6.6.3.1. Desenvolvimento e Validação do Método Para a Extração e Quantificação de MCO na Epiderme e Derme Suína.

A avaliação da recuperação da quantidade de MCO adicionado a segmentos cutâneos (epiderme e derme suína) foi realizada por meio da comparação das respostas obtidas nas amostras e nas *spiked solutions* correspondentes a cada nível de massa do ativo total adicionado.

Os resultados obtidos na validação para o procedimento de extração do filtro solar da epiderme e derme estão descritos na TABELA 21.

TABELA 21: Recuperação média de MCO na epiderme e derme para três níveis de concentração e seus d.p (n = 3).

Quantidade adicionada de MCO (µg)	Recuperação ± d.p			
	Epiderme (µg)	Epiderme %	Derme (µg)	Derme %
1,6	1,50 ± 0,22	93,94 ± 13,49	1,34 ± 0,35	83,88 ± 11,74
3,2	2,42 ± 0,94	75,93 ± 9,70	2,34 ± 0,86	73,26 ± 6,85
6,4	5,38 ± 0,05	84,06 ± 0,91	5,37 ± 0,42	83,86 ± 6,56

As taxas de recuperação foram satisfatórias e os desvios padrão nos três experimentos realizados para cada nível de concentração foi considerado aceitável para o método bioanalítico (< 15 %, SHAH *et al.*, 1992; ANVISA, 2003), caracterizando, assim, a sua precisão.

Os resultados referentes às curvas padrão (inter e intra dia) estão demonstrados na FIGURA 40. A média do coeficiente de correlação (r) encontrado foi de $0,999 \pm 0,0004$ para n = 3, indicando que a resposta de CLAE foi linear para as condições de análise dentro da faixa de concentração (0,1 e 20,0 µg/mL).

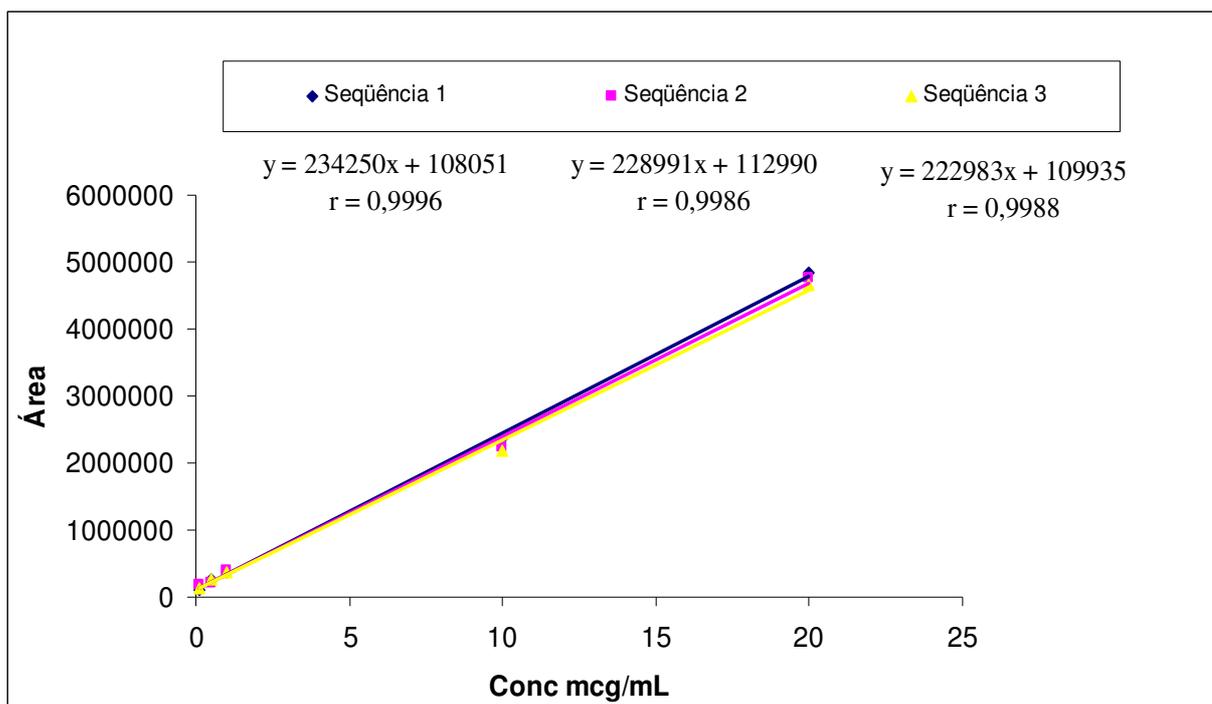


FIGURA 40: Curvas padrão de MCO 0,1 a 20,0 µg/mL.

A FIGURA 41 apresenta os cromatogramas obtidos das amostras extraídas da epiderme e derme. As setas indicam a ausência de interferentes no tempo de retenção do ativo (em torno de 8,45 minutos). Portanto, pode-se observar que existe uma boa resolução entre o sinal do MCO e dos interferentes.

O método desenvolvido para a extração do MCO nas camadas da pele suína, utilizando fase móvel metanol: água (87:13) como solução extratora, agitação em vortex, mostrou-se exato, preciso e seletivo, sendo adequado para o estudo de penetração/permeação cutânea.

Além disso, Santis (2008) realizou a análise histológica da separação dos segmentos cutâneos por microscopia óptica, validando a técnica para a separação da epiderme da derme com auxílio do bisturi.

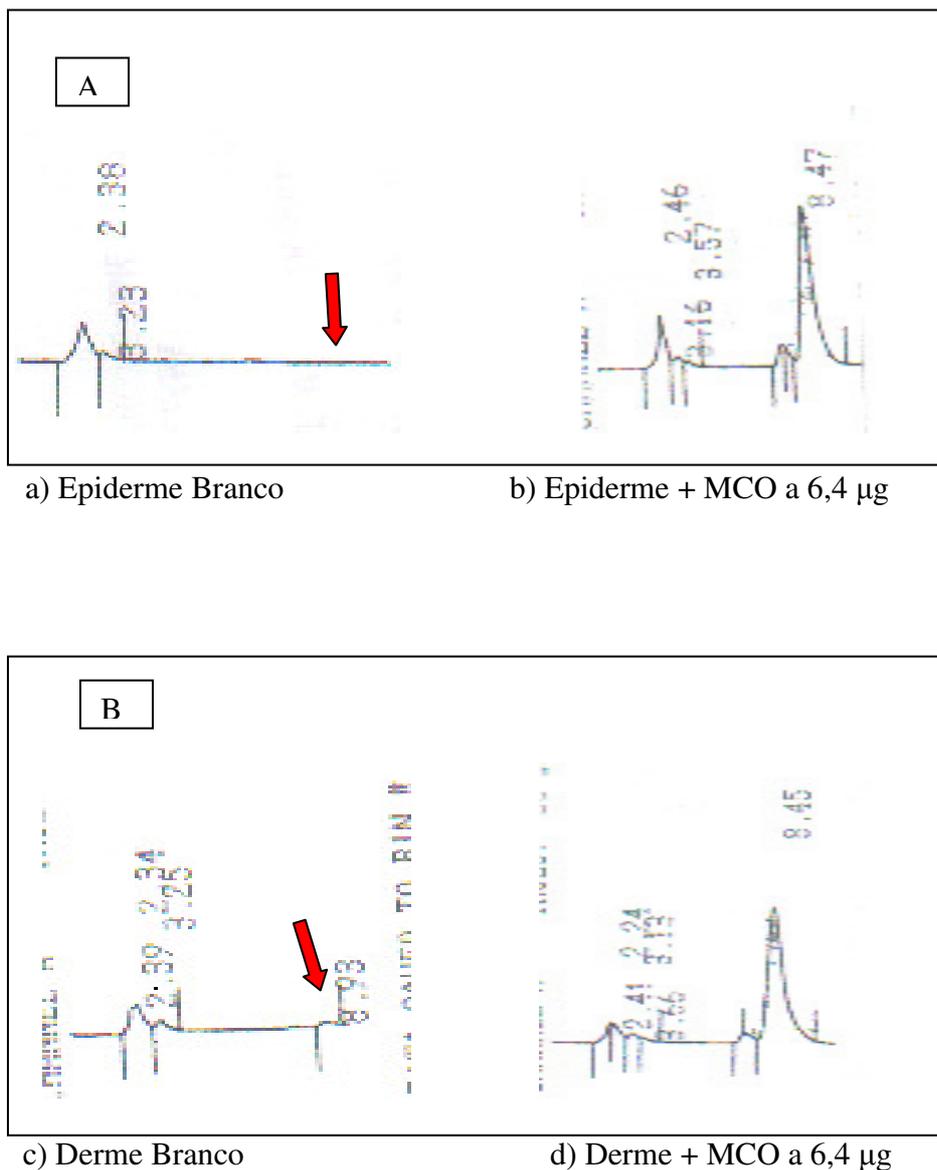


FIGURA 41: Cromatogramas obtidos na extração de MCO da pele suína empregando solvente metanol: água (87:13), para a avaliação da especificidade do método. a) Branco epiderme, b) Epiderme + MCO a 6,4 µg, c) Derme branco, d) Derme + MCO a 6,4 µg. Tempo de retenção 8,45 min.

6.6.3.2. Resultados da Penetração de MCO na epiderme e derme suínas.

A presença de MCO nos estratos cutâneos foi quantificada após a realização do procedimento descrito no item 5.10.4.

As TABELAS 22 e 23 apresentam as massas absolutas do ativo extraído da epiderme e derme suína, respectivamente, após 6 horas de experimento, em que a formulação permaneceu em contato com a pele (área de 1,96 cm²).

TABELA 22: Massa de MCO obtida na epiderme suína em uma área de 1,96 cm², após 6 horas de contato com a formulação.

Quantidade de MCO na Epiderme (µg)				
n	MCO livre	β-CD/MCO	Lipo/MCO	β-CD/MCO + Lipo/MCO
1	8,73	15,92	19,73	13,77
2	11,38	10,88	18,11	16,31
3	9,35	9,30	18,81	11,78
4	18,36	8,40	16,96	16,99
Média	11,95	11,13	18,04	14,71
Desvio Padrão (d.p)	4,41	3,36	1,17	2,39

TABELA 23: Massa de MCO obtida na derme suína em uma área de 1,96 cm², após 6 horas de contato com a formulação.

Quantidade de MCO na Derme (µg)				
n	MCO livre	β-CD/MCO	Lipo/MCO	β-CD/MCO + Lipo/MCO
1	13,03	16,77	8,50	12,50
2	9,97	13,63	12,96	17,73
3	10,21	17,01	7,97	12,06
4	16,34	9,31	8,28	18,75
Média	12,38	14,18	9,40	15,26
Desvio Padrão (d.p)	2,98	3,59	2,36	3,47

A figura 42 mostra a representação gráfica dos resultados apresentados nas tabelas 22 e 23.

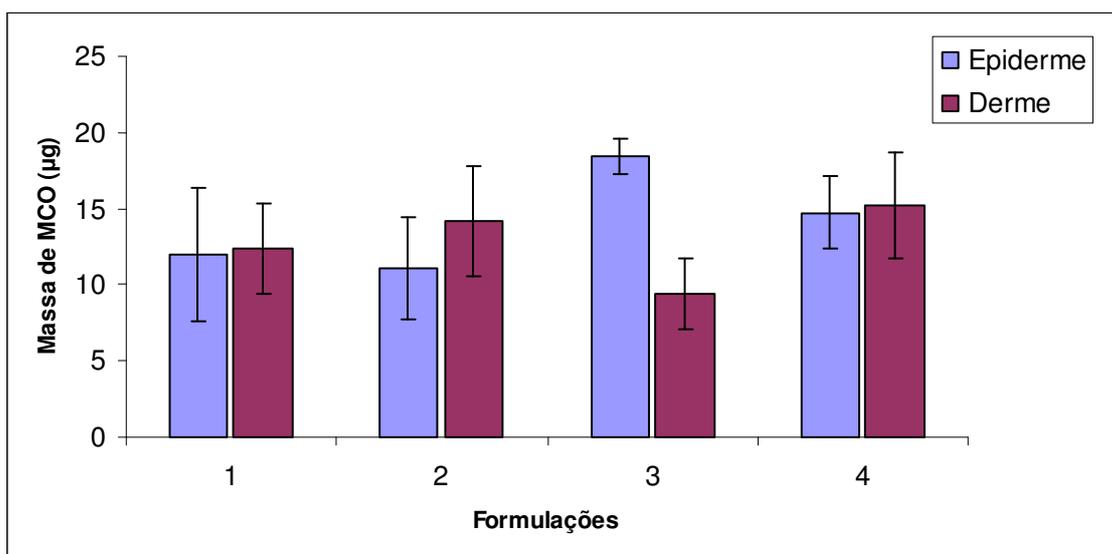


FIGURA 42: Massas absolutas de MCO extraída da epiderme e derme após 6 horas de contato das formulações com a pele, em uma área de 1,96 cm². 1- formulação com MCO livre; 2 - formulação com β-CD/MCO; 3 - formulação com Lipo/MCO; 4 – formulação com β-CD/MCO + Lipo/MCO.

A análise estatística demonstrou que não existe diferença estatisticamente significativa no perfil de penetração cutânea na epiderme e derme para as formulações 1, 2 e 4 a nível de significância de 5% ($p > 0,05$). Entretanto, existe uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,037$) para a quantidade de MCO retido na epiderme e na derme suína para a formulação 3 (gel creme contendo Lipo/MCO).

A massa média de MCO encontrada na epiderme e derme suína, referente à formulação contendo MCO livre, foi de $11,95 \pm 4,41 \mu\text{g}$ e $12,38 \pm 2,98 \mu\text{g}$, respectivamente. A quantidade do ativo retida na epiderme pode ser atribuída à sua alta afinidade pelo EC e epiderme viável, devido à sua natureza altamente lipofílica. Esta propriedade é particularmente importante para os filtros solares, uma vez que, a quantidade do ativo no EC pode ser diretamente relacionada com o FPS (GODWIN, 2002).

A massa média de MCO encontrada na epiderme e derme suína, referente à formulação contendo β-CD/MCO, foi de $11,13 \pm 3,36 \mu\text{g}$ e $14,18 \pm 3,59 \mu\text{g}$,

respectivamente. A maior concentração do ativo na derme pode ser atribuída ao comportamento da CD em promover modificações nas propriedades do EC, alterando sua resistência natural, retendo ou liberando a substância ativa para a pele. Além disto, o MCO incluso pode ser liberado pela sua substituição por outras moléculas com dimensões adaptáveis a cavidade das CDs, como, os lipídios, fosfolipídeos e colesterol, presentes na estrutura da pele (LEGENDRE *et al.*, 1995; BENTLEY *et al.*, 1997; IRIE & UEKAMA, 1997; LOFTSSON & MASSON, 2001).

A massa média de MCO encontrada na epiderme e derme suína referente à formulação contendo o Lipo/MCO apresenta uma diferença estatisticamente significativa ($18,04 \pm 1,17 \mu\text{g}$ e $9,4 \pm 2,36 \mu\text{g}$, respectivamente, $p=0,037$). Este sistema nanoestruturado promoveu maior retenção do MCO na epiderme, isto pode ser atribuído ao fato destes lipossomas serem constituídos por uma alta concentração de fosfatidilcolina que favoreceu a deposição do referido sistema no EC, resultando em um efeito reservatório do ativo (LEONARDI & CHORILLI, 2008).

A massa média de MCO encontrada na epiderme e derme suína referente à formulação contendo ambos os sistemas nanoestruturados (Lipo/MCO e β -CD/MCO) não apresentam diferença estatisticamente significativa ($14,71 \pm 2,39 \mu\text{g}$ e $15,26 \pm 3,47 \mu\text{g}$, respectivamente ($p>0,05$). Este resultado demonstra o comportamento individual de cada sistema, ou seja, a atuação como promotor de permação da β -CD e o efeito de reservatório do lipossoma, como explicado anteriormente.

A formulação contendo ambos os sistemas nanoestruturados mostrou-se eficaz frente à radiação ultravioleta, pois apresentou maior valor de FPS, *in vivo*, a seco quando comparado com as demais formulações. Entretanto, não apresentou o mesmo desempenho na avaliação de FPS *in vivo* após imersão em água, ocorrendo uma perda

no valor da referida medida. Portanto, a combinação de ambos os sistemas pode ser utilizada em produtos onde não é necessária a resistência à água.

A formulação contendo o sistema nanoestruturado Lipo/MCO apresentou um expressivo resultado na avaliação da penetração *in vitro*, evidenciando o efeito reservatório de MCO no EC. Esta retenção proporcionou relevantes valores de FPS *in vivo* tanto a seco quanto após imersão em água, garantindo assim, maior ação fotoprotetora do referido nanocosmético.

7. Conclusão.

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, foi possível concluir que:

- A matéria-prima MCO foi adequada como padrão de trabalho, após sua caracterização por espectroscopia de ultravioleta e infravermelho, apresentando especificações de acordo com a literatura.
- O método de *kneading* ou “empastagem” mostrou-se bastante adequado para a preparação do sistema nanoestruturado β -CD/MCO. Este fato foi evidenciado através da caracterização deste sistema nanoestruturado por: difração de raio X, espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e espectroscopia de infravermelho. Estas metodologias comprovaram a inclusão do MCO na cavidade da CD. A quantidade de MCO incluída no sistema, foi determinada por espectroscopia de ultravioleta e apresentou um rendimento de 89%, o qual foi bastante satisfatório.
- O método de hidratação do filme lipídico foi adequado para a preparação do sistema nanoestruturado Lipo/MCO. Este método demonstrou uma proporção adequada entre a quantidade de MCO incorporado e os fosfolípidios. Ambos os métodos, MO e DL, mostraram-se úteis e complementares entre si para a análise das vesículas nas preparações lipossomais. A visualização por MO permitiu a confirmação da formação das vesículas. Os diâmetros encontrados por DL demonstraram que os lipossomas obtidos estavam dentro da faixa pretendida (em torno de 800 nm).
- O resultado do FPS *in vitro* pelo método de Mansur demonstrou que não existe diferença estatisticamente significativa entre a formulação com MCO livre e as formulações contendo os sistemas nanoestruturados ($p = 0,600$). Este fato pode

ser atribuído à incapacidade deste método de avaliar a interação destes sistemas nanoestruturados com a pele.

- O resultado do FPS *in vivo* a seco mostrou que existe diferença estatisticamente significativa entre as formulações contendo o sistema nanoestruturado Lipo/MCO, a formulação com MCO livre e com o sistema β -CD/MCO. As formulações contendo o sistema Lipossoma/MCO apresentaram os maiores valores de FPS *in vivo*, confirmando a possibilidade do lipossoma exercer um efeito reservatório no EC.
- O resultado do FPS *in vivo* após imersão em água demonstrou que a formulação com o sistema nanoestruturado β -CD/MCO, não apresentou resistência à água; ou seja, houve uma perda no seu FPS. Este resultado evidenciou que a CD é capaz de aumentar a solubilidade em água do seu incluso. A formulação que apresentou o melhor desempenho, ou seja, a menor perda de FPS, foi a que continha somente o sistema nanoestruturado Lipo/MCO.
- A formulação contendo o sistema nanoestruturado β -CD/MCO foi a que apresentou menor fluxo e cedeu a menor quantidade de MCO para a solução receptora, no estudo de liberação *in vitro*. Entretanto, a formulação contendo o sistema Lipo/MCO também apresentou um fluxo baixo de MCO. Neste estudo, foi constatado que provavelmente os sistemas nanoestruturados alteraram a atividade termodinâmica do MCO, reduzindo a quantidade de MCO cedida para a solução receptora.
- O estudo de penetração *in vitro* comprovou o efeito reservatório que o lipossoma é capaz de fazer com o EC. Portanto, a formulação contendo o sistema nanoestruturado Lipo/MCO produziu acúmulo de MCO na epiderme.

- Os resultados dos testes de FPS *in vivo* a seco e, após imersão em água, confirmam que o acúmulo de MCO na epiderme, ou seja, sua maior retenção na epiderme foi capaz de aumentar sua propriedade fotoprotetora. Portanto, a formulação que obteve o melhor desempenho em todos os testes realizados foi o nanocosmético contendo o sistema nanoestruturado Lipo/MCO.

8. Referências Bibliográficas.

- ALBERTI, I.; KALIA, Y.N.; NAIK, A.; BONNY, J.D.; GUY, R.H. Effect of ethanol and isopropyl myristate on the availability of topical terbinafine in human stratum corneum *in vivo*. Int J of Pharm, Amsterdam, v.219, p.11-19, 2001b.
- ALVAREZ- ROMÁN, R.; BARRÉ, G.; GUY, R.H.; FESSI, H. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. Eur J of Pharm and Biopharm, v.52, p. 191-195, 2001.
- ANDEGA, S.; KANIKKANNAN, N.; SINGH, M. Comparison of the effect of fatty alcohols on the permeation of melatonin between porcine and human skin. J of Controlled Release, Amsterdam, v.77, p.17-25, 2001.
- ANGELOVA, A.; RINGARD-LEFEBVRE, C.; BASZKIN, A. Drug-cyclodextrin association constants determined by surface tension and surface pressure measurements. II. Sequestration of water insoluble drugs from air-water interface: retinol- β -cyclodextrin system. J. of Coll Interfacial Sci, n.212, p. 280-285, 1999.
- ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V.J.R. Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. São Paulo: Premier Editorial, p.397-400, 2000.
- AULTON, M.E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- AZULAY, R.D.; AZULAY, D.R. Dermatologia, 2ª edição revisada e atualizada 1999.
- BARGHAM, A.D. Physical structure and behaviour of lipids and lipid enzymes. Adv. Lipid Res, v. 1, p. 65-104, 1963.
- BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. Eur. J. of Pharm Sci, n. 14, p.101-114, 2001.
- BARTH, A.L. Fator de proteção solar versus coeficiente de carga de filtros solares químicos: avaliação fotobiológica de uma mistura de filtros solares químicos. 2000. 90f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.
- BARTLETT, G.R. Phosphorus assay in column chromatography. J of Biological Chemistry, v.234, p.466-468, 1959.
- BEMVINDO, C.S. Estudo Comparativo da Liberação e Penetração Cutânea de Nitrato de Miconazol de Emulsões Tópicas Comerciais. 2006. 110 f. Dissertação

de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

- BENTLEY, M.V.; VIANNA, R.F.; WILSON, F.; COLLETT, J. Characterization of the influence of some cyclodextrin on the stratum corneum from hairless mouse. J. Pharm and Pharmacol., London, v.49, p.397-402, 1997.
- BENTLEY, M. V.; LOPEZ, R. F. Curso de permeação cutânea in vitro II. Ribeirão Preto: 2002. Apostila.
- BETZ, G. *et al.* *In vivo* comparison of various liposome formulations for cosmetic application. Int. J. Pharm. V. 296, p. 44-54, 2005.
- BHATIA, K. S.; GAO, S.; SINGH, J. Effect of penetration enhancers and iontophoresis in the FT-IR spectroscopy and LHRH permeability through porcine skin. J of Controlled Release Amsterdam, v.47, p. 81-89, 1997.
- BLANCO, M.D.; BERNARDO, M.V.; TEIJÓN, C.; SASTRE, R.L.; TEIJÓN, J.M. Transdermal application of bupivacaine-loaded poly(acrylamide(A)-co-monomethyl itaconate) hydrogels. Int. J. Pharm., v.255, p.99-107, 2003.
- BORSADIA, S. *et al.* Factors to be considered in the evaluation of bioavailability and bioequivalence of topical formulations. Skin Pharmacol., Basel, v.5, p.129-145, 1992.
- BOUWSTRA, J.A. *et al.* The role of ceramide composition in the lipid organisation of the skin barrier. Biochim et Biophys Acta-Biomembranes, v.1419, n.2, p.127-136, 1999.
- BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P.L. Skin structure and mode of action of vesicles. Advanced drug deliv rev, v.54, Suppl. 1, p. S41-S55, 2002.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 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 jun. 2003. Disponível em: <http://www.e-legis.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20 de out. 2006.
- _____ . Resolução RDC nº 47, de 16 de março de 2006. Lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 17 mar. 2006. Disponível em: <http://www.e-legis.anvisa.gov.br>. Acesso em: 10 de fev. 2007.
- BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. Adv. Drug. Deliv Rev, v. 59, p. 645-666, 2007.
- BRITISH PHARMACOPEIA (BP, Farmacopéia Britânica). V. 2, p. 109, 1998.

- BUDAL, R. M. Estudos de formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas. 2003. 197 f. Tese de doutorado em Química – Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- CAMERON, K. S.; FIELDING, L. NMR diffusion spectroscopy as a measure of host-guest complex association constants and as a probe of complex size. J of Organic Chem., v. 66, n. 21, p. 6891-6895, 2001.
- CAO, F.; GUO, J.; PING, Q. The physicochemical characteristics of freeze - dried scutellarin-cyclodextrin tetracomponent complexes. Drug delivery Ind Pharma, v. 31, n. 8, p. 747-756, 2005.
- CHAN, L.W.; KURUP, T. R. R.; MUTHAIAH, A.; THENMOZHIAL, J. C. Interaction of *p*-hydroxybenzoic esters with beta-cyclodextrin. Int. J. Pharm, v. 195, p. 71-79, 2000.
- CHATTARAJ, S.C. *et al.* A simple diffusion cell to monitor drug release from semi-solid dosage forms. Int J of Pharm, n. 120, p.119-124, 1995.
- COELHO, *et al.* Preparation and Evaluation of inclusion Complexes of commercial sunscreens in cyclodextrins and Montmorillonites: Performance and Substantivity Studies. Drug Development and Industrial Pharmacy. v. 34, n. 5, p. 536-546, 2008.
- COLIPA- The European Cosmetic, Toiletry and perfumary Association – International Sun Protection Factor (SPF) Test Method- www.colipa.com, 2006.
- CUNHA-FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2007.
- DAMIANI, E.; ROSATI, L.; CASTAGNA, R.; CARLONI, P.; GRECI, L. Changes in ultraviolet absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation. J. of Photochem and Photobiol B: Biology, v. 82, p. 204-213, 2006.
- DANGELO, J.G.; FANTINI, C.A. Anatomia humana sistêmica e segmentar. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- DAVIS, S.S.; KHANDERIA, M.S. Viscoelastic properties of pharmaceutical semisolids: characterization of the plastibases for bioavailability studies. J. Pharm. Pharmacol, v. 24, p. 176-180, 1972.
- DIEMBECK, W. *et al.* Test Guidelines for *In vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Food and Chemical Toxicol, n. 37, p.191-205, 1999.

- DIFFEY, B. L. Indices of protection from *in vitro* assay of sunscreens. In: LOWE, N.J.; SHAATH, M.A.; PATHAK, M.A. Sunscreens Development, Evaluation, and Regulatory Aspects. New York: Marcel Dekker, p. 589-600, 1997.
- DIFFEY, B. L. Human exposure to solar ultraviolet radiation. J. Cosmet. Dermatol., v.1, p.124-130, 2002.
- DUCHÊNE, D.; WOUESSIDJEWE, D. Pharmaceutical uses of cyclodextrins and derivatives. Drug Dev. Ind. Pharm., v. 16, p. 2487–2499. 1990.
- DUCHENE, D.; WOUESSIDJEWE, D. New possibilities for the pharmaceutical uses of cyclodextrins and their derivatives. Chimica Oggi, v.1, n.2, p. 17-24, 1993.
- DUCHENE, D.; WOUESSIDJEWE, D.; POELMAN, M. C. Les cyclodextrines dans les préparations pour usage dermatique. In: Seiller, M., Martini, M. C. (Eds), Formes Pharmaceutiques pour Applications Locales. Lavoisier Tec Doc, Paris, pp. 480-499, 1996.
- DUCHENE, D.; BOCHOT, A.; YU, S. C.; PEPIN, C.; SEILLER, M. Cyclodextrines and emulsions. Int. J. Pharmac. 266, 85-90, 2003.
- EDWARDS, K.A.; BAEUMNER, A.J. Analysis of liposomes. Talanta. V.68, p.1432-1441, 2006.
- ELSAYED, M. M. A.; ABDALLAH, O. Y.; NAGGAR, V. F.; KHALAFALLAH, N. M. Lipids vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. Int. J. of Pharm, v. 332, p. 1-16, 2007.
- ESPOSITO, E.; DRECHSLER, M.; MARIANI, P.; SIVIERI, E.; BOZZINI, R.; MONTESI, L.; MENEGATTI, E.; CORTESI, R. Nanosystems for skin hydration: a comparative study. Int J of Cosmetic Sci, v.29, p.39-47, 2007.
- F.D.A. United States of America Department of Health and Human Services. In: Guidance Documents, Guidance for Industry: SUPAC-SS Nonsterile Semisolid Dosage Forms. Scale-up and Postapproval Changes: Chemistry, manufacturing, and controls; In vitro Release Testing and In vivo Bioequivalence Documentation, 1997. Disponível em: <http://www.fda.gov>.
- FERREIRA, A.O.; BRANDÃO, M. F.; SILVA, M. A. D. C. G. Guia prático de farmácia magistral. Juiz de Fora, MG: Ed. Ortofarma, p. 356, 2002.
- FERRY, L.L.; ARGENTIERI, G.; LOCHNER, D.H. The comparative histology of porcine and guinea pig skin with respect to iontophoretic drug delivery. Pharm.Acta Helv., Amsterdam, v.70, p.43-56, 1995.
- FIELDING, L. Determination of Association Constant (K_a) from solution NMR Data. Tetrahedron, v. 56, p. 6151-6170, 2000.

- FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores Solares. Química Nova. V. 30, n. 1, p. 153-158, 2007.
- FRANZ, T.J. Percutaneous absorption. On the relevance of *in vitro* data. Invest. Dermatol, v. 64, p. 190-195, 1975.
- FREITAS, Z.M.F. Síntese e avaliação das propriedades fotoprotetoras de ésteres glicéricos do ácido p-metoxicinâmico. 1997, 159 p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1997.
- FREITAS, Z. M. F.; GONÇALVES, J. C. S.; SANTOS, E. P.; VERGANINI, A. Glyceridic esters of p-methoxycinnamic acid. A new sunscreen of the cinnamate class. Int J of Cosmetic Sci, v. 23, p. 147-152, 2001.
- FREITAS, Z.M.F. Avaliação biofarmacotécnica de formulações dermatológicas semi-sólidas de cetoconazol. 2005, 154 f. Tese de Doutorado em FÁRMACOS e Medicamentos-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- FROMMING, K. H.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins in Pharmacy. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994.
- GARCIA, S. Liposomas com Filtro Solar: preparação e controle de qualidade. 1998. 161f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)–Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 1998.
- GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Evaluation on the photostability of different UV filter combinations of a sunscreen. Int. J. Pharm., v. 307, p. 123-128, 2006.
- GLAVAS-DODOV, M *et al.* Release profile of lidocaine HCl from topical liposomal gel formulation. Int. J. of Pharm. V. 242, p. 381-383, 2002.
- GODWIN, A. D.; KIM, N. H.; FELTON, L.A. Influence of Transcutol® CG on the skin accumulation and transdermal permeation of ultraviolet absorbers. Eur. J of Pharmac and Biopharmac, v. 53, p. 23-27, 2002.
- GOMESZ-HENS, A.; FERNÁNDEZ-ROMERO, J. M. The role of liposomes in analytical processes. Trends in Analytical Chem., v.24, n. 1, p. 9-19, 2005.
- GONZALEZ, H. G.; FARBROT, A.; LARKÖ, O. Percutaneous absorption of benzophenone-3, a common component of topical sunscreens. Clinical and Experimental Dermatol, v. 27, p.691-694, 2002.
- GONZALEZ, H. G.; FARBROT, A.; LARKÖ, O.; WENNBURG, 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.

- HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. Int. J. of Pharm., v.224, p.1-18, 2001.
- HAIGH, J.M.; SMITH, E.W. The selection and use of natural and synthetic membranes for *in vitro* diffusion experiments. Eur J of Pharm Sci, v.2, p.311-330, 1994.
- HANY, J.; NAGEL, R. Nachweis von UV-Filtersubstanzen in Muttermilch. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, n. 11, p. 341-345, 1995.
- HARRIGAN, P. R.; MADDEN, T. D.; CULLIS, P. R. Protection of liposomes during dehydration or freezing. Chem and Physics os Lipids, v. 52, p. 139-149, 1990.
- HEDGES, A.R. Industrial applications of cycodextrins. Chem. Rev. 98, 2035-2044, 1998.
- HENRIQUES, B.G. Desenvolvimento e Avaliação de Preparações Lipossomais Contendo Filtros Solares Sólidos UVA e UVB. 2008. 175 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.
- HIRSCHBERG, J.G.; SANTUS, R, KOHEN, E. Photobiology. San Diego: Academic Press, 1995, 506 p.
- HUONG, S. P. The photoisomerization of the sunscreen ethylhexyl *p*-methoxy cinnamate and its influence on the sun protection factor. J. Photochem. Photobiol A Chem., v. 186, n. 1, p. 65-70, 2007.
- IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; Ultraviolet Radiation; Volume 55. Lyon, France, Sci Publ, 1992.
- ICH Q2A., 1995. Text on Validation of Analytical Procedures. Geneva.
- IMBERT, D.; WICKETT, R. R. Topical delivery with liposomes. Cosmet. Toilet, v. 110, p. 32-45, 1994.
- INUI, M. *et al.* Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin an choriogenin production in male medaka (*Oryzias latipes*). Toxicology, v. 194, n. 1-2, p. 43-50, 2003.
- IRIE, T., UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. J. Pharm. Sci, v. 86, p.147-162, 1997.
- JANJUA, N. R. *et al.* Systemic absorpition of the sunscreens Benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate and 3-(4-Methyl-Benzylidene) Camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. J. Invest. Dermatol, v.61, p.57-61, 2004.

- JANOUSEK, A. Regulatory aspects of sunscreens in Europe. In: LOWE, N.J.; SHAATH, M.A.; PATHAK, M.A. Sunscreens Development, Evaluation, and Regulatory Aspects. New York: Marcel Dekker, p.589-600, 1997.
- JIMÉNEZ, M. M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M.F.; MARTINI, M.C. Influence of encapsulation on the *in vitro* percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. Int. J. Pharm., v. 272, p. 45-55, 2004.
- KIRCHOFF, V. W. J. H. Ozônio e radiação UVB. São José dos Campos, São Paulo. Transtec, 1995.
- KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H.W. Photoprotection. J. Am. Acad. Dermatol., v.52, p.937-958, 2005.
- LAUTENSCHLAGER, S.; WULF, H.; PITTELKOW, M. Photoprotection. The Lancet, v. 370, n. 9586, p. 528-537, 2007.
- LEGENDRE, J.Y., RAULT, I., LUIJTEN, W., *et al.* Effects of (-cyclodextrins on skin: implications for the transdermal delivery of piribedil and a novel cognition enhancing –drug. Eur. J. Pharm. Sci., v.3, p. 311-322, 1995.
- LEONARDI, G. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Penetração cutânea. Cosmetics & Toiletries, v. 9, p. 34- 36, 1997. Ed. Português.
- LEONARDI, G.R.; CHORILLI, M. Dermofarmácia. . Bases Dermocosméticas, Microemulsões & Lipossomas. RX Editora, São Paulo, 2006, 112 p.
- LEPORI, L. R. Miniatlas: a pele. 1ª ed., São Paulo: Soriak, 2002.
- LIAM, T.; HO, R. J. Y. Trends and developments in liposome drug delivery systems. J. of Pharm. Sci., v. 90, n. 6, p. 667-679, 2001.
- LOBO, B.W. P. Avaliação da estabilidade físico-química de misturas totais de nutrientes para uso intravenoso neonatal. 2005. 115f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- LOFTSSON, T.; BODOR, N. Effects of 2-hydroxypropyl- β -Cyclodextrins on the aqueous solubility of drugs and transdermal delivery of 17 β -estradiol. Acta. Pharm. Nord., Stockolm, v.1, p.185-194, 1989.
- LOFTSSON, T. Effects of Cyclodextrins on the Chemical Stability of Drugs in Aqueous Solutions- Drug Stability, 1995.
- LOFTSSON, T. Increasing the cyclodextrin complexation of drugs and drug bioavailability through addition of water-soluble polymers. Pharmazie., n. 53, p. 733-740, 1998a.

- LOFTSSON, T.; MASSON, M.; SIGURDSSON, H.H.; MAGNÚSSON, P.; GOFFIC, F. Cyclodextrins as co-enhancers in dermal and transdermal drug delivery. Pharmazie, Berlin, v.53, p. 137-139, 1998b.
- LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrines in topical drug formulations: theory and practice. Int. J. Pharmac. 225, 15-30, 2001.
- LOPEZ, R.F.L.; COLLETT, J.H.; BENTLEY, M.V.L.B. Influence of cyclodextrin complexation on the *in vitro* permeation and skin metabolism of dexamethasone. Int. J. Pharmac. 200, 127-132, 2000.
- MA, R. *et al.* UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. Toxicol. Sci., v.74, p. 43-50, 2003.
- MANSUR, J. S.; BREDE, M. N. R.; MANSUR, M. C. A.; AZULAY, R. D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. Anais Brasileiro de Dermatologia, v. 61, n. 3, p. 121-124, 1986.
- MARTINDALE, The Complete Drug Reference. Thirty Second Edition. Editado por Katherine Parfitt, Pharmaceutical Press, London, UK, ISBN: 085369429, 1999, P.1487.
- MARTINI, M. C. Introducción a la dermatofarmacia y a la cosmetología. Zaragoza: Ed. Acribia, 2005, p. 39.
- MARTINI, M.C.; SEILLER, M. Actifs et additifs en Cosmetologie. Paris., Technique & Documentation, 2006.
- MARQUES, H.M.C. Preparation of complexes: evidence for complex formation. Revista Portuguesa de Farmacia. V. XLIV, n.4, p. 157-163, 1994.
- MASSON, M.; LOFTSSON, T.; MASSON, G.; STEFANSSON, E. Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and *in vitro* testing. J. Contr. Rel. 59, 107-118, 1999.
- MATSUDA, H.; ARIMA, H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. Adv. Drug. Deliv. Rev., n. 36, p. 81-99, 1999.
- MEDI, M.B.; SINGH, J. Electronically facilitated transdermal delivery of human parathyroid hormone (1-34). Int. J. Pharm., Washington, v.263, p. 25-33, 2003.
- MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and applications. Adv Drug Deliv Rev., v. 47, p. 165-196, 2001.
- MELO, A.L. *et al.* Enhanced schistosomicidal efficacy of tartar emetic encapsulated in pegylated liposomes. Int. J. Pharm., v.255, p. 227-230, 2003.

- MENON, G.K. New insights into skin structure: scratching the surface. Advanced drug deliv. Rev., v.54, S1, p.S3-S17, 2002.
- MERWALD, H.; KLOSNER, G.; KOKESCH, C.; DER-PETROSSIAN, M.; HONIGSMANN, H.; TRAUTINGER, F. UVA –induced oxidative damage and cytotoxicity depend on the mode of exposure. J. Photochem. Photob. B: Biology, v.79, p.197-207, 2005.
- MIGRATORI, S. *In situ* determination of partition and diffusion coefficients in the lipid bilayers of stratum corneum. Pharm. Res., New York, v.17, n.8, 2000.
- MIRANDA, M.C. Desenvolvimento de lipossoma com produto repelente de insetos e metodologia analítica. 2005. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- MOSER, K. *et al.* Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. Eur. J. of Pharm. and Biopharm., v.52, p.103-112, 2001.
- MOTA, A. C. V. Estudo de Cedência de Filtros Solares Incluídos em Sistemas de Liberação. 2005, 84 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- MONTENEGRO, L. *et al.* *In vitro* skin permeation of sunscreen agents from O/W emulsions. Int. J of Cosmetic. Sci., v.30, p.57-65, 2008.
- MÜLLER, M. *et al.* Physicochemical characterization of liposomes with encapsulated local anaesthetics. Int. J. Pharm., v.274, p.139-148, 2004.
- MURA, P. *et al.* Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophobic gel formulations. Eur. J. Pharm. Sci, v.8, p. 365-372, 2003.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na ciência e na indústria. 2ª ed., Campinas: UNICAMP, 2002.
- NETZ, P.A; GONZALEZ ORTEGA, O.G. Fenômenos de Transporte. In: NETZ, P.A; GONZALEZ, O.G. Fundamentos de físico-química. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, cap.8, p.224-245, 2002.
- NEW, R. R. C. Liposomes: a practical approach. Oxford: Oxford University Press, 1997, p.1-23.
- NOHYNEK, G.J.; SCHAEFER, H. Benefit and Risk of organic ultraviolet filters. Regul. Toxicol. Pharm. v.33, p.285-299, 2001.
- OSTERWALDER, U.; LUTHER, H.; HERZOG, B. Novo protetor UVA. Cosmetics & Toiletries, v. 12, jul/ago, 2000.

- PATTANAARGSON, S. *et al.* Photoisomerization of octyl methoxycinnamate. J. Photochem and Photobiol A: Chemistry., v.161, p.269-274, 2004.
- PELLET, M.A.; ROBERTS, M.S.; HADGRAFT, J. Supersaturated solutions evaluated with an *in vitro* stratum corneum tape stripping technique. Int. J. of Pharm., v. 151, p. 91-98, 1997.
- PERUGINI, P. *et al.* Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-*p*-methoxycinnamate. Int. J. Pharm. V. 246, p. 37-46, 2002.
- PERSHING, L.K.; CORLETT, J.; JORGENSEN, C. *In vivo* pharmacokinetics and pharmacodynamics of topical ketoconazole and miconazole in human stratum corneum. Antimicrob. Agents Chemoter, Bethesda, v.38, p.90-95, 1994.
- PERTINHEZ, T.A. *et al.* Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína:β-ciclodextrina. Quim. Nova, v.30, n. 5, sept/out, 2007.
- PETRAZZUOLI, M. Advances in sunscreens. Curr. Probl. Dermatol, v.12, n. 6, p. 287-290, 2000.
- PUGLIA, C. *et al.* Evaluation of *in vivo*- topical anti-inflammatory activity of indometacin from liposomal vesicles. J. Pharm. Pharmacol. V. 56, p. 1225-1232, 2004.
- PUSKÁS, I.; CSEMPESZ, F. Influence of cyclodextrins on the physical stability of DPPC-liposomes. Colloid. Surf B: Biointerfaces. V. 58, p. 218-224, 2007.
- RAMON, E. *et al.* Liposomes as alternative vehicles for sun filter formulations. Drug Deliv. V. 12, p. 83-88, 2005.
- RAMOS, M.F.S. Perspectivas da utilização dos extratos de Própolis, Aloe spp. e Hamamelis virginiana como agentes antisolares :avaliação espectrofotométrica e fototóxica. 1995. 155p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,1995.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova, v.27, n.5, p.771-780, 2004.
- RIBEIRO, R.P. Desenvolvimento e Validação da metodologia de análise do teor de filtros solares e determinação do FPS *in vitro* em formulações fotoprotetoras comerciais. 2004. 77p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.
- RIBEIRO, C. Cosmetologia aplicada a dermocosmética. São Paulo: Ed. Pharmabooks, p. 77-120, 2006.

- RICCI-JÚNIOR, E. Nanopartículas de ácido poli-(lático-co-glicólico) contendo zinco (II) ftalocianina para uso na Terapia Fotodinâmica. 2005. 185 f. Tese de Doutorado em Fármacos e Medicamentos-Faculdade de Ciências Farmacêuticas Rib Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- RUOZI, B. *et al.* Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: two techniques for rapid characterization of liposomes. Eur. J. Pharm. Sci., v. 25, p. 81-89, 2005.
- RUVOLO JÚNIOR, E. C. Proteção solar: comparação dos métodos de determinação por testes em humanos (in vivo), FDA, COLIPA, SAA. Cosmetics on line, v. 19, n. 105, p. 37-46, 1997.
- SANTIS, A.K. Formas Farmacêuticas Semi-Sólidas de Uso Tópico Contendo Nifedipina: Desenvolvimento Galênico e Avaliação Biofarmacotécnica. 2008. 158 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- SANTOS, V.M. Preparação de Filtros Solares em Nanosistema Visando a Ação Prolongada. 2007. 124 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
- SANTOS, E. P.; SANTOS, R. J. Filtros Solares. Aerossol e Cosméticos, v. 53, p. 48-55, 1986.
- SANTOS, E. P. *et al.* *In vitro* and *in vivo* determinations of sun protection factors of sunscreen lotions with octylmethoxycinnamate. Int J of Cosmetics Sci., v.21, p. 1-5, 1999.
- SANTOS, N.C.; CASTANHO, M.A.R.B. Liposomas: a bala mágica acertou? Química Nova, v. 25, n. 6 B, p. 1181-1185, 2002.
- SANTOYO, S. *et al.* *In vitro* percutaneous absorption of piroxicam through synthetic membranes and abdominal rat skin. Pharm Acta Helvetiae, v.71, p.141-146, 1996.
- SARVEIYA, V.; STACEY, R.; 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. J. Chromatography B. v.803, p.225-231, 2004.
- SCALIA, S.; VILLANI, S.; SCATTURIN, A.; VANDELLI, M.; FORNI, F. Complexation of the sunscreen agent, butyl-methoxydibenzoylmethane with hydroxypropil-beta-cyclodextrin. Int. J. of Pharm., v.175, p.205-213, 1998.
- SCALIA, S.; CASOLARI, A.; IACONINOTO, A.; SIMEONI, S. Comparative studies of the influence of cyclodextrines on the stability of the sunscreen agent,

- 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. J. Pharmac. Biomed. Analysis. 30, 1181-1189, 2002.
- SCALIA, S.; TURSILLI, R.; BIANCHI, A.; LO NOSTRO, P.; BOCCI, E.; RIDI, F.; BAGLIONI, P. Incorporation of the sunscreen agent, octyl methoxycinnamate in a cellulosic fabric grafted with β - cyclodextrin. Int. J. Pharm, v. 308, p. 155-159, 2006.
 - SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. Introdução aos Produtos Fotoprotetores. Cosmetics & Toiletries, v. 12, jul/ago, 2000.
 - SCHLUMPF, M. *et al.* Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters-na update. Toxicology. V.205, p. 113-122, 2004.
 - SCHMOOK, F.P.; MEINGASSNER, J.G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epiderms models with human and animal skin *in vitro* percutaneous absorption. Int J of Pharm, v.215, p.51-56, 2001.
 - SCHULZ, J. *et al.* Distribution of sunscreen on skin. Advanced Drug Deliv Rev. V. 54, suppl. 1, s 157-s 163, 2002.
 - SEKKAT, N.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Biophysical study of porcine ear skin *in vitro* and its comparison to human skin *in vivo*. J. Pharm. Sci.; Washington, v.91, n.11, p.2376-2381, 2002.
 - SHAH, V.P. *et al.* Determination of *in vitro* drug release form hydrocortisone creams. Int J of Pharm, v.53, p.53-59, 1989.
 - SHAH, V.P. *et al.* *In vitro* release of hydrocortisone from topical preparations and automated procedure. Pharmaceutical Research, v.8, n.1, p.55-59, 1991a.
 - SHAH, V.P. *et al.* Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetics studies. Int J of Pharm, v.82, p.1-7, 1992.
 - SHAH, V.P. *et al.* Bioavailability and bioequivalence of transdermal drug delivery systems. In Shah E Maibach: Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration. Nova York: Plenum Press, p.415-424, 1993.
 - SHAH, V.P. *et al.* Bioequivalence of topical dermatological dosage forms-methods of evaluation of bioequivalence. Pharmaceutical Research, v.15, p. 167-171, 1998.
 - SHAH, V.P.; ELKINS, J.; WILLIAMS, R.L. Evaluation of the test system used for *in vitro* release of drugs for topical dermatological drug products. Pharmaceutical Develop. Techn., v.4, n.3, p.377-385, 1999.
 - SHAH, V. P. Progress in methodologies for evaluation bioequivalence of topical formulations. American. J. of Clinical Dermatol., v. 2, n.5, p. 175-180, 2001.

- SHAATH, N. A. Enciclopédia de Absorvedores de UV para produtos com filtro solar. Cosmet. Toilet., v. 7, p. 47-58, 1995.
- SHAATH, N. A. Evolution of modern sunscreen Chemicals. In: Lowe, N.J.;SHAATH, M. A.; PATHAK, M. A. Sunscreens Development, Evaluation, and Regulatory Aspects. New York: Marcel Dekker, p. 589-600, 1997.
- SHAATH, V.P. IV-IVC for topically applied preparations-a critical evaluation. Eur. J. of Pharm and Biopharm., v.60, n.2, p.309-314, 2005.
- SHARMA, A.; SHARMA, U.S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. Int. J. of Pharm., v. 154, p. 123-140, 1997.
- SIEWERT, M.; DRESSMAN, J.; BROWN, C. K.; SHAH, V. P. FIP/AAPS : Guidelines to Dissolution/ *in Vitro* Release Testing of Novel/ Special Dosage Forms. AAPS Pharm Sci Tech, v.4, n. 1, article 7, 2003.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 5ª ed. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 1994. 387 p. Bibliografia: cap 3 e 4.
- SINGH, S.; SINGH, J. Transdermal drug delivery by passive diffusion and iontophoresis: a review. Med. Res. Ver., New York, v.13, n.5, p.569-621, 1993.
- SINKO, J. P. Martin: físico-farmácia e ciências farmacêuticas. São Paulo: Editora Artmed, 2008, 809p.
- SIMEONI, S.; SCALIA, S.; BENSON, H. A. E. Influence of cyclodextrins on *in vitro* human skin absorption of the sunscreen, butyl-methoxydibenzoylmethane. Int. J. Pharmac. 280, 163-171, 2004.
- SKELLY, J.P. *et al.* FDA and AAPS Report of the workshop on principles and practices of *in vitro* percutaneous penetration studies: relevance to bioavailability and bioequivalence. Pharmaceutical Research, v.4, n.3, p.265-267, 1987.
- SOARES, L.V. Curso Básico de Instrumentação para Analistas de Alimentos e Fármacos. 1º ed., São Paulo: Manole, 2006.
- SPRINGSTEEN, A; YUREK, R.; FRAZIER, M. *et al.* In vitro measurement of sun protection factor of sunscreen by diffuse transmittance. Anal. Chim. Acta, v. 380, p. 155-164, 1999.
- SUHONEN, T.M.; BOUWSTRA, J.A.; URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. J of Controlled Release, n.59, p.149-161, 1999.

- SUMMERS, B.; SUMMERS, R.S.; MULLER, E. A national web-based survey of sunscreen products as a tool for industry self-regulation, consumer awareness campaigns and marketing. IFSCC Magazine, v.8, n.3, p.201-204, 2005.
- SUZUKI, K.; SAKON, K. The application of liposomes to cosmetics. Cosm. Toil., v. 105, n. 5, p. 65-78, 1990.
- SUZUKI, T. *et al.* Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. Toxicol. Appl. Pharmacol., v. 203, n. 1, p. 9-17, 2005.
- SZEJTLI, J. Cyclodextrins Technology. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 1988.
- THE MERCK INDEX, Thirteenth Edition, Merck Co. Inc., USA, ISBN: 0911910-13-1, 2001, P.1213.
- TOUITOU, E. *et al.* Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. J of Controlled Release, v.56, p. 7-21, 1998.
- TURSILLI, R. *et al.* Solid lipid microparticles containing the sunscreen agent, octal-dimethylaminobenzoate: Effect of the vehicle. Eur. J. Pharm. Biopharm. V. 66, p. 483-487, 2007.
- UEKAMA, K.; OTAGIRI, M. Cyclodextrins in drug carrier systems. CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., v. 3, p. 1-40, 1987.
- UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier systems. Chem. Ver., n. 98, p. 2045-2076, 1998.
- URBACH, F. The historical aspects of sunscreen. J. Photochem. and Photobiol. B, v. 64, p. 99-104, 2001.
- U. S. FDA/ CDER. Department of health and human Services. Food and Drug Administration. Center of Drug Evaluation and Research. Guidance for industry: nonsterile semisolid dosage forms: scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls; in vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation. 1997.
- WAGNER, H., *et al.* Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. J. of Controlled Release, v.75, p. 283-295, 2001.
- WANG, T.; KASICHAYANULA, S.; GU, X. *In Vitro* permeation of repellent DEET and sunscreen oxybenzone across three artificial membranes. Int. J. of Pharm., v. 310, p. 110-117, 2006.

- WEIGMANN, H. J. *et al.* Bioavailability of clobetasol propionate-quantification of drug concentrations in the stratum corneum by dermatopharmacokinetics using tape stripping. Skin Pharmacol and Applied Skin Physiology, v. 12, p. 46-53, 1999.
- WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Penetrations enhancers. Adv. Drug Delivery Rev., v.56, p.603-618, 2004.
- WISSING, S.A.; MÜLLER, R.H. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: *in vitro* release and *in vivo* skin penetration. J Controll. Rel., v. 81, p. 255-233, 2002.
- VAN DEN BERGH, B.A.L. *et al.* Interactions of elastic and rigid vesicles with human Skin *in Vitro*: electron microscopy and two-photon excitation microscopy. Biochim. Biophys. Acta. V. 1461, p. 155-173, 1999.
- VEIGA, F.; MARTINS, M.R.F.M. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para ciclodextrinas. Brazilian J of Pharm Sci., v. 38, n.1, jan/mar, 2002.
- VELASCO de PAOLA, M. V.; RIBEIRO, M. E. Interação entre Filtros Solares. Cosmetics & Toiletries, v. 10, set/out, 1998.
- VEMURIS, S.; RHODES, C.T. Preparatin and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. Pharm Acta Helv, v.70, p.95-111, 1995.
- VERMA, D. D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. Int. J of Pharm, v. 258, p. 141-151, 2003.
- VIGLIOGLIA, P. Cosmiatria II. Ap Americana de publicaciones S.A, Buenos Aires , 1989.
- YAROSH, D. B. Liposomes in investigative dermatology. Photodermatol. Photoimmunl & Photomedicine, v. 17, p. 203-212, 2001.
- YENER, G.; INCEGÜIL, T.; YENER, N. Importance of using solid lipid microspheres as carriers for UV filters on the example octyl methoxy cinnamate. Int J of Pharm, v.258, p. 203-207, 2003.
- ZATZ, J.L. Skin Permeation-Fundamentals and Application. Wheaton: Allured Publishing Corporation, 1993.
- ZATZ, J.L. Drug release from semisolids: effect membrane permeability on sensitivity to product parameters. Pharmaceutical Research, v. 12, n. 5, p. 787-789, 1995.

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](#)