

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA
FARMACÊUTICA

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS CONTENDO
FILTROS SOLARES NANOENCAPSULADOS

JÚLIA SCHERER SANTOS

PORTO ALEGRE, 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NANOTECNOLOGIA
FARMACÊUTICA

DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES FOTOPROTETORAS CONTENDO
FILTROS SOLARES NANOENCAPSULADOS

Tese apresentada por **Júlia Scherer Santos** para
obtenção do **TÍTULO DE DOUTOR** em
Nanotecnologia Farmacêutica.

Orientadora: Prof. Dr. Silvia Stanisquaski Guterres
Porto Alegre, 2014.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em **Nanotecnologia Farmacêutica, em nível de Doutorado** da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em **10 de outubro de 2014**, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Cristiane de Bona da Silva
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Leticia Scherer Koester
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Maria Lionzo Ismenia Zulian Lionzo
Universidade Fundação de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Prof. Dr. Silvia Stanisçuaski Guterres
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Valquiria Linck Bassani
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Scherer Santos, Júlia
Desenvolvimento de formulações fotoprotetoras
contendo filtros solares nanoencapsulados / Júlia
Scherer Santos. -- 2014.
203 f.

Orientadora: Silvia Stanisçuaski Guterres.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de Pós-
Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica, Porto
Alegre, BR-RS, 2014.

1. Nanocápsulas. 2. Fotoprotetores. 3. Filtro
solar. I. Stanisçuaski Guterres, Silvia, orient. II.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Silvia Stanisçuaski Guterres pela confiança em mim depositada e por me mostrar o caminho da ciência.

Agradeço a todos colegas do laboratório 405 e K204, de que alguma forma tenham me auxiliado. A ajuda de todos foi imprescindível para que esse trabalho pudesse ser realizado. Agradeço em especial à minha colega de trabalho, Denise Soledade Jornada, que participou diretamente desse trabalho. A sua experiência em pesquisa veio a contribuir para o aprimoramento dessa tese. Agradeço também aos colegas pelos bons momentos vivenciados durante esses 4 anos.

Agradeço à CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Agradeço aos professores do Programa de Pós graduação em Nanotecnologia Farmacêutica e do Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos.

Agradeço as minhas colegas da primeira turma do Programa de Pós Graduação em Nanotecnologia Farmacêutica Ana Carolina Ashbar, Aline Ourique, Gabriele Dadalt pelo companheirismo.

Agradeço aos meus pais Edison e Eliete por primarem pela educação, me permitindo chegar até a pós-graduação. Obrigada por estarem sempre presentes, pelo incentivo, paciência, apoio e por acreditarem no meu potencial.

Agradeço a minha irmã Isabela, que me recebeu aqui em Porto Alegre, em 2010, me auxiliando a me “virar” na capital. Aos poucos, fomos nos aproximando mais e nos tornando grandes companheiras. Agradeço também ao meu cunhado Douglas, pela companhia e parceria.

Agradeço à minha irmã Andyara, que mais recentemente veio também morar em Porto Alegre, a minha companheira de chimarrão! Dy, obrigada pela companhia e pelas conversas.

Agradeço ao meu namorado Mateus. Durante o período que acompanhou o andamento do meu doutorado, sempre me incentivou, me dando força, apoio e carinho.

RESUMO

A utilização de nanopartículas poliméricas como carreadores de filtros solares tem sido descrita na literatura, com intuito de possibilitar uma maior retenção desses no estrato córneo. Esse trabalho teve por objetivo desenvolver formulações nanotecnológicas fotoprotetoras a partir de variações na composição do núcleo oleoso e na composição quali-quantitativa dos filtros solares selecionados. Inicialmente, foram preparadas formulações contendo somente metoxicinamato de octila (OMC), afim de determinar a melhor concentração do filtro no núcleo. A análise da estabilidade dessas nanocápsulas mostrou que a menor concentração de OMC foi a ideal para a sua localização preferencial no núcleo. Posteriormente, a essa formulação foi adicionado 16 mg/mL de um óleo adicional, obtendo-se a formulação NC₁, a qual apresentou tamanho nanométrico e potencial zeta variando entre -9 e -18 mV. Após a secagem das formulações contendo OMC ou OMC associado ao óleo adicional, a retomada do tamanho nanométrico foi obtida em sua totalidade apenas para a formulação contendo OMC e o óleo adicional. No estudo do gradiente de densidade observou-se que essa mesma formulação, apresentou a menor tendência à mistura de partículas. A formulação NC₁ também propiciou maior fotoestabilização do OMC, da mesma forma como a sua respectiva forma pulverulenta. Após incorporação dos nanoingredientes em hidrogéis, os valores de pH, comportamento reológico e características organolépticas obtidas foram adequadas para aplicação tópica. No estudo da capacidade fotoprotetora, a formulação contendo NC₁ apresentou melhor desempenho. O hidrogel contendo NC₁ também apresentou maior retenção no estrato córneo em ambos os tempos de análise (2 h e 6 h) em relação aos demais hidrogéis contendo somente OMC. Em um estudo final, foram adicionados outros dois filtros solares à formulação NC₁, a octiltriazona e bemotrizinol. As formulações apresentaram tamanho de partícula, bem como pH e potencial zeta, adequados. Na análise da estabilidade física das formulações, observou-se que as mesmas mantiveram-se estáveis durante todo o período de análise. No estudo da capacidade fotoprotetora e da capacidade absorptiva, a formulação contendo um total de 3 mg/mL de filtros solares encapsulado apresentou melhor desempenho. No estudo de penetração cutânea, esse mesmo semissólido apresentou melhor retenção no estrato córneo após 6 horas em relação ao semissólido contendo os três filtros na forma livre. No estudo avaliando as peles suínas tratadas com as formulações seguida da irradiação em lâmpada UVB, os hidrogéis contendo nanocápsulas (gel contendo NC₁ e o gel contendo NC₄) foram aqueles que mostraram maior capacidade de evitar os danos provocados pela radiação. Em síntese, esse trabalho demonstrou a superioridade das nanocápsulas desenvolvidas em relação aos hidrogéis não-nanotecnológicos. Também foi demonstrado a possibilidade de encapsulação de mais de um filtro solar no núcleo oleoso das nanocápsulas.

PALAVRAS-CHAVE: PALAVRAS-CHAVE: nanocápsulas, fotoprotetores, metoxicinamato de octila, octiltriazona, bemotrizinol, filtro solar.

ABSTRACT

Polymeric nanoparticles containing sunscreens have been developed in several studies mainly to enable greater retention in the stratum corneum. This work aimed to develop photoprotective formulations based on nanotechnology by varying in the oil core composition and qualitative-quantitative composition of selected sunscreens. Initially, only formulations containing ethylhexyl methoxycinnamate (EMC) were prepared, in order to determine the optimal concentration of this filter in the nanoparticles core. The stability analysis of these nanocapsules demonstrated that the lower concentration of EMC was the optimal for its core location. To this formulation 16 mg / mL of an additional oil was added, obtaining the NC₁ formulation, which had nanometer size and zeta potential ranging between -9 and -18 mV. After drying the formulations containing EMC or EMC associated with additional oil, the resumption of nanometric particle size were obtained in its entirety only for the formulation containing EMC and additional oil. In the study of density gradient, this formulation also showed a lower tendency of particle mixture. The NC₁ formulation also provided greater photostabilization of EMC, just as its respective dry form. After incorporation of nanoparticles in hydrogels, the pH values, rheological behavior and organoleptic characteristics were appropriated for topical application. In the study of photoprotective capacity, the formulation containing NC₁ presented the best performance. The hydrogel containing NC₁ showed greater retention in the stratum corneum for 2 and 6 hours, compared to other hydrogels containing only EMC. In a second study, the sunscreens ethylhexyl triazone and bemotrizinol were added to NC₁ formulation. The formulations had suitable particle size as well as pH and zeta potential. In the analysis of physical stability of these formulations, it was observed that they were stable throughout the period of analysis. In the study of photoprotective capacity and absorptive capacity, the formulation containing 3 mg/mL of sunscreens encapsulated showed the best performance. In the study of skin penetration, this semisolid showed better retention in the stratum corneum only after 6 hours compared to semisolid containing three sunscreens in free form. In a study evaluating the porcine skin treated with the formulations and submitted to UVB irradiation, hydrogels containing nanocapsules (hydrogel containing NC₁ and hydrogel containing NC₄) were those that showed greater capacity to prevent damage caused by radiation. In summary, this study demonstrated the superiority of developed nanocapsules in relation to non-nanotechnology hydrogels. It was also demonstrated the possibility of encapsulation of more than one sunscreen in the oil core of nanocapsules.

KEY-WORDS: nanocapsules, sunscreens, ethylhexyl methoxycinnamate, ethylhexyl triazone, bemotrizinol.

LISTA DE ABREVIATURAS

OMC: Metoxicinamato de octila

OCT: Octitriazona

BMT: Bemotrizinol

UV: Ultravioleta

UVA: Radiação ultravioleta A

UVB: Radiação ultravioleta B

UVC: Radiação ultravioleta C

NC: Nanocápsulas

NC_{0,4,8}: Suspensão de nanocápsulas contendo 4,8 mg/mL de metoxicinamato de octila

NC_{0,1,0}: Suspensão de nanocápsulas contendo 1 mg/mL de metoxicinamato de octila

NC_{0,s}: Suspensão de nanocápsulas NC_{0,1,0} seca por aspersão

NC₁: Suspensão de nanocápsulas contendo 160 µL de triglicerídeos de cadeia média e metoxicinamato de octila em concentração de 1 mg/mL

NC_{1,s}: Suspensão de nanocápsulas NC₁ seca por aspersão

NC₂: Suspensão de nanocápsulas contendo 160 µL de triglicerídeos de cadeia média, 1 mg/mL de metoxicinamato de octila e 2 mg/mL de octitriazona

NC₃: Suspensão de nanocápsulas contendo 160 µL de triglicerídeos de cadeia média, 1 mg/mL de metoxicinamato de octila e 2 mg/mL de bemotrizinol

NC₄: Suspensão de nanocápsulas contendo 160 µL de triglicerídeos de cadeia média, 1 mg/mL de metoxicinamato de octila, 1 mg/mL de octitriazona e 1 mg/mL de bemotrizinol

TCM: Triglicerídeos de cadeia média

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

g_{OMC}: Emulsão contendo metoxicinamato de octila livre

g_{NC0}: Hidrogel de Carbopol 980[®] contendo suspensão de nanocápsulas NC_{0,1,0}

g_{NC0s}: Hidrogel de Carbopol 980[®] contendo NC₀ seca

g_{NC1}: Hidrogel contendo suspensão de nanocápsulas NC₁

g_{NC1s}: Hidrogel contendo NC₁ seca

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

g_{NS}: Gel de nanoesferas

g_{NC Br}: Gel de nanocápsulas brancas

g_{OMC-OCT-BMT}: Gel contendo metoxicinamato de octila, octiltriazone e bemotrizinol

g_{NC2}: Gel contendo suspensão de nanocápsulas NC₂

g_{NC3}: Gel contendo suspensão de nanocápsulas NC₃

g_{NC4}: Gel contendo suspensão de nanocápsulas NC₄

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Moléculas com substituição para (A) e orto (B).

Figura 2. Deslocalização de elétrons nos cinamatos.

Figura 3. Estrutura química do octil- para-metoxi-trans-cinamato.

Figura 4. Estrutura química do octil- para-metoxi-cis-cinamato.

Figura 5. Estrutura química da octiltriazona.

Figura 6. Estrutura química do bemotrizinol.

Figura 7. Representação esquemática do método de capacidade fotoprotetora.

Figura 8. Massa dos filmes de Eudragit S 100® após imersão em metoxicinamato de octila.

Figura 9. Distribuição do tamanho de partícula (μm) por volume (%) das formulações contendo OMC: $\text{NC}_{0,4,8}$ (A), $\text{NC}_{0,1,0}$ (B) por difratometria de laser ($\pm\text{dp}$).

Figura 10. Tamanho médio das partículas (nm) das suspensões de nanocápsulas $\text{NC}_{0,1,0}$, $\text{NC}_{0,4,8}$ por intensidade através de espectroscopia de correlação de fótons ($\pm\text{dp}$). As médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Figura 11. Índice de polidispersão (PDI) das suspensões de nanocápsulas $\text{NC}_{0,1,0}$ e $\text{NC}_{0,4,8}$, por espectroscopia de correlação de fótons ($\pm\text{dp}$).

Figura 12. Variações de retroespalhamento da formulação $\text{NC}_{0,4,8}$ (A), variação de transmissão (B) e retroespalhamento (C) de $\text{NC}_{0,1,0}$ obtidos por espalhamento múltiplo de luz.

Figura 13. Doseamento das suspensões de nanocápsulas contendo 4,8 mg/mL ($\text{NC}_{0,4,8}$) e 1 mg/mL ($\text{NC}_{0,1,0}$) de OMC obtido por CLAE.

Figura 14. Distribuição do tamanho de partícula (μm) por volume (%) através de difratometria de laser da formulação NC_1 por difratometria de laser ($\pm\text{dp}$).

Figura 15. Variações de retroespalhamento da formulação NC_1 obtido por espalhamento múltiplo de luz.

Figura 16. Fotomicrografias dos pós $\text{NC}_{0,s}$ (A) $\text{NC}_{1,s}$ (B) e do adjuvante de secagem (B) em aumento de 15.000 vezes por microscopia eletrônica de varredura.

Figura 17. Concentração de OMC nas nanocápsulas, nanocápsulas secas e solução metanólica em função do tempo sob radiação UVB.

Figura 18. Potencial zeta das formulações antes e após a exposição à radiação UVB (\pm dp).

Figura 19. Tamanho de partícula das suspensões de nanocápsulas por espectroscopia de correlação de fótons, antes e após a exposição à radiação UVB (\pm dp). As médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Figura 20. Índice de polidispersão (PDI) das suspensões de nanocápsulas por espectroscopia de correlação de fótons, antes e após a exposição à radiação UVB (\pm dp). As médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Figura 21. Fotografias dos géis contendo OMC na forma, contendo suspensões de nanocápsulas ou nanocápsulas secas (A: g_{OMC}, B: g_{NC0}; C: g_{NC1}; D: g_{NC0s}; E: g_{NC1s}).

Figura 22. Distribuição do tamanho de partícula médio (μ m) em volume (%) das formas semissólidas: g_{OMC} (A), gel de Carbopol[®] branco (B), g_{NC0} (C), g_{NC1} (D), g_{NC0s} (E), g_{NC1s} (F), por difratometria de laser.

Figura 23. Gráficos de variação da transmissão (A) e retroespalhamento de g_{OMC} (B) g_{NC0} (C) e g_{NC0s} (D), g_{NC1} (E) e g_{NC1s} (F) obtidos por espalhamento múltiplo de luz.

Figura 24. Reograma da viscosidade aparente versus taxa de cisalhamento dos hidrogéis, (A) g_{OMC}, (B) g_{NC0}, (C), g_{NC1}, (D), g_{NC0s}, (E) g_{NC1s}.

Figura 25. Distribuição do OMC das formulações g_{OMC}, g_{NC0}, g_{NC1}, g_{NC0s}, g_{NC1s} e g_{OMCs} no estrato córneo, no período de 2 horas e 6 horas. As médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem dentro do mesmo período de tempo (2 horas ou 6 horas). As médias seguidas por letras minúsculas iguais não apresentam diferença entre os períodos de tempo (entre 2 horas e 6 horas).

Figura 26. Distribuição do OMC das formulações g_{OMC}, g_{NC0}, g_{NC1}, g_{NC0s}, g_{NC1s} e g_{OMCs} na epiderme, no período de 2 horas e 6 horas. As médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem dentro do período de 6 horas.

Figura 27. Distribuição do OMC das formulações g_{OMC}, g_{NC0}, g_{NC1}, g_{NC0s}, g_{NC1s} e g_{OMCs} na derme, no período de 2 horas e 6 horas. As médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem dentro do mesmo período de tempo (2 horas ou 6 horas). As médias seguidas por letras minúsculas iguais não apresentam diferença entre os períodos de tempo (entre 2 horas e 6 horas).

Figura 28. Análise da capacidade absorptiva das formas semissólidas: g_{NC0}, g_{NC1}, g_{NS} (gel contendo apenas nanoesferas), g_{NC br} (gel contendo nanocápsulas de TCM) e g_{OMC} por espectrofotometria.

Figura 29. Fotomicrografias de peles suínas obtidas por MEV. Pele suína sem exposição à radiação UVB e sem tratamento (A), pele suína com exposição à luz UV sem tratamento (B). Pele suína com exposição à radiação UVB tratada com g_{OMC} (C), pele suína tratada com g_{NC0} (D), pele suína tratada com g_{NC1} (E), pele suína tratada com g_{NC0s} (F), pele suína tratada com g_{NC1s} (G).

Figura 30. Fotomicrografias de pelo suíno obtidas por MEV. Pelo suíno com exposição à luz UV sem tratamento (A), pelo suíno com exposição à luz UV contendo g_{OMC} (B), pelo suíno com exposição à luz UV contendo g_{NC0} (C), pele suína com exposição à luz UV contendo g_{NC0s} (D), pele suína com exposição à luz UV contendo g_{NC1} (E), pele suína com exposição à luz UV contendo g_{NC1s} (F).

Figura 31. Distribuição do tamanho de partícula (μm) por volume (%) das formulações contendo OMC, OCT e BMT: NC₂ (A), NC₃ (B) e NC₄ (C) por difratometria de laser ($\pm dp$).

Figura 32. Tamanho de partícula médio (nm) das suspensões de nanocápsulas NC₂, NC₃, NC₄ por intensidade através de espectroscopia de correlação de fótons ($\pm dp$). As médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Figura 33. Índice de polidispersão (PDI) das suspensões de nanocápsulas NC₂, NC₃ e NC₄ por espectroscopia de correlação de fótons ($\pm dp$).

Figura 34. Tamanho de partícula médio das suspensões de nanocápsulas armazenadas à temperatura ambiente após o preparo e após 14 dias. As médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Figura 35. Índice de polidispersão médio das suspensões de nanocápsulas armazenadas à temperatura ambiente após o preparo e após 14 dias.

Figura 36. Potencial zeta das suspensões de nanocápsulas após o preparo e após 14 dias armazenadas à temperatura ambiente.

Figura 37. Valores de pH das suspensões de nanocápsulas após o preparo e após 14 dias armazenadas à temperatura ambiente.

Figura 38. Fotografias dos géis contendo os filtros na forma livre e nanoencapsulados (A: g_{OMC-OCT-BMT}; B: g_{NC2}, C: g_{NC3}, D: g_{NC4}).

Figura 39. Distribuição do tamanho médio de partícula médio (μm) em volume (%) das formas semissólidas: g_{OMC-OCT-BMT} (A), g_{NC2} (B), g_{NC3} (C), g_{NC4} (D), por difratometria de laser.

Figura 40. Gráficos de variação da transmissão (A) e retroespalhamento de g_{OMC-OCT-BMT} (B) g_{NC2} (C) e g_{NC3} (D), g_{NC4} (E) obtidos por espalhamento múltiplo de luz.

Figura 41. Reograma da viscosidade aparente versus taxa de cisalhamento dos géis contendo filtros solares: (A) g_{OMC-OCT-BMT}, (B) g_{NC2}, (C) g_{NC3}, (D) g_{NC4}.

Figura 42. Distribuição do OMC das formulações $g_{OMC-OCT-BMT}$, g_{NC4} no estrato córneo, no período de 2 horas e 6 horas. As médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem dentro do mesmo período de tempo (2 horas ou 6 horas). As médias seguidas por letras minúsculas iguais não apresentam diferença entre os períodos de tempo (entre 2 horas e 6 horas).

Figura 43. Distribuição do OCT das formulações $g_{OMC-OCT-BMT}$, g_{NC4} no estrato córneo, no período de 2 horas e 6 horas. As médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem dentro do mesmo período de tempo (2 horas ou 6 horas). As médias seguidas por letras minúsculas iguais não apresentam diferença entre os períodos de tempo (entre 2 horas e 6 horas).

Figura 44. Distribuição do BMT das formulações $g_{OMC-OCT-BMT}$, g_{NC4} no estrato córneo, no período de 2 horas e 6 horas. As médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem dentro do mesmo período de tempo (2 horas ou 6 horas). As médias seguidas por letras minúsculas iguais não apresentam diferença entre os períodos de tempo (entre 2 horas e 6 horas).

Figura 45. Distribuição do OMC das formulações $g_{OMC-OCT-BMT}$, g_{NC4} na epiderme, no período de 2 horas e 6 horas.

Figura 46. Distribuição do OCT das formulações $g_{OMC-OCT-BMT}$, g_{NC4} na epiderme, no período de 2 horas e 6 horas. As médias seguidas por letras minúsculas iguais não apresentam diferença entre os períodos de tempo (entre 2 horas e 6 horas).

Figura 47. Distribuição do BMT das formulações $g_{OMC-OCT-BMT}$, g_{NC4} na epiderme, no período de 2 horas e 6 horas.

Figura 48. Distribuição do OMC das formulações $g_{OMC-OCT-BMT}$ e g_{NC4} na derme, no período de 2 horas e 6 horas.

Figura 49. Distribuição do OCT das formulações $g_{OMC-OCT-BMT}$, g_{NC4} na derme, no período de 2 horas e 6 horas. As médias seguidas por letras minúsculas iguais não apresentam diferença entre os períodos de tempo (entre 2 horas e 6 horas).

Figura 50. Distribuição do BMT das formulações $g_{OMC-OCT-BMT}$, g_{NC4} na derme, no período de 2 horas e 6 horas.

Figura 51. Análise da capacidade absorptiva das formas semissólidas: $g_{OMC-OCT-BMT}$, g_{NC2} , g_{NC3} , g_{NC4} por espectrofotometria.

Figura 52. Análise da capacidade absorptiva das formas semissólidas: g_{NC1} , g_{NC2} , g_{NC3} , g_{NC4} por espectrofotometria.

Figura 53. Fotomicrografias das peles suínas obtidas por MEV após exposição à radiação UVB. Pele suína tratada com $g_{OMC-OCT-BMT}$ (A), pele suína tratada com g_{NC4} (B).

Figura 54. Fotomicrografias de pelo suíno obtidas por MEV. Pelo suíno tratado com $g_{OMC-OCT-BMT}$ (A), pelo suíno tratado com g_{NC4} (B).

Figura 55. Curva analítica padrão, preparada em triplicata, para quantificação do OMC a partir de nanocápsulas e nanocápsulas secas.

Figura 56. Cromatogramas de CLAE em coluna C18 (5 μ) 4,6 mm x 150 mm, fase móvel acetonitrila: água (85:15) da suspensão de nanocápsulas contendo triglicerídeos de cadeia média em concentração (A) e suspensão de nanocápsulas contendo metoxicinamato de octila em concentração (B).

Figura 57. Curva analítica, preparada em triplicata, para quantificação do OMC nas camadas da pele.

Figura 58. Cromatograma de CLAE em coluna C18 (5 μ) 150 mm x 4,6 mm, fase móvel acetonitrila: água (85:15), mostrando a eluição de OMC na presença de fita adesiva Scott[®].

Figura 59. Cromatograma obtido por CLAE em coluna C18 (5 μ) 150 mm x 4,6 mm, fase móvel acetonitrila: água (85:15), mostrando a eluição de OMC na presença de pele suína.

Figura 60. Curva analítica do OMC, preparada em triplicata, no meio receptor.

Figura 61. Curva analítica, preparada em triplicata, para quantificação do OMC das formulações NC₂, NC₃ e NC₄.

Figura 62. Curva analítica, preparada em triplicata para quantificação da OCT das formulações NC₂, NC₃ e NC₄.

Figura 63. Curva analítica, preparada em triplicata, para quantificação do BMT das formulações NC₂, NC₃ e NC₄.

Figura 64. Cromatogramas de CLAE em coluna C18 (5 μ) 4,6 mm x 150 mm, fase móvel acetonitrila: metanol (1:1) da suspensão de nanocápsulas NC₄ contendo metoxicinamato de octila, octiltriazona e bemotrizinol.

Figura 65. Cromatograma de CLAE em coluna C18 (5 μ) 150 mm x 4,6 mm, fase móvel acetonitrila:metanol (85:15), mostrando a eluição dos filtros solares na presença de fita adesiva Scott[®].

Figura 66 Cromatograma de CLAE em coluna C18 (5 μ) 150 mm x 4,6 mm, fase móvel acetonitrila:metanol (85:15), mostrando a eluição dos filtros solares na presença de pele suína.

Figura 67. Curva analítica do OMC, preparada em triplicata, no meio receptor.

Figura 68. Curva analítica média do OCT, preparada em triplicata, no meio receptor.

Figura 69. Curva analítica média do BMT, preparada em triplicata, no meio receptor.

Figura 70. Valores médios de a^* inicial (T0) para as mechas controle negativo (C), mecha tratada com composição nanotecnológica (N) e mecha tratada com composição não-nanotecnológica (L).

Figura 71. Fotografias das mechas descoloridas e tingidas após exposição à radiação UV. Mecha controle negativo (A), mecha tratada com suspensão do OMC não nanotecnológica (B), mecha tratada com nanocápsulas (C).

Figura 72. Valores médios de a^* após 15 lavagens sucessivas das mechas controle negativo(C), mecha tratada com composição nanotecnológica (N) e mecha tratada com composição não-nanotecnológica (L).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos filtros solares orgânicos, espectro de ação e representante.

Tabela 2. Formulações de suspensão de nanocápsulas contendo metoxicinamato de octila.

Tabela 3. Formulações de nanocápsulas contendo associação de filtros solares.

Tabela 4. Descrição das formulações preparadas e as suas respectivas abreviaturas.

Tabela 5. Composição da formulação de OMC seco.

Tabela 6. Composição do hidrogel contendo OMC (g_{OMC}).

Tabela 7. Composição do hidrogel contendo OMC, OCT e BMT (g_{OMC-OCT-BMT}).

Tabela 8. Composição dos hidrogéis contendo filtros solares associados nanoencapsulados.

Tabela 9. Descrição das formas semissólidas contendo nanocápsulas e pós de nanocápsulas, e suas respectivas abreviaturas.

Tabela 10. Concentrações dos filtros solares em cada uma das formulações.

Tabela 11. Formulações de nanoesferas e nanoemulsão contendo metoxicinamato de octila.

Tabela 12. Valores médios de potencial zeta e pH das formulações NC_{0 4,8} e NC_{0 1,0} e obtido por mobilidade eletroforética (\pm dp).

Tabela 13. Teor de OMC nas nanocápsulas NC_{0 4,8}, NC_{0 1,0} obtido em triplicata.

Tabela 14. Caracterização da formulação NC₁ e NC₀ por espectroscopia de correlação de fótons, mobilidade eletroforética e potenciômetro (\pm dp).

Tabela 15. Distribuição granulométrica da lactose nebulizada e nanocápsulas secas por via seca (em μ m) por difratometria de laser (\pm dp).

Tabela 16. Valores de pH das formulações semissólidas: g_{OMC} (gel contendo OMC livre), g_{NC0} (gel contendo a suspensão NC₀), g_{NC1} (gel contendo a suspensão de NC₁), g_{NC0s} (gel contendo a formulação pulverulenta NC_{0 s}), g_{NC1s} (gel contendo a formulação pulverulenta NC_{1 s}) (\pm dp).

Tabela 17. Coeficientes de regressão referentes aos modelos matemáticos que descrevem os comportamentos plástico e pseudoplástico das formas semissólidas g_{OMC}, g_{NC0} e g_{NC0s}, g_{NC1}, g_{NC1s}.

Tabela 18. Parâmetros cinéticos (coeficiente de correlação r, modelo do critério de seleção MSC, constante da velocidade de degradação K, tempo de meia-vida $t^{1/2}$) do

efeito das formulações fotoprotetoras g OMC, g NC0, g NC1, g NC0s, g NC1s na fotodegradação do resveratrol.

Tabela 19. Temperatura de fusão das matérias primas/ misturas ou suspensões obtidas durante o ciclo de aquecimento e resfriamento

Tabela 20. Absorbância das formas semissólidas g OMC, g NC0, g NC1 em comprimento de onda de 225 ou 310 nm por espectrofotometria.

Tabela 21. Características físico-químicas das formulações NC₂, NC₃ e NC₄ obtidas por mobilidade eletroforética e potenciometria (\pm dp).

Tabela 22. Doseamento dos filtros solares encapsulados.

Tabela 23. Valores de pH das formulações semissólidas g OMC, g OMC-OCT-BMT, g NC₂, g NC₃ e g NC₄ (\pm dp).

Tabela 24. Coeficientes de regressão referentes aos modelos matemáticos que descrevem os comportamentos plástico e pseudoplástico das formas semissólidas g OMC-OCT-BMT, g NC₂, g NC₃ e g NC₄.

Tabela 25. Parâmetros cinéticos (coeficiente de correlação r, modelo do critério de seleção MSC, constante cinética k, tempo de meia-vida $t^{1/2}$) do efeito das formulações fotoprotetoras g OMC-OCT-BMT, g NC₁, g NC₂, g NC₃, g NC₄, na fotodegradação do resveratrol.

Tabela 26. Análise de variância (ANOVA) da linearidade do método para quantificar o OMC a partir das nanocápsulas e nanocápsulas secas.

Tabela 27. Precisão inter-dia, intra-dia (CV) e recuperação do OMC das suspensões de nanocápsulas e recuperação das suspensões de nanocápsulas contendo 1mg/mL (NC_{0 1,0}).

Tabela 28. Precisão inter-dia, intra-dia (CV) e recuperação do OMC das suspensões de nanocápsulas contendo 4,8 mg/mL (NC_{0 4,8}).

Tabela 29. Precisão inter-dia, intra-dia (CV) e recuperação do OMC das nanocápsulas secas (NC_{0 s} e NC_{1 s}).

Tabela 30. Precisão inter-dia, intra-dia (CV) e recuperação do OMC das suspensões de nanocápsulas contendo 1mg/mL (NC₁).

Tabela 31. Análise de variância (ANOVA) da linearidade do método analítico para quantificar o OMC nas camadas da pele.

Tabela 32. Exatidão da extração do OMC da pele suína e fita adesiva Scott[®] na concentração de 0,1 μ g/mL.

Tabela 33. Exatidão da extração do OMC da pele suína e fita adesiva Scott[®] na concentração de 0,75 μ g/mL.

Tabela 34. Exatidão da extração do OMC da pele suína e fita adesiva Scott[®] na concentração de 1 µg/mL.

Tabela 35. Análise de variância (ANOVA) da linearidade do método para quantificação do OMC no meio receptor.

Tabela 36. Análise de variância (ANOVA) da linearidade do método para quantificação do OMC.

Tabela 37. Análise de variância (ANOVA) da linearidade do método para quantificação da OCT.

Tabela 38. Análise de variância (ANOVA) da linearidade do método para quantificação do BMT.

Tabela 39. Precisão inter-dia, intra-dia (CV) e recuperação do OMC das suspensões de nanocápsulas NC₄.

Tabela 40. Precisão inter-dia, intra-dia (CV) e recuperação da OCT das suspensões de nanocápsulas NC₄.

Tabela 41. Precisão inter-dia, intra-dia (CV) e recuperação do BMT das suspensões de nanocápsulas NC₄.

Tabela 42. Exatidão da extração do OMC e OCT da pele suína e fita adesiva Scott[®] na concentração de 1 µg/mL (CV) e recuperação (média±dp).

Tabela 43. Exatidão da extração do BMT da pele suína e fita adesiva Scott[®] na concentração de 0,5 µg/mL (CV) e recuperação (média±dp).

Tabela 44. Exatidão da extração do OMC e OCT da pele suína e fita adesiva Scott[®] na concentração de 3 µg/mL (CV) e recuperação (média±dp).

Tabela 45. Exatidão da extração do BMT da pele suína e fita adesiva Scott[®] na concentração de 1,5 µg/mL (CV) e recuperação (média±dp).

Tabela 46. Exatidão da extração do OMC e OCT da pele suína e fita adesiva Scott[®] na concentração de 5 µg/mL (CV) e recuperação (média±dp).

Tabela 47. Exatidão da extração do BMT da pele suína e fita adesiva Scott[®] na concentração de 2,5 µg/mL (CV) e recuperação (média±dp).

Tabela 48. Análise de variância (ANOVA) da linearidade do método para quantificação do OMC no meio receptor em fase móvel contendo acetonitrila: metanol (1:1).

Tabela 49. Análise de variância (ANOVA) da linearidade do método para quantificação do OCT no meio receptor em fase móvel contendo acetonitrila: metanol (1:1).

Tabela 50. Análise de variância (ANOVA) da linearidade do método para quantificação do BMT no meio receptor em fase móvel contendo acetonitrila: metanol (1:1).

Tabela 51. Composição da suspensão de OMC não-nanotecnológica (L).

Tabela 52. Composição de suspensão de nanocápsulas (N).

Tabela 53. Tamanho de partícula e índice de polidispersão da composição nanotecnológica ($\pm dp$) obtido obtidos por espectroscopia de correlação de fótons.

SUMÁRIO

RESUMO _____ **iv**

ABSTRACT _____ **v**

LISTA DE FIGURAS _____ **viii**

LISTA DE TABELAS _____ **xiv**

1. INTRODUÇÃO _____ **1**

2. JUSTIFICATIVA _____ **5**

3. OBJETIVOS _____ **7**

4. REVISÃO DE LITERATURA _____ **9**

4.1. Biologia da pele _____ **10**

4.2. Efeitos da radiação solar sobre a pele _____ **11**

4.3. Envelhecimento cutâneo _____ **12**

4.4. Fotoprotetores e filtros solares _____ **14**

4.4.1. Filtro solar fotoinstável: metoxicinamato de octila _____ **17**

4.4.2. Filtros solares orgânicos fotoestáveis: octiltriazone e bemotrizinol	18
4.5. Sistemas nanoestruturados	20
4.5.1. Avaliação da eficácia de sistemas nanoestruturados contendo filtros solares	21
4.5.1.1 Aumento da fotoestabilidade de filtros solares	21
4.5.1.2 Estudos de penetração/permeação cutânea e capacidade fotoprotetora	23
4.6. Secagem de nanocápsulas por aspersão	26
5. MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1.1. Matérias-primas	29
5.1.2. Solventes	29
5.1.3. Equipamentos	29
5.1.4 Materiais	30
5.2. Métodos	30
5.2.1. Teste de inchamento do polímero	30
5.2.2. Preparação das suspensões de nanocápsulas	31
5.2.3. Secagem por aspersão	33
5.2.4. Preparação das formulações semissólidas	34
5.2.5. Caracterização físico-química das formulações	38
5.2.5.1. Difratometria de laser	38
5.2.5.2. Espectroscopia de correlação de fótons	39
5.2.5.3. Potencial zeta	39

5.2.5.4. Determinação do pH	39
5.2.5.5. Avaliação de fenômenos de instabilidade por espalhamento múltiplo de luz	40
5.2.5.6. Rendimento do processo de secagem	40
5.2.5.7. Morfologia das nanocápsulas secas	40
5.2.6. Estabilidade física das suspensões de nanocápsulas NC₂, NC₃ e NC₄	41
5.2.7 Quantificação dos filtros solares	41
5.2.7.1 Doseamento e avaliação da estabilidade química do metoxicinamato de octila contido nas nanocápsulas e nanocápsulas secas	41
5.2.7.2 Doseamento e determinação da eficiência de encapsulação dos filtros solares OMC, OCT e BMT contidos nas suspensões de nanocápsulas	42
5.2.8. Estudo do gradiente de densidade dos nanoingredientes contendo OMC	42
5.2.9. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	43
5.2.10 Avaliação da fotoestabilidade do metoxicinamato de octila encapsulado	44
5.3 Reologia das formulações semissólidas	44
5.4. Avaliação da capacidade fotoprotetora dos hidrogéis	45
5.5. Estudo de penetração cutânea <i>in vitro</i> das formulações semissólidas	46
5.6. Avaliação da capacidade absorptiva das formulações semissólidas	47
5.7. Microscopia eletrônica de varredura de peles suínas tratadas com as formulações semissólidas	48
5.8. Análise estatística	49

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
6.1. Avaliação de diferentes concentrações de metoxicinamato de octila (OMC) no núcleo lipídico das nanocápsulas	51
6.1.1. Inchamento do polímero	51
6.1.2. Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas NC_{0,4,8} e NC_{0,1,0}	53
6.1.3. Doseamento e determinação da estabilidade química das suspensões contendo OMC	58
6.2. Avaliação da inserção de triglicerídeos de cadeia média (TCM) no núcleo da formulação NC₀	60
6.2.1. Caracterização físico-química	60
6.2.2. Caracterização das formulações pulverulentas preparadas a partir de NC₀ e NC₁	63
6.2.3. Estudo do gradiente de densidade de nanocápsulas, nanoemulsão e nanoesferas contendo OMC	66
6.2.4. Avaliação da fotoestabilidade do OMC nanoencapsulado	68
6.2.5. Caracterização das formas semissólidas	73
6.2.6. Reologia das formulações semissólidas	79
6.2.7. Avaliação da capacidade fotoprotetora	82
6.2.8. Avaliação da penetração cutânea dos semissólidos contendo OMC	83
6.2.9. Calorimetria exploratória diferencial	89
6.2.10. Avaliação da capacidade absorptiva das formas semissólidas	91
6.2.11. Avaliação de pele suína tratada com os semissólidos com exposição à radiação UVB	93

6.3. Avaliação da associação de filtros solares à formulação NC₁	97
6.3.1. Caracterização das formulações NC₂, NC₃ e NC₄	97
6.3.2. Avaliação da estabilidade das suspensões de nanocápsulas contendo filtros solares	101
6.3.3. Doseamento e eficiência de encapsulação dos filtros solares OMC, OCT e BMT contidos nas nanocápsulas	104
6.3.4. Caracterização das formas semissólidas	105
6.3.5. Reologia das formulações semissólidas	109
6.3.6. Avaliação da capacidade fotoprotetora	111
6.3.7. Avaliação de penetração cutânea das formulações	112
6.3.8. Capacidade absorptiva dos hidrogéis	121
6.3.9 Avaliação de peles suínas tratadas com os semissólidos	123
7.CONCLUSÃO	125
7. REFERÊNCIAS	129
7.ANEXOS	142
ANEXO I- Validação de metodologia analítica para quantificação do metoxicinamato de octila das formulações NC₀ e NC₁	143
ANEXO II- Validação de método para estudo de penetração cutânea do OMC a partir dos géis g OMC, g NC₀, g NC₁, g NC_{0s}, g NC_{1s} e g OMC s.	147

ANEXO III- Validação de metodologia analítica para quantificação dos filtros metoxicinamato de octila, octiltriazona e bemotrizinol das formulações NC₂, NC₃ e NC₄. _____ 151

ANEXO IV- Validação de método para estudo de penetração cutânea do metoxicinamato de octila, octiltriazona e bemotrizinol das formulações g_{OMC-OCT-BMT} e g_{NC4}. _____ 156

ANEXO V- Relatório de patente _____ 162

1. INTRODUÇÃO

A pele constitui o maior órgão do corpo humano (RIBEIRO, 2010; SHAAT, 2005), sendo esse o primeiro contato do nosso organismo com o meio externo. O seu pH ácido, decorrente da presença de aminoácidos e ácido láctico, complementa o efeito barreira, auxiliando na proteção contra micro-organismos e agentes químicos (BUTLER, 2000). Adicionalmente, a pele também possui terminações nervosas que convertem o seu contato com o meio externo em sensações de toque, pressão, dor e temperatura (SHAI et al., 2009; RIBEIRO, 2010).

A pele está dividida em epiderme, derme e hipoderme. A epiderme, a camada mais externa da pele, subdivide-se em camada córnea, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal (RIBEIRO, 2010). A camada córnea, a mais externa da epiderme, formada por células mortas e queratinizadas denominadas de corneócitos (SHAI et al., 2009), constitui a principal barreira à penetração de substâncias na pele (KALIA; GUY, 2001). Na epiderme, além dos corneócitos, estão também presentes os melanócitos. Esses têm por função produzir a melanina, substância que protege a pele dos danos provocados pela radiação ultravioleta (BUTLER, 2000) através da difração ou reflexão dessas radiações. A derme, por sua vez, é o tecido situado logo abaixo da epiderme, tendo como função fornecer o aporte nutricional. Nessa camada estão presentes as fibras de colágeno e elastina, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas dispersas na substância fundamental. Os fibroblastos, as principais células da derme, são responsáveis pela produção de substância fundamental e de colágeno. Abaixo da derme há ainda a hipoderme, formada por tecido adiposo, atuando como reservatório de energia e como isolante térmico em situações de baixas temperaturas (SHAI et al., 2009).

O envelhecimento cutâneo é um processo complexo, multifatorial, associado tanto a fatores extrínsecos como também a fatores intrínsecos (FARAGE et al., 2010; RIBEIRO, 2010). Dentre os fatores intrínsecos estão as alterações hormonais (BRINCAT et al., 1983; BRINCAT et al., 1987a; BRINCAT et al., 1987b). Dentre os fatores extrínsecos, estão a radiação ultravioleta e o tabagismo (FARAGE et al., 2010; RIBEIRO, 2010). A radiação ultravioleta provoca o fotoenvelhecimento e caracteriza-se por variadas alterações como: redução do número de queratinócitos, fibroblastos e melanócitos; diminuição na biossíntese de colágeno (RIBEIRO, 2010; SHAAT, 2005) e imunossupressão (AUBIN, 2003). Além desses efeitos, a radiação ultravioleta também

está relacionada com os carcinomas basocelular, espinocelular (RIBEIRO, 2010) e com o melanoma, câncer de pele mais invasivo e responsável por 90% dos óbitos para pacientes com câncer de pele (GARBE et al., 2010).

Os fotoprotetores passaram a ter papel fundamental na prevenção dos efeitos colaterais causados pela exposição à radiação ultravioleta, sendo o primeiro fotoprotetor comercializado no ano de 1928, contendo salicilato de benzila e cinamato de benzila (LIM; DRAELOS, 2009). Essas preparações de uso tópico têm como objetivo proteger a pele contra a radiação ultravioleta A e B, através da absorção, dispersão ou reflexão da luz. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável por estipular as concentrações máximas de uso, em preparações farmacêuticas, para os diferentes tipos de filtros solares disponíveis no mercado, bem como autorizar e fiscalizar a produção e comercialização destes (BRASIL, 2006).

Entre as aplicações descritas para os sistemas nanoparticulados poliméricos na literatura, está o carreamento de ativos para uso tópico, incluindo os filtros solares (WEISS-ANGELI et al., 2008; JIMÉNEZ et al., 2004; PAESE, 2008, LUPPI et al., 2004; OLVERA-MARTÍNEZ et al., 2005). Esses podem propiciar uma liberação sustentada dos ativos, permitindo que os mesmos permaneçam mais tempo na superfície da pele (JIMÉNEZ et al., 2004). As suspensões aquosas de nanopartículas são sistemas que apresentam poucos fenômenos de instabilidade físico-químicos, sendo considerados na maioria das vezes sistemas altamente estáveis. Por serem sistemas aquosos, contudo, estão sujeitos à contaminação microbiana. Assim, a secagem dessas suspensões permite aumentar a estabilidade (MÜLLER et al., 2000). A técnica de secagem por aspersão tem sido aplicada para suspensões de nanocápsulas, sendo o dióxido de silício coloidal um dos primeiros adjuvantes a ser proposto (MÜLLER *et al.*, 2000, SCHAFFAZICK *et al.*, 2006). Embora esse adjuvante seja hidrofílico, é insolúvel em água, não propiciando características sensoriais agradáveis quando os pós secos com esse adjuvante são incorporados em formas semissólidas (HOFFMEISTER, 2012). Mais recentemente, a utilização dos adjuvantes hidrofílicos, especialmente a lactose, também foi descrita para a secagem de nanopartículas propiciando a obtenção de partículas esféricas com adequada redispersão em água (TEWA-TAGNE et al., 2007).

Diante do exposto, no presente trabalho foram preparadas formulações semissólidas contendo filtros solares encapsulados em nanocápsulas. Como uma primeira estratégia inovadora desse trabalho, foi avaliada a secagem de nanocápsulas com adjuvante hidrofílico, buscando-se obter um pó facilmente incorporável em formulações cosméticas. O metoxicinamato de octila foi empregado como modelo para avaliação do efeito da secagem sobre o comportamento das nanocápsulas como fotoprotetores.

Além disso, outra estratégia consistiu na co-encapsulação dos filtros solares octiltriazona e bemotrizinol juntamente ao metoxicinamato de octila, em nanocápsulas, com intuito de aumentar a capacidade fotoprotetora das formulações desenvolvidas.

2. JUSTIFICATIVA

O metoxicinamato de octila é um filtro solar UVB, que apresenta fotoinstabilidade (PATTANAARGSON et al., 2004) quando exposto à luz, perdendo a sua capacidade de proteção frente à luz ultravioleta. Desta forma, a sua nanoencapsulação permite aumentar a sua fotoestabilidade (PERUGINI et al., 2002; WEISS-ANGELI et al., 2008; VETTOR et al., 2008) e garantir retenção no estrato córneo (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004a; OLVEIRA-MARTINEZ et al., 2005; VETTOR et al., 2010).

As suspensões de nanocápsulas, embora apresentem alta estabilidade física, estão suscetíveis à contaminação microbiana por estarem na forma de suspensão aquosa. Além disso, apresentam maior dificuldade de acondicionamento e transporte em relação às formas sólidas (AULTON, 2005). Sendo assim, a secagem de nanocápsulas, obtendo nanocápsulas secas, visa à obtenção de produtos intermediários com maior aplicação industrial (MÜLLER, 2000).

Adicionalmente, como outra estratégia desse trabalho, foi proposto o desenvolvimento de nanocápsulas que apresentassem maior capacidade de proteção frente à radiação ultravioleta. Para isso, uma combinação inédita de filtros solares nanoencapsulados foi adicionada juntamente com o metoxicinamato de octila, no núcleo oleoso das nanocápsulas. Foram empregados como filtros solares adicionais a octiltriazona, um filtro solar UVB, e bemotrizinol, um filtro solar UVB/UVA; sendo ambos apresentando alto coeficiente de extinção molar (SOUZA, 2013).

A distribuição nas camadas da pele de cada um dos filtros solares, a partir de formulações semissólidas contendo os filtros solares nanoencapsulados ou na sua forma livre, será avaliada através do estudo de penetração cutânea *in vitro*. Esse ensaio foi conduzido com intuito de atender à necessidade dos filtros solares ficarem retidos nas camadas mais externas da epiderme a fim de garantir a efetividade dos fotoprotetores desenvolvidos (JIMENEZ et al., 2004).

Subsequentemente, o estudo da capacidade fotoprotetora também foi realizado, mediante avaliação da capacidade dos semissólidos desenvolvidos em evitar a degradação de uma substância fotolábil. Assim, será possível verificar se as novas formulações desenvolvidas apresentam um melhor desempenho frente às formulações contendo os filtros solares na forma livre.

]

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver, caracterizar e comparar nanoinsumos constituídos de suspensões de nanocápsulas contendo filtros solares quanto à sua performance como fotoprotetores.

3.2. Objetivos Específicos

- Obter suspensões de nanocápsulas contendo somente metoxicinamato de octila ou associação de filtros solares (metoxicinamato de octila, octiltriazona e bemotrizinol);
- Desenvolver nanocápsulas secas;
- Obter formas semissólidas contendo suspensão de nanocápsulas ou pós de nanocápsulas;
- Avaliar a capacidade fotoprotetora das formas semissólidas;
- Avaliar a penetração cutânea *in vitro* das formas semissólidas.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Biologia da pele

A pele constitui 16% do peso corporal e tem por função a proteção contra forças mecânicas (provocadas por pressão ou fricção), perda de água transepidérmica e os raios ultravioleta. Além disso, ainda possui função de regulação através de participação na manutenção da temperatura corporal e síntese de vitamina D ocorre na pele, através da exposição à radiação UVB, (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A epiderme constitui a camada mais externa da pele, e se subdivide nas camadas córnea, granulosa, espinhosa e basal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A camada basal corresponde a camada mais profunda da epiderme, onde há mitose ativa para gerar queratinócitos. A camada espinhosa está localizada acima da camada basal, na qual os queratinócitos são mantidos coesos devido à presença de desmossomos. A camada granulosa, localizada acima da camada espinhosa, é formada por células achatadas contendo grânulos de querato-hialina. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A camada córnea é formada por corneócitos, células anucleadas e queratinizadas, que estão organizadas entre as bicamadas de lipídios. Adicionalmente, nessa camada também está presente o fator de hidratação natural (NMF, do inglês *Natural Moisturizing Factor*). Tanto os lipídios quanto o NMF têm por função proteger a pele da desidratação (SHAI et al., 2009).

A derme é a camada localizada abaixo da epiderme, sendo formada por fibras proteicas de colágeno, elastina e de matriz extracelular. O colágeno é a principal proteína dessa camada, sendo responsável pela propriedade de resistência da pele. A elastina permite que a pele possa voltar ao seu estado original após ocorrência de deformações provocadas por tensão ou pressão (BUTLER, 2000). A matriz extracelular é formada por glicosaminoglicanos (GAGs), glicoproteínas e proteoglicanos. Os GAGs podem ligar-se covalentemente às proteínas, formando proteoglicanos, que têm alta capacidade de reter água (RIBEIRO, 2010). Além disso, na derme estão presentes também os receptores sensoriais e as glândulas sudoríparas e sebáceas. Os receptores sensoriais permitem captar as sensações enquanto as glândulas sudoríparas e sebáceas têm função de produção de suor e sebo, respectivamente (BUTLER, 2000).

Abaixo da derme está localizada a hipoderme, camada de reserva energética, composta por adipócitos, proporcionando ação isolante contra o frio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

4.2. Efeitos da radiação solar sobre a pele

O espectro de ondas eletromagnéticas é composto pelos raios gama, raios-X, raios ultravioleta, visível, infravermelho, microondas e ondas de rádio. Essas são definidas como oscilações de campos elétricos e magnéticos que se propagam através do espaço provocando perturbações em um meio, com transporte de energia (HARVEY, 2000). Elas apresentam um comprimento de onda próprio, sendo esse definido como a distância entre dois vales (ponto mais baixo da onda) ou duas cristas (ponto mais alto da onda). A energia que uma determinada onda eletromagnética apresenta está relacionada com o seu comprimento de onda (HARVEY, 2000; HALLIDAY et al., 2006). O espectro solar corresponde às radiações ultravioleta, infravermelho e luz visível. Embora a radiação ultravioleta corresponda a apenas 5% da radiação solar terrestre, essa é a principal responsável por danos ao DNA (YOON et al., 2000), peroxidação lipídica (BOSE et al., 1989) e câncer de pele (URBACH, 1997).

A radiação ultravioleta que se estende de 100 a 400 nm (KALSI, 2004). A sua subdivisão em UVA, UVB e UVC foi proposta pela primeira vez em um congresso Internacional da Luz, em 1932 (COBLENTZ, 1932). A radiação UVA se estende de 320-400 nm, UVB de 290-320 nm e UVC 100-290 nm. Adicionalmente, a radiação UVA foi mais recentemente dividida em UVA-I (340-400 nm) e UVA-II (320-340 nm) (LIM et. al., 2007). A radiação UVC é absorvida pela camada de ozônio (RIBEIRO, 2010; SHAATH, 2005; GILCHREST; KRUTMANN, 2006). Devido ao seu comprimento de onda baixo, essa radiação é altamente genotóxica, mutagênica e carcinogênica (BUTLER, 2000).

A radiação UVB é responsável pelo desenvolvimento de inflamação, eritema e pigmentação da pele (TAKIWAKI et al., 1994). Além disso, é absorvida pelo DNA, podendo ocasionar o surgimento de células com mutações as quais, posteriormente, podem provocar câncer (ZIEGLER et al., 1993; BRASH et al., 1991). A radiação UVA,

diferente da UVB, a qual só penetra até a epiderme, é capaz de uma penetração mais profunda na pele, atingindo a derme (GILCHREST; KRUTMANN, 2006). A radiação UVA curta, assim como a radiação UVB, pode ocasionar o aparecimento de mutações celulares (PERSSON et al., 2002). Por sua vez, a radiação UVA longa é absorvida por cromóforos endógenos, como o ácido urocânico dando origem a radicais livres (MENON; MORRISON, 2002).

A luz visível compreende o espectro eletromagnético com λ entre 400 e 800 nm (KALSI, 2004). Dentre os efeitos relatados na pele por essa radiação estão: eritema (ROTTIER; VAN DER LEUN, 1960), geração de radicais livres (HAYWOOD, 2006) (que levam a danos ao DNA), além de pigmentação imediata da pele (DARVIN et al., 2010). Em estudo em pele humana irradiada com UVA e visível, verificou-se que a geração de dano no DNA não ocorre por absorção da radiação pelo DNA, mas por agentes fotossensibilizantes, que geram a espécie reativa de oxigênio singlete (KVAN; THYRRELL, 1997).

Por sua vez, a radiação infravermelha (IV) possui comprimentos de onda que se estendem de 400 a 4000 nm (PAVIA et al., 2001). Essa se subdivide em: IV-A (760 a 1440 nm), IV-B (1440 a 3000 nm) e IV-C (maior que 3000 nm). A radiação IV-A e IV-B penetram até a derme enquanto que a radiação IV-C é absorvida pela epiderme (GILCHREST; KRUTMANN, 2006). Em estudo com fibroblastos humanos, após irradiação no infravermelho próximo, verificou-se também um aumento na expressão de enzimas metaloproteinases, que provocam degradação das proteínas da matriz extracelular colágeno e elastina (SCHIEKE et al., 2002).

4.3. Envelhecimento cutâneo

O envelhecimento cutâneo é um processo de alterações morfológicas e fisiológicas na pele, sendo afetado por programação genética (fatores intrínsecos) e fatores ambientais (fatores extrínsecos). O envelhecimento intrínseco caracteriza-se pelo envelhecimento genético dependente do encurtamento dos telômeros (GILCHREST; KRUTMANN, 2006; LIM et al., 2007; FARAGE et al., 2010). Os telômeros são definidos como a porção terminal dos cromossomos, que tem por função impedir a

perda de seqüências codificantes importantes nos cromossomos. À medida que as divisões celulares vão ocorrendo, ocorre também o encurtamento dos telômeros (LIM et al., 2007; GILCHREST; KRUTMANN, 2006). O encurtamento acaba por provocar a interrupção celular (apoptose), desencadeando uma depleção celular (GILCHREST ; KRUTMANN, 2006). Assim, os telômeros atuam como relógios biológicos, distinguindo células velhas de células jovens (LIM et al., 2007). Além dessa característica, ocorre também a redução da sensibilidade ao toque, pressão, dor, calor e alteração da função barreira da pele com o envelhecimento (TSUTSUMI ; DENDA, 2007). Adicionalmente, no envelhecimento há redução da capacidade da pele em produzir a vitamina D, a qual protege as células humanas da apoptose ou da morte celular provocada pela radiação UVB (DE HAES et al., 2003).

No envelhecimento extrínseco são gerados radicais livres (YASUI & SAKURAI, 2003) como conseqüência da exposição à radiação UV. No DNA, as bases pirimidinas são capazes de absorver a radiação UVB, originando dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD), que se caracterizam pela presença de uma ligação entre a posição 5 e 6 das pirimidinas (YOON et al., 2000). Por ação da radiação UVA, pode ocorrer oxidação da guanina, formando 8-oxo-guanina (8-oxo) (HATTORI et al., 1996), podendo levar ao desenvolvimento de mutações celulares e câncer (KUNISADA et al., 2005) . Dentre os cânceres de pele, 90% dos carcinomas de células escamosas e mais de 50% dos carcinomas basais ocorrem em decorrência da inativação/mutação de seqüência do gene-chave p53 (BRASH et al., 2000).

As radiações UVA e UVB também induzem a ativação de fatores de transcrição que por sua vez induzem um aumento da atividade de metaloproteinases (MMP), enzimas que clivam proteínas da matriz extracelular como o colágeno e elastina, contribuindo para as alterações na derme observadas no fotoenvelhecimento (SCHARFFETTER et al., 1991; PETERSEN et al., 1992; KOIVUKANGAS et al., 1994).

4.4. Fotoprotetores e filtros solares

Inicialmente, o desenvolvimento de fotoprotetores tinha por objetivo proteger a pele somente contra a radiação UVB. Contudo, visto que também existe uma alta exposição ao longo do dia à radiação UVA, e conhecidos os seus efeitos no fotoenvelhecimento, tornou-se necessário o desenvolvimento de fotoprotetores com proteção também frente à radiação UVA. Por esta razão, os fotoprotetores passaram a ter ação sobre ambos os tipos de radiação (LIM et al., 2007). Esse tipo de formulação é constituído de agentes tensoativos, emolientes, umectantes, conservantes, antioxidantes, corantes, fragrâncias e filtros solares em um determinado veículo, que pode ser um creme, gel, loção, aerossol (SHAATH, 2005).

Os filtros solares são as substâncias responsáveis pelos efeitos protetores conferidos pelo fotoprotetor. Quando depositados sobre a pele, eles absorvem ou refletem a radiação incidente (RIBEIRO, 2010). Esses são classificados em filtros inorgânicos e orgânicos e tem sido amplamente utilizados com intuito de prevenir os efeitos prejudiciais da radiação ultravioleta na pele. Entre os filtros inorgânicos estão o dióxido de titânio e óxido de zinco. Esses atuam refletindo ou dispersando a luz que incide sobre eles. Ademais, eles também são capazes de absorver a radiação; o óxido de zinco absorve toda radiação UVB e UVA e o dióxido de zinco absorve a radiação UVB. Esses agentes são apresentados na forma de pigmentos (partículas com aproximadamente 230 nm de diâmetro, capazes de espalhar luz visível) e na forma micronizada (partículas primárias com aproximadamente 60 nm de diâmetro, capazes de espalhar luz ultravioleta). A utilização nesta última forma permite aumentar a área superficial, garantindo maior cobertura e maior eficiência na proteção ultravioleta, além de evitar o branqueamento ocasionado pela dispersão e reflexão da luz (RIBEIRO, 2010).

Os filtros orgânicos são agentes que apresentam como estrutura química cromóforos capazes de absorver a radiação UVA e/ou UVB. A efetividade dos filtros orgânicos está relacionada ao coeficiente de extinção molar, o qual se refere à quantidade de radiação que um mol do filtro solar é capaz de absorver em um determinado comprimento de onda. Assim, quanto maior o coeficiente de extinção molar, mais eficiente é o filtro na absorção da radiação UV (SHAATH, 2005).

O mecanismo de ação dessas moléculas se baseia na absorção da radiação UV pelos filtros solares, através de um mecanismo de deslocalização de elétrons. A estrutura química dessas moléculas é constituída de um composto aromático conjugado a uma ligação dupla ou a um grupo acceptor de elétrons e, ainda, um grupo doador de elétrons (amina, metoxila ou hidroxila) (SHAATH, 2005). Em filtros solares apresentando grupamentos para-substituídos (Figura 1), há ligação dupla conjugada ao grupamento aromático, enquanto que em filtros solares orto-substituídos (Figura 1), há um grupo acceptor de elétrons conjugado ao grupamento aromático (SHAATH, 2005). Com a absorção de energia, o filtro passa para um estado excitado, havendo passagem dos elétrons do orbital HOMO (orbital molecular preenchido de mais alta energia) para o orbital LUMO (orbital molecular vazio de mais baixa energia). Com o retorno para o estado fundamental, a energia é liberada na forma de radiação infravermelha ou calor, que apresenta energia menor que a inicial, fazendo com que haja retorno dos elétrons para o orbital HOMO (FLOR et al.,2007).

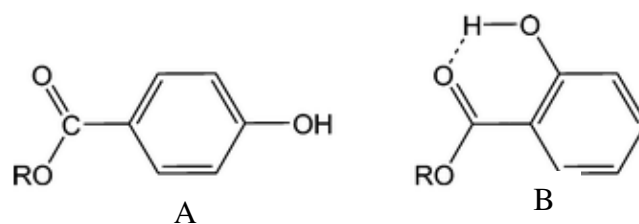


Figura 1. Moléculas com substituição para (A) e orto (B). Fonte: SHAATH, 2010.

No exemplo da Figura 2 está demonstrada a deslocalização de elétrons nos cinamatos, os quais apresentam na sua estrutura química um grupo aromático conjugado a uma ligação dupla e uma metoxila como doador de elétrons (SHAATH, 2005).

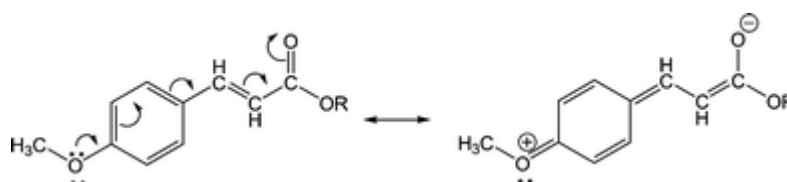


Figura 2. Deslocalização de elétrons nos cinamatos. Fonte: SAATH, 2010.

Além disso, a presença de grupamentos orto ou para-substituídos também influencia no comprimento de onda máximo de absorção do filtro solar (Figura 1).

Moléculas com grupamentos orto permitem a formação de pontes de hidrogênio dentro da própria molécula, reduzindo a energia requerida para a delocalização dos elétrons. Uma vez que o comprimento de onda é inversamente proporcional à energia, é possível o aumento no comprimento de onda de absorção do filtro. Os salicilatos, benzofenonas, antranilato, bemotrizinol se enquadram nessa situação. Por sua vez, em filtros solares para-substituídos, como o metoxicinamato de octila, não é possível a formação interna de pontes de hidrogênio, o que acaba acarretando em uma maior energia para a delocalização de elétrons e menor comprimento de onda de absorção, em relação à filtros solares orto-substituídos (SHAATH, 2005).

Os filtros orgânicos são classificados de acordo com a sua estrutura química em: PABA e derivados, cinamatos, salicilatos, benzimidazóis, derivados do benzidileno cânfora, benzofenonas, derivados do benzotriazolil, derivados da triazona, derivados de dibenzoilmetano. A Tabela 1 apresenta esses filtros, seus espectros de ação e principais representantes (RIBEIRO, 2010; SHAATH, 2005).

Tabela 1. Classificação dos filtros solares orgânicos, espectro de ação e representante (RIBEIRO, 2010; SHAATH, 2005).

Classe	Espectro de ação	Representante
PABA e derivados	UVB	Ácido para-aminobenzóico (PABA)
Cinamatos	UVB	Metoxicinamato de octila
Salicilatos	UVB	Salicilato de octila
Benzimidazóis	UVB	Ácido fenil benzimidazol sulfônico
Derivados do benzidileno cânfora	UVA	Mexoryl SX [®] (ecamsule)
Benzofenonas	UVB/UVA-II	Benzofenona-3
Derivados do benzotriazolil	UVA	Tinosorb M [®] (bizotrizole)
Derivados da triazona	UVA/UVB	Tinosorb S [®] (bemotrizinol)
Derivados de dibenzoilmetano	UVA-I	Avobenzona

A associação de diferentes filtros solares, sejam eles inorgânicos ou orgânicos, é realizada com intuito de aumentar o fator de proteção solar (FPS) de um produto final (RIBEIRO, 2010). No entanto, no desenvolvimento é necessário que o formulador conheça as incompatibilidades que existem entre filtros solares (SHAATH, 2005).

A fotoestabilidade é um fator importante em filtros solares, pois se refere à capacidade que um filtro tem de resistir à degradação provocada pela radiação ultravioleta, luz visível e calor. O desenvolvimento de filtros solares estáveis é importante, pois preserva a capacidade de proteção ultravioleta que apresentam. Quando o filtro é fotoinstável ocorre uma modificação estrutural e ele perde a sua capacidade de absorver a radiação ultravioleta (SHAATH, 2005; LIM et al., 2007). Ainda, durante a produção de uma formulação fotoprotetora, é necessário evitar que o filtro solar, quando na sua forma excitada, interaja com outras moléculas provenientes da pele ou da formulação, evitando, assim, a ocorrência de fotoreatividade (LIM et al., 2007). O teste de fotoestabilidade de filtros solares é realizado mediante irradiação da formulação com uma fonte de energia (simulador solar, lâmpadas ultravioleta ou de arco de xenônio). A dose de energia é expressa na forma de dose eritematosa mínima, ou seja, aquela dose mínima de energia capaz de provocar a formação de eritema quando incidente sobre a pele humana. A quantidade de filtro solar remanescente na formulação após a irradiação é determinada por métodos como cromatografia líquida, cromatografia gasosa acoplado a detector de espectrometria de massas e cromatografia com fluido supercrítico (SALVADOR; CHISVERT, 2007).

4.4.1. Filtro solar fotoinstável: metoxicinamato de octila

O metoxicinamato de octila (OMC) (Figura 3), pertencente à classe dos cinamatos, é um filtro solar orgânico UVB, com espectro de ação entre 280-320 nm (PATTANAARGSON et al., 2004). É um líquido amarelo claro ou incolor, insolúvel em água, com peso molecular de 290,40 g mol⁻¹ e fórmula química C₁₈H₂₆O₃ (SWEETMAN, 2009). A sua nomenclatura, de acordo com o INCI (Nomenclatura Internacional de Cosméticos) é *Ethylhexyl Methoxycinnamate* e de acordo com a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) é *p-methoxycinnamic acid 2-2-ethylhexyl-ester* (SWEETMAN, 2009). Esse filtro apresenta alto coeficiente de extinção molar (24.000 mol⁻¹ cm⁻¹), com absorção máxima em 310 nm (PATTANAARGSON et al., 2004).

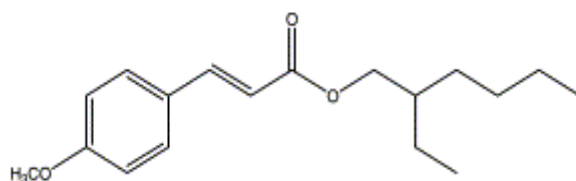


Figura 3. Estrutura química do octil- para-metoxi-trans-cinamato. Fonte: PATTANAARGSON al., 2004.

O metoxicinamato de octila, na forma trans (E-OMC) apresenta fotodegradação em presença de luz solar, formando o isômero cis (Z-OMC) (Figura 4). Esta isomerização leva à perda de atividade fotoprotetora, com redução do coeficiente de extinção molar para $12.600 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e redução do comprimento de onda de absorção máxima para 301 nm (PATTANAARGSON et al., 2004).

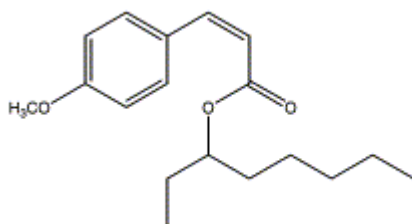


Figura 4. Estrutura química do octil- para-metoxi-cis-cinamato. Fonte: PATTANAARGSON et al., 2004).

4.4.2. Filtros solares orgânicos fotoestáveis: octiltriazona e bemotrizinol

A octiltriazona (OCT) (Figura 5) é um filtro solar UVB (SOUZA & JUNIOR, 2013), apresentando massa molar de $823,09 \text{ g mol}^{-1}$ com estrutura química de $\text{C}_{48} \text{H}_{66} \text{N}_6 \text{O}_6$ (BASF, 2001). A absorção máxima está em 314 nm e coeficiente de extinção molar de $119.500 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Apresenta efeitos sinérgicos com outros filtros solares, especialmente aqueles com ação UVA (SOUZA; JUNIOR, 2013).

No estudo desenvolvido por Herzog e colaboradores (2009), foi avaliada a fotoestabilidade da octiltriazona em simulador solar, a partir de uma solução de

triglicerídeos de cadeia média contendo 4% de octiltriazona. Após aplicação de 5 e 10 doses eritematosas mínimas (MED) em estudo *in vitro*, obteve-se recuperação próxima a 100%, indicando a sua fotoestabilidade.

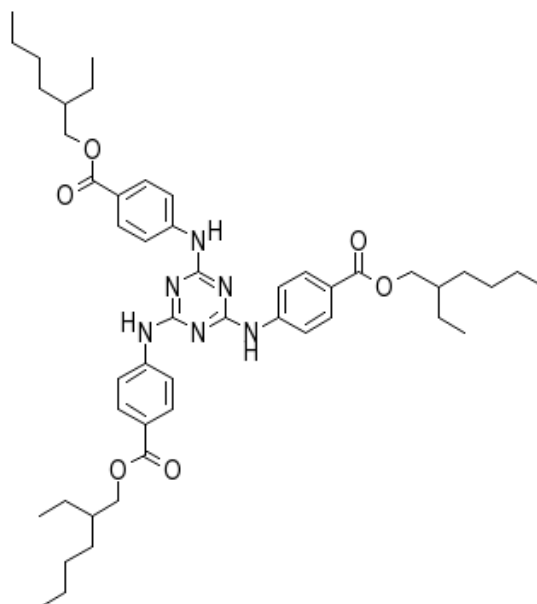


Figura 5. Estrutura química da octiltriazona. Fonte: BASF, 2001.

O bemotrizinol (BMT) (Figura 6) é um filtro solar de amplo espectro UVA/UVB, com massa molar de $627,8 \text{ g mol}^{-1}$ e estrutura química $\text{C}_{38} \text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_5$ (BASF, 2011). Apresenta absorção máxima nos comprimentos de onda de 310 e 343 nm, com coeficientes de extinção molar de $46.800 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $51.900 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Possui efeito sinérgico com outros filtros, estabilizando aqueles que agem sobre a radiação UVB e propicia a obtenção de formulações com alto FPS (SOUZA & JUNIOR, 2013). Em estudos que avaliaram seu desempenho, após aplicação de diferentes doses de radiação (após 50 MED), obteve-se recuperação desse filtro solar maior que 98%, indicando que o filtro solar é muito fotoestável (RUIZ, 2000).

No estudo de Chatelain e Gabard (2001) foram preparadas formulações diferentes contendo os filtros solares OMC, avobenzona e BMT. Essas formulações foram submetidas a um estudo de fotoestabilidade em simulador ultravioleta com irradiação equivalente a 30 MED. Nas formulações que continham BMT, observou-se prevenção

da fotodegradação dos filtros solares avobenzona e OMC. Na avaliação da formulação contendo os três filtros solares, o efeito fotoprotetor do BMT foi concentração dependente. O emprego de maior concentração de BMT mostrou maior efetividade em evitar a degradação do OMC e avobenzona. Portanto, esses dados demonstram que o BMT pode ser empregado para evitar a degradação do OMC e avobenzona, possibilitando a obtenção de formulações mais eficazes.

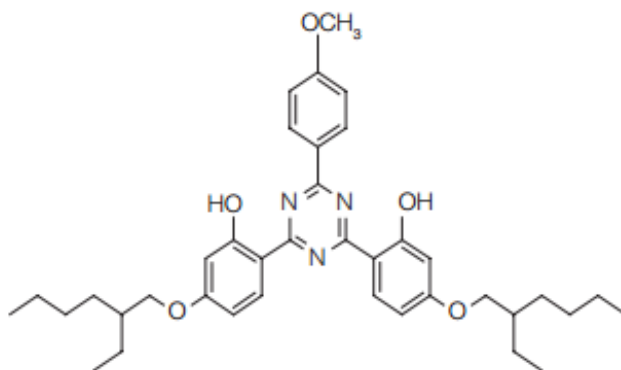


Figura 6. Estrutura química do bemotrizinol. Fonte: BASF, 2011.

4.5. Sistemas nanoestruturados

A nanotecnologia é definida como a caracterização, o desenvolvimento, a produção e a aplicação de estruturas ou dispositivos na escala nanométrica (PCAST, 2005). Na cosmetologia, diferentes sistemas nanométricos são utilizados para veiculação de ativos, como: sistemas vesiculares, emulsões e sistemas particulados (PATRAVALE; MADAWGADE, 2008). Os sistemas vesiculares incluem os lipossomas e os niossomas; as emulsões incluem as microemulsões e as nanoemulsões; por sua vez os sistemas particulados incluem as microparticulas, as nanoparticulas e as ciclodextrinas (PATRAVALE; MADAWGADE, 2008).

As nanopartículas poliméricas são definidas como sistemas coloidais que incluem nanoesferas e nanocápsulas. As nanocápsulas são estruturas do tipo parede-núcleo, sendo que a substância ativa, na forma líquida, sólida ou na forma de dispersão molecular, pode estar dispersa no núcleo, na parede ou em ambos (MORA-HUERTAS, et al.; 2010 OLIVEIRA et al., 2012). Estes sistemas de liberação têm sido aplicados em

cosméticos com intuito de, aumentar a fotoestabilidade (PERUGINI et al. 2002; WEISS-ANGELI et al., 2008; HANNO et al., 2012), aumentar a efetividade de filtros solares (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004a, ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004b; WEISS-ANGELI et al., 2010; PAESE, 2008; VETTOR et al., 2010) e permitir a liberação controlada e prolongada do ativo (SCHAFFAZICK et al., 2006; HOFFMEISTER et al., 2012).

4.5.1 Avaliação da eficácia de sistemas nanoestruturados contendo filtros solares

4.5.1.1 Aumento da fotoestabilidade de filtros solares

A fotoestabilização dos filtros solares constitui um assunto relevante no desenvolvimento de fotoprotetores (LIM et al., 2007). Nesse contexto, estudos têm demonstrado que o emprego da nanotecnologia em formulações fotoprotetoras é capaz de aumentar a estabilidade dos filtros solares mais fotoinstáveis e assim obter formulações mais efetivas (PERUGINI et al., 2002; WEISS-ANGELI et al., 2008; HANNO et al., 2012; NICULAE et a., 2012; NICULAE et a., 2013).

Em estudo realizado por Perugini e colaboradores (2002), verificou-se que carreadores poliméricos diferentes podem influenciar na fotoestabilidade do filtro solar encapsulado. Neste trabalho, loções contendo nanopartículas de OMC foram preparadas a partir dos polímeros etilcelulose ou poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA). Os semissólidos contendo as nanopartículas de PLGA foram capazes de reduzir a degradação em 38,3% do filtro em comparação com a loção contendo OMC livre ou a emulsão contendo nanopartículas brancas. No entanto, a loção contendo nanopartículas de etilcelulose não foi capaz de reduzir significativamente a degradação do OMC em comparação com loção contendo OMC livre. Os autores atribuíram este resultado à baixa eficiência de encapsulação encontrada para essas nanopartículas.

Em outro estudo desenvolvido por Hanno e colaboradores (2012) foram desenvolvidas nanocápsulas, nanoemulsões e emulsões contendo os filtros solares OMC e avobenzona isolados, associados ou combinados com α -tocoferol. No estudo de fotoestabilidade, verificou-se que quando os filtros solares foram encapsulados isolados

(contendo somente OMC ou avobenzona) ou associados (contendo ambos os filtros), a fotodegradação foi 50% menor para nanocápsulas em relação às nanoemulsões e às emulsões (contendo os filtros na forma livre). O tocoferol, o qual tem sido descrito por aumentar a fotoestabilidade de filtros solares, somente propiciou aumento da estabilidade em formulações de nanoemulsões. Tanto para nanoemulsões contendo os filtros isoladamente ou associados, a degradação foi 10% menor em relação às aquelas nanoemulsões que não continham esse componente. Para nanocápsulas, a adição de tocoferol não possibilitou observar nenhum efeito adicional na estabilização dos filtros, pois a degradação dos filtros quando esses foram encapsulados em nanocápsulas já foi baixa.

Nanopartículas lipídicas contendo butil metoxidibenzoilmetano foram incorporadas em cremes e foi avaliada a capacidade das formulações em absorver a radiação ultravioleta e o fator de proteção UVA, após irradiação. As formulações contendo o filtro solar em nanopartículas sólidas (NLS) apresentaram menor capacidade de absorver a radiação UV em comparação com as formulações contendo o mesmo filtro solar em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN). Esse efeito deve-se à estrutura destas partículas. As NLS apresentam uma estrutura mais organizada, o que favorece a expulsão do filtro solar da matriz lipídica, contribuindo para a redução do fator de proteção UVA. Por sua vez, os CLN, têm uma estrutura menos organizada, o que favorece a acomodação do filtro solar na matriz lipídica. Essa formulação desenvolvida foi capaz de absorver mais de 96% da radiação, mostrando que a nanoencapsulação aumentou a absorção da radiação UV em comparação com a emulsão contendo o filtro na forma livre (NICULAE et al., 2012). Em estudo subsequente deste mesmo grupo de pesquisa, foi avaliada a co-encapsulação de octocrileno e butil metoxidibenzoilmetano em nanopartículas. A fotoestabilidade das formulações em comparação com o creme contendo os filtros na forma livre foi avaliada através da determinação do FPS e no fator de proteção UVA, após irradiação em simulador solar. Os cremes contendo os filtros solares na forma livre tiveram modificação no fator de proteção solar e fator de proteção UVA. Por sua vez, as formulações contendo nanopartículas mantiveram o efeito protetor, especialmente a formulação de carreadores lipídicos nanoestruturados. Essa formulação também apresentou melhor fotoestabilidade que cremes contendo nanopartículas lipídicas sólidas (com os filtros solares encapsulados, na mesma concentração), pela mesma razão descrita acima,

relacionada à estrutura menos organizada dos CLN. Este trabalho demonstra que a co-encapsulação de mais de um filtro solar em nanopartículas é interessante, pois possibilita o aumento da proteção ultravioleta (NICULAE et al., 2013).

4.5.1.2 Estudos de penetração/permeação cutânea e capacidade fotoprotetora

A penetração cutânea pode ocorrer através da difusão pelo estrato córneo ou através de apêndices (folículos pilosos) (ROSEN, 2005). Alvarez-Román e colaboradores (2004b) avaliaram a penetração de nanopartículas de poliestireno através da pele por microscopia confocal. As nanopartículas com menor tamanho de partícula apresentaram acumulação nas aberturas dos folículos pilosos, resultado este relacionado à maior área superficial das partículas.

A influência do grau de substituição do polímero utilizado para a produção das nanopartículas, também já foi relacionado à permeação cutânea. Em um estudo, para a preparação das nanopartículas, foram feitas modificações do álcool polivinílico com ácidos graxos, objetivando desenvolver um polímero lipofílico que fosse capaz de reduzir a permeação do filtro solar benzofenona-3. O álcool polivinílico foi substituído em grau de 40% e 80% com os ácidos graxos ácido palmítico, mirístico, behênico e esteárico. Os autores verificaram que houve maior influência do grau de substituição do polímero do que do substituinte, na absorção percutânea da benzofenona. Nanopartículas preparadas a partir do polímero com menor substituição favoreceram maior permeação cutânea da benzofenona. Por sua vez, aquelas nanopartículas com maior grau de substituição reduziram a absorção percutânea, efeito desejável para fotoprotetores, já que a absorção dos mesmos ocasiona redução da efetividade dos filtros solares (LUPPI et al., 2004).

Alvarez-Román e colaboradores (2004a) verificaram que OMC proveniente de nanopartículas apresentou 3,4 vezes maior retenção no estrato córneo que a emulsão contendo o filtro solar livre. Para explicar o mecanismo desse aumento, foi avaliada a distribuição cutânea de nanopartículas contendo vermelho do Nilo encapsulado, por microscopia confocal. As nanopartículas apresentaram maior penetração nas camadas mais superficiais da pele em comparação com a solução de vermelho do Nilo na forma

livre. Esta distribuição alterada para o vermelho do Nilo encapsulado pode ser devido ao fato de que quando moléculas são encapsuladas em nanopartículas, há aumento da sua atividade termodinâmica, favorecendo o particionamento no estrato córneo. Além disso, em nanopartículas há também aumento da área superficial, que aumenta o contato do ativo encapsulado com essa camada da pele.

A estrutura dos nanocarreadores também tem demonstrado influência na liberação de fármacos através da pele. Alves e colaboradores (2005) verificaram perfis de penetração cutânea diferenciados entre hidrogéis contendo nanocápsulas, hidrogéis contendo nanoesferas e hidrogéis contendo nanoemulsão. Este resultado indicou a influência do polímero e do tipo de carreador na penetração cutânea. Calderilla-Fajardo e colaboradores (2006) prepararam nanocápsulas, nanoemulsões e emulsões contendo metoxicinamato de octila. Nestas formulações, um agente promotor de absorção foi adicionado, o laurato de sacarose. A adição de laurato de sacarose em nanoemulsão aumentou a penetração cutânea, em comparação com nanocápsulas. Esse efeito pode ser explicado pela combinação de dois fatores: o primeiro deve-se ao próprio laurato de sacarose que interage com os lipídios intercelulares facilitando a permeação. O segundo deve-se à nanoemulsão, que por sofrer deformação de seus glóbulos, permite maior penetração. Essa penetração aumentada também foi observada pelo trabalho de Oliveira-Martinez e colaboradores (2005), onde as nanoemulsões possivelmente por apresentarem estrutura menos rígida que as nanocápsulas, ocasionaram uma maior penetração cutânea.

A encapsulação da benzofenona-3 em nanopartículas de poli(ϵ -caprolactona) também demonstrou a vantagem da nanoencapsulação de filtro solar (PAESE, 2008; MARCATO et al., 2011). As formulações semissólidas contendo nanocápsulas propiciaram maior retenção no estrato córneo em comparação com os semissólidos contendo benzofenona-3 na forma livre (PAESE, 2008). Marcato e colaboradores verificaram que houve redução da penetração do filtro solar proveniente de nanocápsulas em 70% e 80%, na epiderme e no meio receptor, respectivamente, em comparação com gel contendo benzofenona-3 na forma livre. Por sua vez, neste mesmo estudo também foi avaliada a penetração cutânea de nanopartículas lipídicas contendo este mesmo filtro solar, não se observando diferença em relação ao filtro solar livre. O FPS apresentado pelas formulações contendo nanopartículas foi maior que aquele

obtido para hidrogel contendo benzofenona-3, o que está relacionado à cristalinidade das partículas, as quais podem espalhar/refletir a radiação UV. Adicionalmente, como é relatada a ocorrência de reações alérgicas à benzofenona-3, a análise da sua alergenicidade é importante. No teste do inchamento de orelha de camundongos, verificou-se que não houve sensibilização cutânea para nenhuma das formulações analisadas (nem mesmo para o gel contendo benzofenona-3 livre) (MARCATO et al., 2011).

Gulbake e colaboradores (2011) prepararam géis contendo oxibenzona nanoencapsulada em nanopartículas lipídicas sólidas. A microscopia confocal foi utilizada para avaliar a localização das formulações na pele. Para isso, foram preparadas duas formulações: creme contendo sonda fluorescente e creme contendo sonda fluorescente encapsulada em nanopartículas. Ambas as formulações foram então aplicadas na pele do dorso de ratos albinos, em quantidade de 2 mg/cm^2 , de forma não-oclusiva. Após 8 horas de contato com a formulação, os animais foram sacrificados. Para a formulação contendo nanopartículas observou-se intensidade de fluorescência no estrato córneo. A formulação contendo a sonda na forma livre mostrou intensidade de fluorescência na epiderme viável. Esse resultado demonstra que estas reduziram a penetração do filtro solar.

Outra maneira de avaliação da efetividade dos fotoprotetores consiste no teste da capacidade fotoprotetora. Em seu trabalho pioneiro, Hommoss (2008) verificou a capacidade fotoprotetora de formulações contendo carreadores lipídicos nanoestruturados, através da determinação da quantidade de beta-caroteno degradada em função do tempo. O creme contendo nanopartículas de avobenzona foi capaz de retardar a degradação do beta-caroteno em 4 vezes em relação ao creme contendo o filtro solar na forma livre, no fim do teste. Nesse mesmo estudo também foi avaliada a fotoproteção conferida por filtros inorgânicos encapsulados em carreadores lipídicos nanoestruturados. Cremes contendo dióxido de titânio nanoencapsulado foram capazes de evitar a degradação do beta-caroteno em três vezes em relação à um creme contendo o filtro na forma livre. Dessa forma, o autor verificou que pelo fato da formulação contendo filtros solares nanoencapsulados reduzir a fotodegradação do beta-caroteno em relação a uma formulação contendo filtro solar na forma livre, a primeira formulação apresentou melhor capacidade fotoprotetora.

4.6. Secagem de nanocápsulas por aspersão

O processo de secagem por aspersão (*spray-drying*) consiste na remoção da água para obtenção de formulações pulverulentas., apresentando como vantagem a facilidade de transposição para escala industrial e aplicação a substâncias termolábeis (AULTON, 2005).

A secagem de nanocápsulas por aspersão foi primeiramente descrita por MÜLLER e colaboradores (2000), com intuito de aumentar a estabilidade dos pós obtidos. Nesse trabalho, suspensões de nanocápsulas preparadas com poli(ϵ -caprolactona) ou Eudragit S90[®] foram secas com o adjuvante dióxido de silício coloidal. A visualização das partículas obtidas por MEV demonstrou que o adjuvante de secagem foi revestido pelas nanocápsulas desenvolvidas, originando agregados micrométricos nanorrevestidos. Em um estudo posterior, a avaliação da tolerância gastrointestinal dos nebulizados de nanocápsulas de diclofenaco em comparação com diclofenaco de sódio livre demonstrou uma maior tolerância para o nebulizado de nanopartículas (GUTERRES et al., 2001).

Em outro estudo, uma formulação de nanocápsulas de dexametasona (polímero Eudragit S 100[®]), seca com dióxido de silício coloidal, foi capaz de controlar a liberação do fármaco em células Caco-2. Dessa forma, essas partículas desenvolvidas tornam-se sistemas interessantes para o tratamento de doenças intestinais, pois devido ao controle da liberação do fármaco, é possível um controle da sua absorção, sendo possível aumentar o intervalo de administrações de doses (BECK et al., 2007).

A secagem por aspersão de nanocápsulas contendo melatonina propiciou estabilidade física de 12 meses, maior que aquela apresentada pelas suspensões de nanocápsulas. No estudo de liberação *in vitro* realizado para o fármaco livre e nanocápsulas secas por aspersão, se observou liberação de 96% para o fármaco livre e 71% para o fármaco contido nas nanocápsulas secas, demonstrando a liberação prolongada propiciada pelas nanocápsulas (SCHAFFAZICK et al., 2006).

Tewa- Tagne e colaboradores (2007) desenvolveram nanocápsulas secas por aspersão utilizando adjuvantes hidrofílicos. As nanocápsulas preparadas com o

polímero poli (ϵ -caprolactona), foram secas com açúcares (lactose, manitol e maltodextrina em concentrações de 10%) ou polímeros (polivinilpirrolidona-K30 e polivinilpirrolidona K-90 em concentrações de 5% e 10%, hidroxipropilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose em concentrações de 2% e 5%). A análise morfológica mostrou que a secagem com lactose propiciou a obtenção de micropartículas esféricas. Por sua vez, para a secagem com manitol e polímeros, foram obtidas micropartículas com formato irregular. A redispersão após secagem realizada em água demonstrou que as formulações secas com açúcares apresentaram partículas com distribuição de partícula bimodal, sendo encontrado maior tamanho de partícula para nanocápsulas secas com maltodextrina. A redispersão das nanocápsulas secas com polímeros apresentou uma melhor reconstituição em água para as partículas secas com PVP K-30, em concentração de 10%. Para as formulações secas com hidroxipropilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose, a melhor reconstituição foi obtida quando se utilizou concentração de 5% desses. Com base nos resultados, os autores observaram que a lactose foi o adjuvante de secagem mais favorável, pois propiciou a obtenção de micropartículas com uma melhor morfologia e uma melhor reconstituição de diâmetro na dispersão em água (somente 2% das partículas apresentaram tamanho micrométrico).

No trabalho de Hoffmeister e colaboradores (2012), suspensões de nanocápsulas contendo melatonina foram secas com lactose ou maltodextrina em concentração de 10%. A formulação seca com lactose apresentou melhor perfil de desaglomeração em água, após 1 hora de análise. Ambas as formulações secas mostraram maior controle da liberação do fármaco quando comparadas com a suspensão de nanocápsulas. O estudo de permeação cutânea demonstrou que as formas pulverulentas, incorporadas em hidrogéis, foram capazes de reduzir a quantidade permeada em comparação com suspensões de nanocápsulas contidas em hidrogéis ou melatonina livre contida em hidrogel. Este trabalho demonstrou a potencialidade da aplicação de nanocápsulas secas por aspersão em sistemas semissólidos com aplicação cutânea.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1. Matérias-primas

- Monoestearato de sorbitano (Sigma- Aldrich)
- Eudragit S100[®] (copolímero do ácido metacrílico e de metacrilato de metila 1:2)

Degussa

- Polissorbato 80 (Deg)
- Metoxicinamato de octila (Deg)
- Octiltriazone (Daltomare)
- Bemotrizinol (Cosmetrade)
- Lactose (Deg)
- Carbopol 980[®] (BFGoodrich)
- Trietanolamina (Delaware)
- Pele abdominal de suíno (Frigorífico Araldi, Nova Roma do Sul, RS)
- Triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico (Cosmetrade)

5.1.2. Solventes

- Acetona
- Acetonitrila grau áficocromatogr
- Metanol grau cromatográfico
- Água ultrapura (Milipore)

5.1.3. Equipamentos

- Balança analítica (APX-200, Denver Instruments)
- Centrífuga Eppendorff (Centrifuge 5417R)
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Perkin Elmer): bomba e auto-injetor (S200 Perkin-Elmer), detector (SPD-10A; programa LC 10)
- DSC Q20 (TA Instruments)
- Evaporador rotatório R-114 (Büchi)
- Mastersizer 2000[®] (Malvern Instrument)

- Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL 6060)
- Mini *Spray-Dryer* B-290 (Buchi)
- Potenciômetro (Ultrabasic Denver UB-10)
- TurbiscanLAB® (Formulation)
- Zetasizer Nano ZEN3600 (Malvern Instruments Limited)
- Célula de Franz automatizada (Hanson Research Corporation)
- Viscosímetro rotacional (LDV-II+ Pro, Brookfield)
- Vortex (Certomat MV, B.Braun Biotech International)
- Ultrassom (Unique Ultracleaner)
- Espectrofotômetro ultravioleta/visível (M. Wave 1800 PC)

5.1.4 Materiais

- Membrana 0,45µm (Millipore)
- Filtros Microcon 1000 A (Milipore)
- Fita adesiva (Scotch, 3M)
- Coluna Gemini C18 (5µm) 150 mm x 4,6 mm (Phenomenex)
- Coluna LiCrospher 100 RP-18 (5µm) 250-4 (Merck)
- Medidor de espessura (Dial Thickness Case, Mitutoyo)
- Lâmpada UVB 15 watts (Orion)
- Stubs para microscopia eletrônica de varredura

5.2. Métodos

5.2.1. Teste de inchamento do polímero

Filmes poliméricos contendo Eudragit S100® foram preparados em triplicata mediante sua solubilização em acetona e secagem por evaporação (em capela por 24 horas). Após, filmes de 43 mg foram obtidos e mantidos imersos em metoxicinamato de

ocila por até 30 dias. No dia de preparo (0) e após 1, 2, 6, 8, 14, 20 e 30 dias, os filmes foram retirados da imersão, secos com papel absorvente e então pesados.

5.2.2. Preparação das suspensões de nanocápsulas

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas em triplicata pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado (VENTURINI et al., 2011) de acordo com as concentrações descritas nas Tabelas 2 e 3. Para as suspensões contendo somente OMC, estas se diferenciaram pela presença de um óleo adicional (triglicerídeos de cadeia média -TCM), e concentração de monoesterato de sorbitano (Tabela 2). Para as suspensões contendo a associação de filtros solares, a concentração do OMC permaneceu constante enquanto a concentração de octiltriazone e bemotrizinol variou entre 1mg/mL e 2 mg/mL (Tabela 3).

As formulações foram preparadas mediante a solubilização (por agitação magnética) da fase orgânica e fase aquosa, separadamente, sendo a fase orgânica mantida à temperatura de 37 °C. A seguir, procedeu-se a injeção da fase orgânica na fase aquosa, para a formação das nanocápsulas com auxílio de um funil. Após, a suspensão obtida foi submetida à evaporação em evaporador rotatório para eliminação da acetona e ajuste do volume final para 10 mL.

Tabela 2. Formulações de suspensão de nanocápsulas contendo metoxicinamato de octila.

Matérias-primas	NC _{0,4,8}	NC _{0,1,0}	NC ₁
Fase orgânica			
Eudragit S100 [®] (g)	0,25	0,25	0,25
Monoesterato de sorbitano (g)	0,077	0,077	0,0383
Metoxicinamato de octila (g)	0,048	0,01	0,01
Triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico (mL)	-	-	0,16
Acetona (mL)	26	26	26
Fase aquosa			
Polissorbato 80 (g)	0,077	0,077	0,077
Água (mL)	50	50	50

Tabela 3. Formulações de nanocápsulas contendo associação de filtros solares.

Matérias-primas	NC ₂	NC ₃	NC ₄
Fase orgânica			
Eudragit S100 [®] (g)	0,1	0,1	0,1
Monoesterato de sorbitano (g)	0,0383	0,0383	0,0383
Metoxicinamato de octila (OMC) (g)	0,01	0,01	0,01
Octiltiazona (OCT) (g)	0,02	-	0,01
Bemotrizinol (BMT) (g)	-	0,02	0,01
Triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico (mL)	0,16	0,16	0,16
Acetona (mL)	26	26	26
Fase aquosa			
Polissorbato 80 (g)	0,077	0,077	0,077
Água (mL)	50	50	50

A Tabela 4 sistematiza a descrição das suspensões de nanocápsulas preparadas e suas respectivas abreviaturas.

Tabela 4. Descrição das formulações preparadas e as suas respectivas abreviaturas.

Descrição	Abreviatura
Suspensão de nanocápsulas contendo 4,8 mg/mL de OMC	NC _{0 4,8}
Suspensão de nanocápsulas contendo 1 mg/mL de OMC	NC _{0 1,0}
Suspensão de nanocápsulas contendo 1 mg/mL de OMC e 16 mg/mL de TCM	NC ₁
Suspensão de nanocápsulas contendo 1 mg/mL de OMC, 2 mg/mL de OCT e 16 mg/mL de TCM	NC ₂
Suspensão de nanocápsulas contendo 1 mg/mL de OMC, 2 mg/mL de BMT	NC ₃
Suspensão de nanocápsulas contendo 1 mg/mL de OMC, 1 mg/mL de OCT, 1 mg/mL de BMT e 16 mg/mL de TCM	NC ₄

5.2.3. Secagem por aspersão

As suspensões de nanocápsulas, previamente preparadas e caracterizadas, foram submetidas à secagem por aspersão, em triplicata, em Mini *Spray Drier* B-290 (Buchi), adicionando-se 10 % (m/v) de lactose às suspensões. As suspensões de nanocápsulas contendo o filtro lipofílico foram secas em temperatura de entrada de 105± 1°C e temperatura de saída de 65± 1° C. A taxa de alimentação utilizada foi de 15% e de aspiração de 100%. Foi realizada a secagem das suspensões de nanocápsulas que apresentaram maior estabilidade. Adicionalmente também foi realizada a secagem do filtro solar livre, conforme descrito na Tabela 5. O metoxicinamato de octila foi inicialmente pesado, solubilizado com polissorbato 80 (na mesma quantidade empregada nas suspensões de nanocápsulas), seguindo-se a adição da água. A seguir,

foi mantida agitação magnética por 20 minutos. Por fim foi adicionada a lactose, sob agitação magnética até a sua completa solubilização.

Tabela 5. Composição da formulação de OMC seco.

Componentes	Quantidade
OMC	0,05 g
Polissorbato 80	0,19125 g
Água	50 mL
Lactose	5 g

5.2.4. Preparação das formulações semissólidas

As nanocápsulas, bem como o ativo(s) livre(s), foram incorporados em hidrogéis. Os mesmos foram preparados com 0,5% de Carbopol 980[®] NF (m/v), imidazolidinil uréia 0,2% (m/v) e trietanolamina. Foram preparados géis contendo somente OMC e géis contendo associação dos filtros solares, todos em triplicata.

Na série dos géis contendo somente OMC, foram preparados géis contendo o filtro na forma livre, géis contendo nanocápsulas secas e géis contendo nanocápsulas aquosas. O hidrogel contendo OMC livre denominado de g_{OMC} foi preparado de acordo com a Tabela 6. O polissorbato 80 foi empregado para solubilizar o OMC e possibilitar a sua incorporação no hidrogel. Assim, foi realizada pesagem prévia do OMC e do polissorbato 80 (mesma concentração utilizada para o preparo de nanocápsulas) em um mesmo recipiente (Fase B), seguida da homogeneização com auxílio de um bastão de vidro e adição no gel de Carbopol[®] pronto (Fase A).

Tabela 6. Composição do hidrogel contendo OMC (g_{OMC}).

Composição	Quantidade
Fase A	
Gel de Carbopol 980 [®]	25g
Fase B	
OMC	0,05 g
Polissorbato 80	0,19125 g

Os hidrogéis contendo suspensão de nanocápsulas foram preparados mediante substituição da água pela suspensão de nanocápsulas. A formulação de OMC mais estável (contendo 1 mg/mL ou 4,8 mg/mL) foi incorporada em hidrogéis.

Os hidrogéis contendo OMC seco e pós de nanocápsulas foram preparados mediante a sua pesagem prévia e adição no gel de Carbopol[®] pronto. Somente as suspensões aquosas de nanocápsulas que apresentaram maior estabilidade, determinada experimentalmente, foram submetidas à secagem. A quantidade de pó adicionada nos hidrogéis foi calculada de modo a assegurar concentração final de filtro(s) solar (es) igual em todos os géis preparados.

Os hidrogéis contendo a associação dos filtros solares foram preparados do mesmo que os demais hidrogéis, em triplicata. Os hidrogéis contendo os filtros na forma livre foram denominados de g_{OMC-OCT-BMT} (1mg/g de cada filtro solar), cujo preparo está descrito na Tabela 7. Eles foram preparados mediante a pesagem prévia de cada um dos filtros solares (OMC, OCT, BMT) e do polissorbato 80 em um mesmo recipiente (Fase B), e adição de quantidade suficiente de dicaprilil carbonato (Fase C). A seguir foi realizada a homogeneização com auxílio de um bastão de vidro e adição no gel de Carbopol[®] pronto (Fase A). O dicaprilil carbonato é um óleo que atua solubilizando filtros solares cristalinos. A sua combinação com o metoxicinamato de octila, permite solubilização da octiltriazona e do bemotrizinol (HERZOG et al., 2013).

Tabela 7. Composição do hidrogel contendo OMC, OCT e BMT (g_{OMC-OCT-BMT}).

Composição	Quantidade
Fase A	
Carbopol 980 [®]	25g
Fase B	
OMC	0,025 g
OCT	0,025 g
BMT	0,025 g
Polissorbato 80	0,19125 g
Fase C	
Dicaprilil carbonato	q.s

Os hidrogéis contendo filtros solares associados nanoencapsulados foram preparados da mesma forma como para os semissólidos contendo somente OMC nanoencapsulado. A suspensão de nanocápsulas substituiu a água empregada para obtenção dos géis. A Tabela 8 apresenta a composição dos hidrogéis.

Tabela 8. Composição dos hidrogéis contendo filtros solares associados nanoencapsulados.

Componentes	Quantidade
Carbopol 980 [®]	0,125g
Imidazodinitiluréia	0,05 g
Suspensão de nanocápsulas q.s.p	25 mL*

* A adição da suspensão NC₂, NC₃ ou NC₄ origina os géis g_{NC2}, g_{NC3} e g_{NC4}, respectivamente.

A Tabela 9 sistematiza a descrição de todos os semissólidos preparados e suas respectivas abreviaturas.

Tabela 9. Descrição das formas semissólidas contendo nanocápsulas e pós de nanocápsulas, e suas respectivas abreviaturas.

Descrição	Abreviatura
Gel de Carbopol 980 [®] NF contendo suspensão de nanocápsulas NC ₀	g NC0
Gel de Carbopol 980 [®] NF contendo suspensão de nanocápsulas NC ₁ .	g NC1
Gel de Carbopol 980 [®] NF contendo suspensão de nanocápsulas NC ₂ .	g NC2
Gel de Carbopol 980 [®] NF contendo suspensão de nanocápsulas NC ₃ .	g NC3
Gel de Carbopol 980 [®] NF contendo suspensão de nanocápsulas NC ₄ .	g NC4
Gel de Carbopol 980 [®] NF contendo pó de nanocápsulas NC ₀	g NC0s
Gel de Carbopol 980 [®] NF contendo pó de nanocápsulas NC ₁	g NC1s
Gel de Carbopol 980 [®] NF contendo OMC seco	g OMCs

5.2.5. Caracterização físico-química das formulações

As suspensões de nanocápsulas obtidas foram avaliadas através da determinação do diâmetro de partícula (Mastersizer 2000, Zetasizer Nanoseries), potencial zeta (Zetasizer Nanoseries), pH (Denver Ultrabasic UB-10) e espalhamento múltiplo de luz (Turbiscan LAb[®]).

Os pós obtidos (NC_{0 s} e NC_{1 s}) foram caracterizados através da determinação do rendimento, umidade, tamanho das partículas, microscopia eletrônica de varredura.

Os hidrogéis foram caracterizados através de características organolépticas (cor, aspecto e odor), pH (Denver Ultrabasic UB-10), diâmetro de partícula (Mastersizer 2000) comportamento reológico (viscosímetro rotacional, Brookfield), estabilidade física através da técnica de espalhamento múltiplo de luz (Turbiscan LAb[®]).

5.2.5.1. Difratometria de laser

A avaliação por difratometria de laser (Mastersizer 2000) permite obter uma varredura da amostra, analisando diferentes diâmetros desde 40 nm até 3000 µm, possibilitando detectar simultaneamente a presença (ou não) de micropartículas em suspensões nanométricas. Através desta técnica ainda é possível determinar o valor de Span (Equação 1), o qual é um indicativo da homogeneidade da formulação.

$$Span = \frac{D[0,9]-D[0,1]}{D[0,5]} \text{ (Equação 1),}$$

onde D [0,9] corresponde a distribuição do tamanho de partícula onde 90% das mesmas apresentam diâmetro inferior ao descrito; D [0,1] corresponde a distribuição do tamanho de partícula onde 10% das partículas apresentam diâmetro inferior ao descrito; D [0,5] corresponde a distribuição do tamanho de partícula onde 50% das partículas apresentam diâmetro inferior ao descrito.

A análise por difratometria de laser foi realizada para as suspensões de nanocápsulas, para as formas semissólidas e para as nanocápsulas secas. Para essas

últimas, o tamanho de partículas foi determinado empregando-se via seca e via úmida. A análise por via seca foi realizada na ausência de solvente, em triplicata, com intuito de determinar o tamanho de partícula dos pós obtidos. Para fins comparativos, a lactose também foi seca por aspersão e avaliada quanto ao seu tamanho de partícula por via seca. A via úmida foi utilizada para avaliar a capacidade de desaglomeração das partículas em água, avaliando a retomada de partículas nanométricas, em função do tempo.

5.2.5.2. Espectroscopia de correlação de fótons

O tamanho médio de partícula também foi determinado por espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer Nanoseries) para as suspensões de nanocápsulas. Para a análise, foi realizada diluição 1:500 (v/v) da amostra em água ultrapura. Foi determinado também o valor do índice de polidispersão (PDI), o qual indica a homogeneidade da formulação.

5.2.5.3. Potencial zeta

A determinação do potencial zeta das nanocápsulas foi realizada através da técnica de mobilidade eletroforética (Zetasizer Nanoseries) mediante diluição da amostra (1:500, v/v) em solução aquosa de cloreto de sódio (10 mM), previamente filtrada (0,45 μm).

5.2.5.4. Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada diretamente nas suspensões de nanocápsulas (sem diluição), em triplicata (Denver Ultrabasic UB-10). Adicionalmente, também foi determinado o pH das formas semissólidas, mediante diluição dessas a 10% (volume/volume) em água, sendo realizada em triplicata.

5.2.5.5. Avaliação de fenômenos de instabilidade por espalhamento múltiplo de luz

A estabilidade da suspensão de nanocápsulas foi determinada através de espalhamento múltiplo de luz (Turbiscan LAB[®]), com varreduras a cada 5 minutos, durante 1 hora à temperatura de 25 °C. Para esta análise, a amostra a ser analisada foi previamente colocada em cubeta de análise e ambientada à temperatura de análise.

A estabilidade das formulações semissólidas também foi avaliada por essa técnica, realizando-se varreduras das amostras a cada 10 minutos, durante 12 horas, à temperatura de 25°C. Para essa análise, da mesma forma como para a determinação da estabilidade da suspensão de nanocápsulas, a amostra foi ambientada à 25°C.

5.2.5.6. Rendimento do processo de secagem

O rendimento do processo de secagem foi obtido através de duas operações. Inicialmente, foi realizada a soma da massa de todos componentes da formulações (soma de todas as matérias primas, usadas para a preparação da suspensão de nanocápsulas, incluindo a lactose), excluindo a água. A seguir, a massa obtida após a secagem foi dividida pela massa das matérias-primas da formulação. O resultado foi expresso em percentagem (%), como média de três determinações.

$$\text{Rendimento (\%)}: \frac{\text{Massa obtida após a secagem}}{\text{Massa das matérias primas da formulação}} \quad (\text{Equação 2})$$

5.2.5.7. Morfologia das nanocápsulas secas

Os pós obtidos e o adjuvante (lactose) secos por aspersão foram analisados através de microscopia eletrônica de varreduras (JSM 6060) utilizando-se 10 kV. Para isso, as amostras foram previamente metalizadas com ouro. Esta análise foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

5.2.6. Estabilidade física das suspensões de nanocápsulas NC₂, NC₃ e NC₄

Adicionalmente, foi avaliada a estabilidade física das suspensões NC₂, NC₃ e NC₄, através da determinação do tamanho de partícula, potencial zeta, pH e avaliação macroscópica durante 14 dias. As formulações foram armazenadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

5.2.7 Quantificação dos filtros solares

Os filtros solares foram quantificados através de metodologia analítica (CLAE), previamente validados (ANEXOS I e III). O doseamento foi realizado um dia após o preparo das suspensões de nanocápsulas contendo os filtros solares

5.2.7.1 Doseamento e avaliação da estabilidade química do metoxicinamato de octila contido nas nanocápsulas e nanocápsulas secas

A quantificação do metoxicinamato de octila contido nas suspensões de nanocápsulas foi realizada através da retirada de alíquotas entre 30 e 100 µL de cada suspensão e diluição em 10 mL de acetonitrila. As formulações ainda foram submetidas a banho de ultrassom para total extração do ativo.

A estabilidade química foi avaliada para as suspensões de nanocápsulas contendo 1 mg/mL e 4,8 mg/mL durante um período de 30 dias por doseamento de ativo em CLAE, afim de determinar a formulação mais estável para dar prosseguimento aos experimentos. Para isto, foi retirada uma alíquota das suspensões de nanocápsulas (30 e 100 µL) seguida da diluição em solvente orgânico, como acima descrito.

Para o doseamento do OMC proveniente dos pós de nanocápsulas, foi realizada a pesagem de 10 mg de pó, extração com 10 mL de agitação durante 15 minutos e sonicação por 45 minutos.

5.2.7.2 Doseamento e determinação da eficiência de encapsulação dos filtros solares OMC, OCT e BMT contidos nas suspensões de nanocápsulas

Os filtros solares contidos nas suspensões de nanocápsulas NC₂, NC₃ e NC₄ foram doseados através da retirada de uma alíquota de 30 µL de suspensão diluída em 10 mL de acetonitrila, a fim de obter concentrações descritas na Tabela 10.

Tabela 10. Concentrações dos filtros solares em cada uma das formulações.

Formulação	Filtros		
	OMC	OCT	BMT
NC ₂	3 µg/mL	6 µg/mL	-
NC ₃	3 µg/mL	-	6 µg/mL
NC ₄	3 µg/mL	3 µg/mL	3 µg/mL

Para a determinação da eficiência de encapsulação foi utilizada uma alíquota de 400 µL de suspensão, que adicionada em um filtro tipo Ultrafree[®] (10.000 Da). As formulações foram, então, submetidas à centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos e o ultrafiltrado foi doseado por CLAE. Os ultrafiltrados obtidos através desta técnica permitem estimar a quantidade de ativo livre nas suspensões. Assim, pela diferença da quantidade total e quantidade livre de ativo estimou-se a quantidade efetivamente encapsulada.

5.2.8. Estudo do gradiente de densidade dos nanoingredientes contendo OMC

Esta análise foi realizada para as formulações contendo somente metoxicinamato de octila, sendo avaliadas as diferentes nanocápsulas de OMC estudadas, uma formulação de nanoesferas (NS) nanoemulsão preparadas a partir de OMC (NE_{OMC}) (Tabela 11).

Tabela 11. Formulações de nanoesferas e nanoemulsão contendo metoxicinamato de octila.

Matérias-primas	NS	NE _{OMC}
Fase orgânica		
Eudragit S100 [®] (g)	0,1	-
Monoesterato de sorbitano (g)	0,077	0,077
Metoxicinamato de octila (g)	-	0,01
Acetona (mL)	26	26
Fase aquosa		
Polissorbato 80 (g)	0,077	0,077
Água (mL)	50	50

O estudo de gradiente de densidade foi realizado com intuito de verificar a presença de outras nanoestruturas nas suspensões de nanocápsulas preparadas, através da separação destas partículas e determinação da densidade das mesmas. Para isto, inicialmente foi preparada uma solução de sílica (Percoll[®]) com concentração de 54% em cloreto de sódio 0,15 M. Uma alíquota de 400 µL das formulações foram adicionadas em 19,6 mL da solução de Percoll[®] em cloreto de sódio. A seguir, para permitir a separação das partículas, foi realizada ultracentrifugação na velocidade de 18.500 rpm por 60 minutos à temperatura de 20 °C. A densidade das partículas obtidas foi determinada através de uma curva polinomial, previamente realizada com marcadores de densidade (Density Marker Beads[®]), os quais apresentam densidade conhecida (VENTURINI et al., 2011)

5.2.9. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A técnica de calorimetria exploratória diferencial foi realizada com nitrogênio líquido ultrapuro, em vazão de 50 mL/min, em panelinhas de alumínio herméticas. As

análises foram realizadas para as matérias primas: Eudragit S 100[®], OMC, TCM, mistura binária (entre o polímero e OMC), mistura binária (entre o polímero e TCM); mistura terciária (Eudragit S 100[®], OMC, TCM) e para as nanocápsulas NC₀ e NC₁. As amostras foram submetidas a um ciclo de aquecimento (de -80°C a 100°C) e resfriamento (100°C a -80°C), com taxa de aquecimento ou resfriamento de 10°C / minuto.

5.2.10 Avaliação da fotoestabilidade do metoxicinamato de octila encapsulado

A fotoestabilidade do metoxicinamato de octila foi avaliada através da exposição das suspensões de nanocápsulas e pós secos das nanocápsulas e solução metanólica do filtro solar à radiação UVB durante 24 horas (n=3) em uma dose de $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ W cm}^{-2}$. A solução metanólica foi preparada mediante pesagem do metoxicinamato de octila e sua solubilização em metanol (PERUGINI et al., 2002; WEISS-ANGELI et al., 2008). As suspensões de nanocápsulas e os pós foram submetidos diretamente à radiação, sem diluição. Após 30 minutos, 1, 4, 8, 10 e 24 horas de exposição, 50 µL das formulações líquidas e 10 mg dos pós foram diluídas com solvente orgânico.

A quantidade de metoxicinamato de octila, remanescente em cada uma das formulações, foi doseada por CLAE.. Após 24 horas de exposição à radiação, também foi determinado o diâmetro de partícula e o potencial zeta de cada uma das formulações.

5.3 Reologia das formulações semissólidas

A avaliação da reologia das formulações semissólidas foi determinada em viscosímetro rotacional (Brookfield). Para todas as formulações foi utilizado o *spindle* SC4-25 e banho termostatzado a $25 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$.

A partir dos dados obtidos neste equipamento, foram construídos reogramas da tensão de cisalhamento pela taxa de cisalhamento. As formulações foram avaliadas através de modelagem matemática (através do software Rheocalc[®]), para verificar qual comportamento não newtoniano (plástico ou pseudoplástico) melhor descreve as formulações.

5.4. Avaliação da capacidade fotoprotetora dos hidrogéis

A avaliação da capacidade fotoprotetora foi estimada através da capacidade dos semissólidos em evitar a fotodegradação de uma solução de resveratrol em presença de radiação UVB (HOMMOSS, 2008). Para tal foram utilizadas placas de Petri devidamente protegidas da luz, deixando apenas a parte superior (tampa) sem proteção. Nessa região sem proteção, 300 mg dos hidrogéis, em triplicata, foram adicionados:

- Géis contendo OMC livre
- Géis contendo filtros solares OMC, OCT, BMT na forma livre
- Géis contendo nanocápsulas de OMC
- Géis contendo nanocápsulas de OMC, OCT e BMT
- Géis contendo nanocápsulas secas

No interior de cada placa de Petri foi adicionada a solução de resveratrol (10 µg/mL). Após 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos de exposição à radiação UVB, foram retiradas alíquotas de 1 mL da solução de resveratrol e realizado o doseamento desse ativo por CLAE (metodologia previamente validada), empregando uma coluna Coluna LiCrospher 100 RP-18 (5µ, 250 x 4 mm). A fase móvel utilizada foi constituída de acetonitrila: água (1:1) contendo 0,5 mg de TBA por cada mililitro de fase móvel e ajuste até pH=3,0 com ácido acético. O fluxo empregado foi de 0,6 mL/minuto, o volume de injeção de 20 µL e o comprimento de onda de 305 nm. A fotodegradação do resveratrol obtida em função do tempo foi modelada através dos modelos monoexponencial e biexponencial, mediante o programa Scientist 2.0. O modelo que permitiu obter a melhor correlação foi escolhido como o modelo que melhor se ajusta ao

perfil de fotodegradação. A partir deste modelo, foi calculado o tempo de meia-vida do resveratrol.

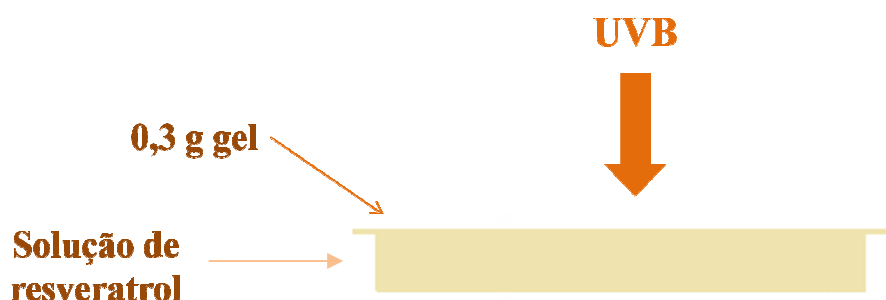


Figura 7. Representação esquemática do método de capacidade fotoprotetora. Adaptado de Homoss, 2008.

5.5. Estudo de penetração cutânea *in vitro* das formulações semissólidas

Os hidrogéis contendo somente metoxicinamato de octila ou a associação dos filtros solares foram submetidos ao estudo de permeação cutânea em célula de Franz automatizada, utilizando como membrana a pele abdominal de suínos, com espessura entre 1,4 e 2,0 mm. Para este estudo, foi realizada a determinação do meio receptor adequado, bem como a validação da extração nas fitas adesivas e na pele (ANEXOS II E IV).

Para este estudo, em cada uma das amostras de peles foi aplicada 80 mg da formulação, sendo o tempo de contato de 2 ou 6 horas. Ao final de cada ensaio, foi realizada uma coleta do meio receptor e determinada a quantidade de filtro solar retido no estrato córneo, epiderme e derme.

Para a determinação da quantidade de ativo retido no estrato córneo, derme e epiderme, as amostras de pele (n=6) foram retiradas das células de Franz. Inicialmente, o excesso de formulação ainda remanescente na superfície da membrana foi removido com auxílio de algodão. A técnica de *Tape Stripping* foi realizada a seguir, com o objetivo de remover o estrato córneo. Para isto, foram utilizadas 18 fitas adesivas

(Scotch[®], 3M) para cada amostra de pele. Estas fitas foram todas acondicionadas em um único tubo de ensaio, seguida da adição de 10 mL de acetonitrila para extração do ativo.

Após a retirada do estrato córneo, foi realizada a separação da epiderme e derme mediante a submersão da pele em água ultrapura a 55°C, por 60 segundos. A epiderme foi então removida com auxílio de uma espátula. Esta foi acondicionada em tubo de ensaio juntamente com 2 mL de acetonitrila. A derme foi fracionada em pequenos pedaços, com auxílio de bisturi, e colocada em tubo de ensaio contendo 4 mL de acetonitrila. A seguir, foi realizada a extração das formulações contidas no estrato córneo, epiderme e derme, mediante agitação em vórtex por 2 minutos e banho de ultrassom por 1 hora, à temperatura de 40°C.

Nesse estudo foi determinada a penetração cutânea de um hidrogel contendo OMC seco ($g_{OMC\ s}$), com intuito de avaliar a influencia do adjuvante de secagem (lactose) na penetração cutânea.

5.6. Avaliação da capacidade absorptiva das formulações semissólidas

A capacidade absorptiva das formulações semissólidas foi determinada através da realização de varredura em espectro ultravioleta, através de espectrofotometria (M. Wave 1800 PC). Esta análise visou determinar as formulações que apresentavam melhor perfil absorptivo da luz ultravioleta. Adicionalmente, também foi determinada a capacidade absorptiva do hidrogel contendo nanocápsulas brancas (apenas com triglicerídeos de cadeia média no núcleo- $g_{NC\ Br}$) e do hidrogel contendo nanoesferas (g_{NS}). Uma cubeta (Hellma) com capacidade de 2,6 mm e caminho óptico de 0,01 mm selada com um holder foi utilizada para esta análise.

5.7. Microscopia eletrônica de varredura de peles suínas tratadas com as formulações semissólidas

Para esta avaliação, as amostras de pele de suínos foram acondicionadas em placas de Petri contendo meio receptor. A seguir, em cada uma destas peles, foram adicionados géis contendo suspensão de nanocápsulas, pós de nanocápsulas ou gel contendo filtros solares na forma livre. Após, estas peles foram expostas à luz ultravioleta UVB durante 15 horas. Decorrido este período, as peles foram conservadas em solução de glutaraldeído (12%) em tampão fosfato (pH 7,4) por 7 dias para o processo de secagem do tecido.

Para a total secagem, após as 48 h, os tecidos foram removidos da solução de glutaraldeído e lavados três vezes com tampão fosfato (pH 7,4, 30 minutos cada lavagem). A seguir, foram realizadas lavagens (10 minutos cada) com etanol e água em diferentes proporções, na ordem que segue:

- etanol : água (30:70)– 10 minutos
- etanol : água (50:50) – 10 minutos
- etanol : água (70:30) – 10 minutos
- etanol : água (90:10)– 10 minutos

Anteriormente à realização da secagem final por ponto crítico (CO₂), as amostras foram deixadas em contato com etanol: água (90:10) por 20 minutos, etanol absoluto por 10 minutos e acetona por 20 minutos. Após as amostras foram secas ao ponto crítico (Critical Point Dryer), fixadas em *stubs* e metalizadas com ouro. As fotomicrografias foram realizadas em microscópio de varredura (MEV, JEOL 6060, 5 kV), no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS.

Os pelos remanescentes nesses fragmentos de pele tratados também foram avaliados.

5.8. Análise estatística

A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via através do programa GraphPad 5.0, com pós-teste de Tukey.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Avaliação de diferentes concentrações de metoxicinamato de octila (OMC) no núcleo lipídico das nanocápsulas

6.1.1. Inchamento do polímero

Para a produção de nanocápsulas, a escolha do óleo constituinte do núcleo lipídico constitui uma etapa importante no planejamento da formulação. Esse não deve solubilizar o polímero, mas deve ser miscível no solvente escolhido para solubilizar o polímero (COUVREUR et al., 2002). Assim, quando se inicia uma nova pesquisa, torna-se relevante a determinação da influência do óleo constituinte do núcleo das nanocápsulas sobre o polímero formador da parede, avaliando-se a ocorrência, ou não, de dissolução do mesmo, a fim de evitar uma possível perda da estrutura da nanocápsula (GUTERRES et al., 2000).

No estudo de Guterres e colaboradores (2000) os autores avaliaram de forma pioneira a influência do óleo na dissolução de polímeros, através do teste de inchamento do polímero. Foi observado que o benzoato de benzila, uma substância comumente usada como óleo formador do núcleo das nanocápsulas, interagiu com os polímeros poli (ácido lático) e poli(ϵ -caprolactona) depois de transcorridas 48 horas de teste. O inchamento do polímero provocado pelo óleo fez com que se formassem dispersões coloidais micelares. Esse dado se correlacionou aos altos valores de recuperação do fármaco (indometacina) obtidos após secagem por aspersão das nanocápsulas, explicado pela perda de massa durante a secagem e aumento na concentração de fármaco. Por sua vez, o Miglyol 810[®] (triglicerídeos de cadeia média, TCM), outro óleo testado, não interagiu com ambos os polímeros após 13 dias de teste, demonstrando que esse óleo é adequado para obtenção de nanocápsulas para ambos os polímeros (PCL e PLA) (GUTERRES et al., 2000). Por sua vez, Schaffazick e colaboradores (2002) ao realizarem o estudo de sorção/dissolução de filmes de Eudragit S 90[®] em Miglyol 810[®] e benzoato de benzila, verificaram que não houve alteração da massa dos filmes de Eudragit[®] imersos em ambos os óleos. Da mesma forma, concluíram que ambos os óleos podem ser utilizados para a preparação de nanocápsulas a partir desse polímero.

Considerando que até o presente momento nanocápsulas contendo metoxicinamato de octila não haviam sido preparadas com Eudragit S100[®], o teste de inchamento do polímero foi procedido. Os filmes poliméricos de Eudragit S 100[®] apresentaram peso médio de $43 \pm 0,57$ mg após a obtenção. Os resultados das pesagens dos filmes de Eudragit S 100[®] estão apresentados na Figura 8. No primeiro dia de pesagem observou-se aumento dos pesos dos filmes poliméricos. Este aumento observado é inerente à técnica, pois parte do metoxicinamato de octila pode não ter sido totalmente retirado pelo papel absorvente. A partir do segundo dia de pesagem, observou-se redução das massas pesadas em relação à medida do primeiro dia, porém com valores semelhantes à pesagem inicial (antes da imersão em óleo). Nos demais dias, os valores de massa se mantiveram estáveis em valor próximo ao inicial, até o último dia de pesagem. Os resultados demonstraram que o polímero não foi dissolvido pelo metoxicinamato de octila, componente formador do núcleo oleoso, indicando a adequação do OMC para a formulação pretendida. O polímero Eudragit S 100[®], é um derivado acrílico aniônico, com características formadoras de filme (ROWE et al., 2009), o que faz com que o mesmo seja apropriado para aplicação tópica, especialmente para o desenvolvimento de fotoprotetores.

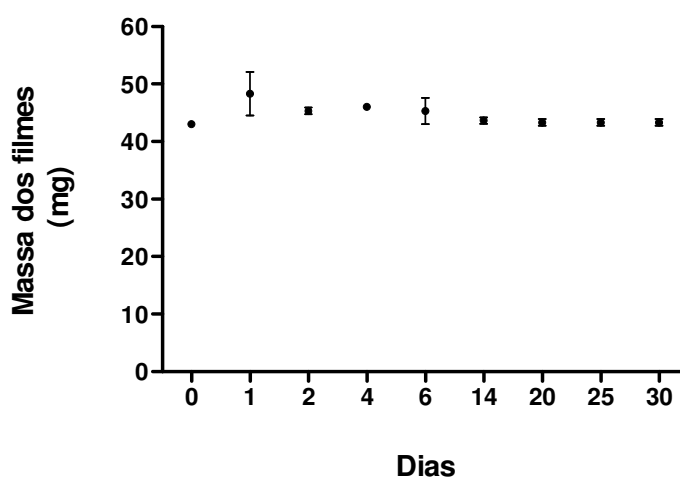


Figura 8. Massa dos filmes de Eudragit S 100[®] após imersão em metoxicinamato de octila.

6.1.2. Caracterização físico-química das suspensões de nanocápsulas NC_{0,4,8} e NC_{0,1,0}

1,0

Todas as suspensões de nanocápsulas apresentaram efeito branco azulado, indicando a ocorrência de efeito *Tyndall*. A formulação NC_{0,1,0} apresentou aspecto levemente esbranquiçado enquanto a formulação NC_{0,4,8} apresentou aspecto esbranquiçado e leitoso. Essa diferença entre as formulações deve-se à concentração de OMC, menor em NC_{0,1,0}, propiciando a essa formulação aspecto menos leitoso que em NC_{0,4,8}.

A análise por difratometria de laser foi a primeira avaliação de tamanho de partícula realizada, como parâmetro de controle de qualidade, objetivando verificar se as formulações apresentavam ou não população micrométrica. A Figura 9 apresenta os tamanhos de partícula das formulações, as quais apresentaram tamanho nanométrico.

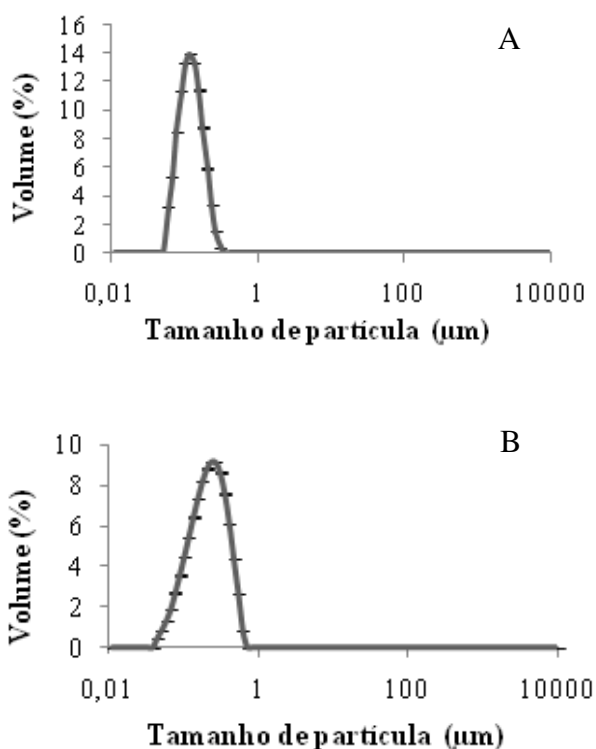


Figura 9. Distribuição do tamanho de partícula (µm) por volume (%) das formulações contendo OMC: NC_{0,4,8} (A), NC_{0,1,0} (B) por difratometria de laser (±dp).

A análise do tamanho de partícula por espectroscopia de correlação de fótons (Figura 10) foi realizada após a análise por difração de laser, com o intuito de determinar mais acuradamente o diâmetro médio das nanocápsulas. No trabalho Alvarez-Román e colaboradores (2001), foi empregado o polímero PCL para obtenção de nanocápsulas, as quais obtiveram tamanho entre 225 e 427 nm. Já Schaffazick e colaboradores (2002), observaram que nanocápsulas preparadas com os polímeros PCL ou Eudragit S 90® apresentaram tamanhos de partícula menor que aquelas preparadas com Eudragit S 90®. Dessa forma o tamanho de partícula menor obtido nesse estudo, deve-se ao emprego de polímero diferente dos relatados, os quais exercem influencia sobre o diâmetro de partícula (SCHAFFAZICK et al., 2002).

O núcleo oleoso também mostra influência sobre o tamanho de partícula, podendo provocar um aumento de diâmetro conforme sua composição (SCHAFFAZICK et al., 2002). No trabalho de Weiss e colaboradores foi obtido tamanho de partícula de 245 ± 12 nm para nanocápsulas de (ϵ -caprolactona) contendo OMC a partir do mesmo método de produção. O maior tamanho de partícula obtido em relação a esse trabalho pode ser explicado pelo fato de nesse trabalho ter sido empregada maior concentração de OMC (48 mg/mL). A formulação NC_{0 1,0} apresentou tamanho de partícula menor que aquele da formulação NC_{0 4,8} uma vez que a primeira apresentou menor concentração de OMC que a segunda.

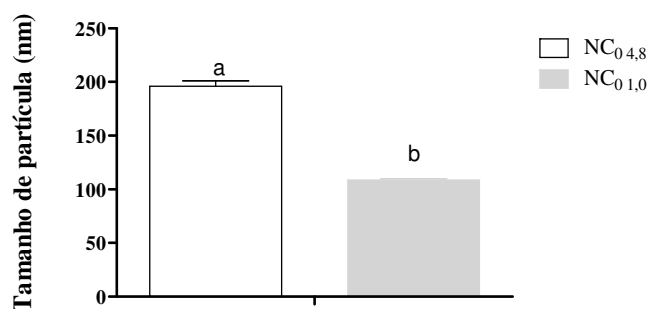


Figura 10. Tamanho médio das partículas (nm) das suspensões de nanocápsulas NC_{0 1,0}, NC_{0 4,8} por intensidade através de espectroscopia de correlação de fótons ($\pm dp$). As médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Os valores de PDI (índice de polidispersão) obtidos para todas as formulações ficaram abaixo de 0,2 (Figura 11), indicando distribuição homogênea unimodal das partículas (VERMA et al., 2003).

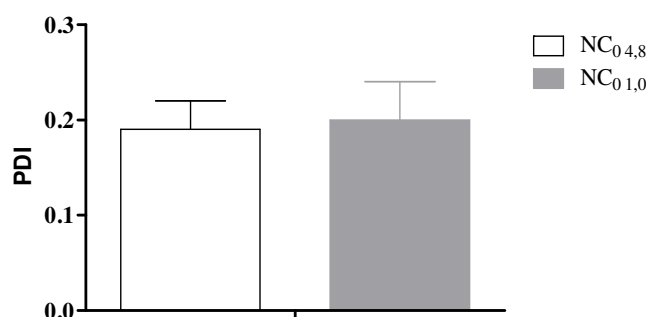


Figura 11. Índice de polidispersão (PDI) das suspensões de nanocápsulas NC_{0,1,0} e NC_{0,4,8}, por espectroscopia de correlação de fótons (\pm dp).

O potencial zeta é um parâmetro utilizado para avaliar a superfície das partículas, refletindo o seu potencial elétrico (COUVREUR et al., 2002). Essa medida pode ser influenciada pela natureza do polímero, do agente estabilizante e do pH do meio (MORA-HUERTAS et al., 2010). Valores de potencial zeta altos em módulo indicam tendência à estabilidade das formulações, contudo o uso de tensoativos não iônicos (como o polissorbato 80) gera potenciais zeta mais baixos em módulo. Isso não indica estabilidade inferior, pois a estabilidade é conferida por impedimento estérico, ou seja, mesmo formulações com potencial zeta próximos a zero podem não ter tendência a agregação e coalescência (MAGENHEIM; BENITA, 1991).

As formulações desenvolvidas apresentaram valor de potencial zeta negativo, esperado para formulações revestidas com polissorbato 80 (JÄGER et al., 2009) (Tabela 12). Comparando os resultados observou-se que as formulações apresentaram valores de potencial zeta similares ($p > 0,05$), ou seja, o incremento de óleo não interferiu na carga de superfície.

Tabela 12. Valores médios de potencial zeta e pH das formulações NC_{0,4,8} e NC_{0,1,0} e obtido por mobilidade eletroforética (\pm dp).

Formulação	Potencial zeta (mV)	pH
NC _{0,4,8}	-18,93 \pm 0,73	4,61 \pm 0,13
NC _{0,1,0}	-15,83 \pm 4,59	4,53 \pm 0,14

O conjunto de resultados apresentado indica que as matérias-primas empregadas propiciaram a obtenção de formulações de nanocápsulas efetivamente nanométricas. Assim, verifica-se que da mesma forma, como observados em estudos anteriores (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2001; WEISS-AGELI et al., 2010), é possível a obtenção de nanocápsulas preparadas a partir do método de deposição interfacial do polímero pré-formado contendo OMC, neste caso, utilizando Eudragit S 100[®] como polímero.

A determinação do pH é outro parâmetro importante para verificar a compatibilidade da formulação preparada com a via pretendida. As suspensões preparadas apresentaram pH entre 4 e 5 (Tabela 12). Os valores obtidos estão de acordo com trabalhos anteriores que utilizaram Eudragit S 100[®] (SCHAFFAZICK et al., 2002) como polímero, além desses valores estarem adequados para o uso tópico (SZNITOWSKA et al., 2001). Comparando-se as duas formulações, não foram observadas variações para os valores obtidos de pH ($p > 0,05$).

Outra técnica bastante eficaz para prever fenômenos de instabilidade é a de espalhamento múltiplo de luz a qual pode detectar a ocorrência de fenômenos como sedimentação, cremagem, coalescência e variação do tamanho de partícula, antes mesmo de serem observados visualmente por um avaliador (MENGUAL et al., 1999). O princípio da técnica baseia-se em um feixe de luz que incide na amostra analisada, sendo esta luz refletida ou transmitida. A partir dessa reflexão ou transmissão da luz são gerados gráficos de transmissão e retroespalhamento. Os gráficos são analisados pela divisão do mesmo em três partes: a parte da esquerda representando o fundo da cubeta, a parte do meio representando o meio da cubeta e a parte da direita representando o topo da cubeta (TURBISCAN LAb USER GUIDE, 2005). Em um primeiro momento esta

técnica foi aplicada para as suspensões de nanocápsulas, sendo os resultados obtidos apresentados na Figura 12.

A formulação $NC_{0,4,8}$ com maior opacidade apresentou apenas retroespalhamento de luz, já a formulação $NC_{0,1,0}$, a qual apresentou leve transparência, apresentou tanto retroespalhamento quanto transmissão de luz. Para formulações que apresentam um certo grau de transparência, pode ocorrer variação de transmissão maior que 0,2%, sendo necessário analisar os gráficos de variação de transmissão em conjunto com o de retroespalhamento (TURBISCAN LAB USER GUIDE, 2005). Dessa forma, para a formulação $NC_{0,4,8}$ avaliou-se somente o gráfico de variação de retroespalhamento (Figura 12A). Por sua vez, para a formulação $NC_{0,1,0}$ foram avaliados ambos os gráficos de variação de transmissão e retroespalhamento (Figura 12B e 12C). As variações obtidas para a formulação $NC_{0,1,0}$ foram baixas, indicando leve tendência à cremagem, verificada através do aumento do retroespalhamento no topo da cubeta, e com ausência de alteração do tamanho de partícula. A formulação $NC_{0,4,8}$ apresentou uma maior tendência inicial à cremagem, seguida por sedimentação no fim da análise. A cremagem, se caracteriza por uma fase dispersa menos densa que a fase dispersante (TURBISCAN LAB USER GUIDE, 2005) e pode ser explicado pela maior concentração de OMC nessa formulação em relação à outra formulação preparada. Venturini e colaboradores (2011) observaram que quando altas concentrações de triglicerídeos de cadeia média, que à temperatura ambiente é um óleo, assim como o OMC, eram utilizadas na preparação de nanocápsulas, fenômenos de cremagem eram observados. A ocorrência desse fenômeno é reversível e pode estar indicando a formação de nanoemulsão juntamente à nanocápsulas nessas formulações (VENTURINI et al., 2011).

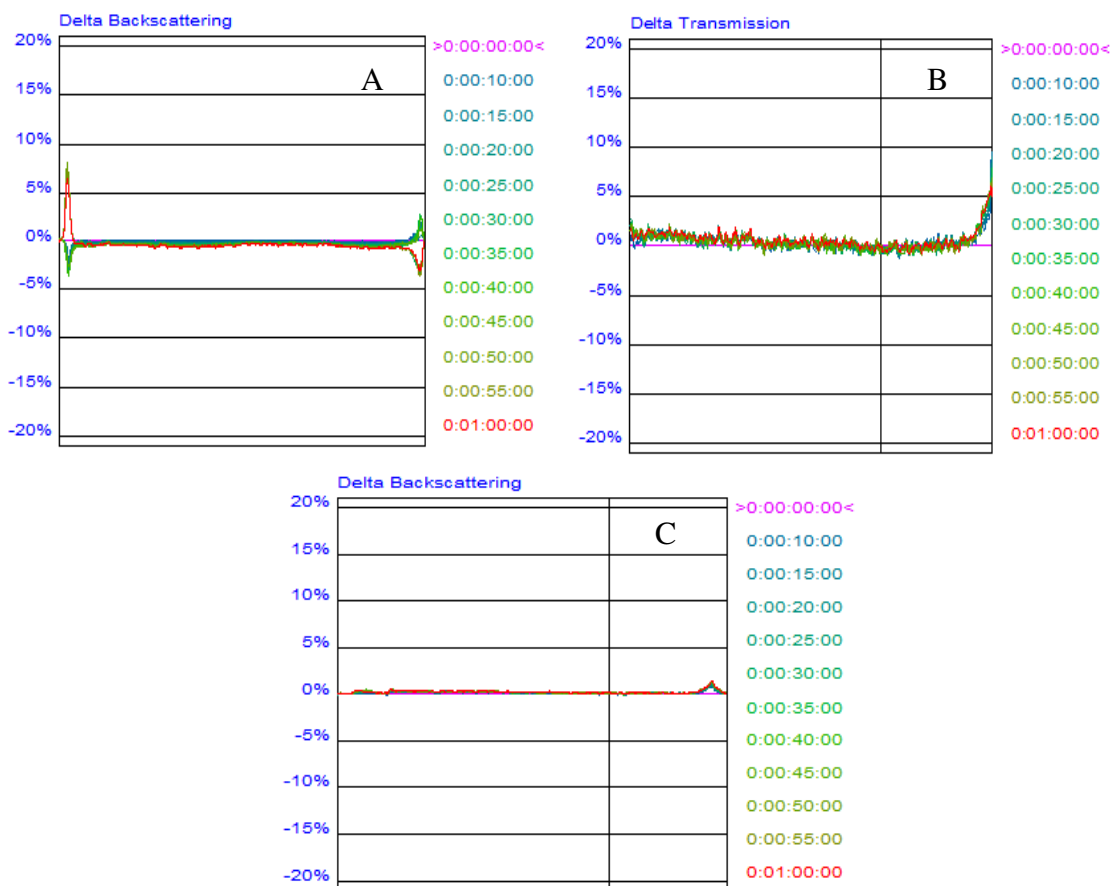


Figura 12. Variações de retroespalhamento da formulação NC_{0 4,8} (A), variação de transmissão (B) e retroespalhamento (C) de NC_{0 1,0} obtidos por espalhamento múltiplo de luz.

6.1.3. Doseamento e determinação da estabilidade química das suspensões contendo OMC

A determinação do teor de filtro solar contido nas nanocápsulas é também uma avaliação importante para o controle de qualidade, pois está diretamente relacionado à recuperação da quantidade de filtro solar adicionado na fabricação, à manutenção do teor ao longo de um período de armazenagem, bem como ao seu posterior desempenho nos estudos de avaliação da eficácia dos fotoprotetores. A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos de teores de OMC para cada uma das suspensões. Todas as formulações apresentaram taxa de recuperação superior a 90%.

Tabela 13. Teor de OMC nas nanocápsulas NC_{0,4,8}, NC_{0,1,0} obtido em triplicata.

Formulação	Valor teórico (mg/mL)	Quantidade encontrada (mg) (\pm d.p)	Teor (%)
NC _{0,4,8}	4,8	4,442 \pm 0,110	92,5
NC _{0,1,0}	1	0,941 \pm 0,028	94,1

A determinação da concentração de ativo capaz de ser encapsulado é um parâmetro importante, pois o emprego de altas concentrações pode levar à formação adicional de outras nanoestruturas (POHLMANN et al., 2008). Desta forma, as formulações NC_{0,1,0} e NC_{0,4,8} foram submetidas à análise de estabilidade química do ativo, através de doseamento em CLAE, durante 30 dias.

Como resultado, as suspensões de nanocápsulas com concentração de 4,8 mg/mL (Figura 13) demonstraram queda de teor. Após 30 dias de preparo das formulações, obteve-se doseamento em torno de 13% do inicialmente obtido. Este resultado pode ser devido à alta concentração do OMC (4,8 mg/mL), o qual pode não ter sido totalmente encapsulado. O OMC ou uma parte dele não encapsulado pode ter sofrido degradação em função do tempo, levando à queda no doseamento observado. Além disso, o OMC excedente, não encapsulado, pode ter permanecido na fase aquosa, estabilizado pelo tensoativo não iônico, formando nanoemulsão, gerando discretamente, o fenômeno de cremagem na análise por espalhamento múltiplo de luz.

Já as nanocápsulas contendo 1 mg/mL de OMC (NC_{0,1,0}) mantiveram o teor de OMC constante em função do tempo (Figura 13), indicando possivelmente que a menor concentração de OMC favorece a sua localização no núcleo das nanocápsulas.

Os resultados apresentados de doseamento durante 30 dias, juntamente à análise de estabilidade por espalhamento múltiplo de luz são indicativos de que uma nanoemulsão possa estar se formando concomitantemente às nanocápsulas na formulação contendo maior concentração de filtro solar. Com a formação dessa nanoestrutura adicional, pode-se estar perdendo a efetividade das formulações obtidas como fotoprotetoras, já que nanoemulsões podem propiciar maior retenção em camadas mais inferiores da epiderme e na derme (ALVES et al., 2005). Além disso, a localização

do filtro solar no núcleo das nanocápsulas pode favorecer o aumento da sua estabilidade em detrimento à nanoemulsões, nas quais o OMC pode estar muito mais suscetível à degradação. Portanto, a formulação contendo 1 mg/mL de OMC foi escolhida para continuidade com os demais estudos e a partir desse momento essa passou a ser denominada NC₀ apenas.

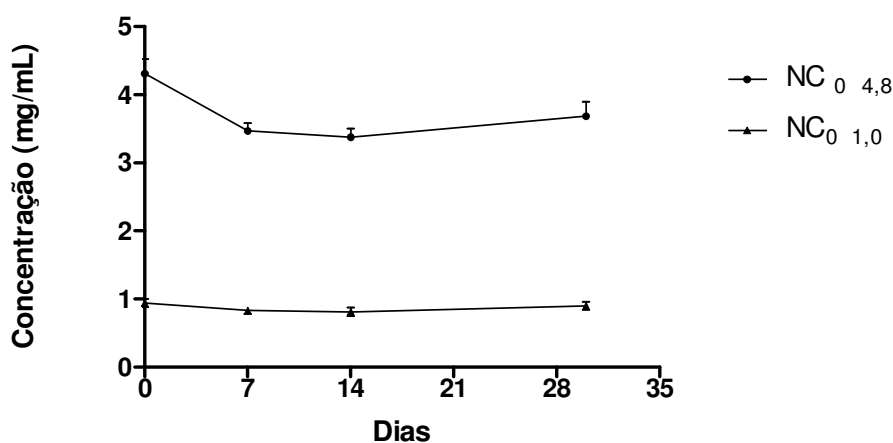


Figura 13. Doseamento das suspensões de nanocápsulas contendo 4,8 mg/mL (NC_{0 4,8}) e 1 mg/mL (NC_{0 1,0}) de OMC obtido por CLAE.

6.2. Avaliação da inserção de triglicerídeos de cadeia média (TCM) no núcleo da formulação NC₀

6.2.1. Caracterização físico-química

A formulação NC₀ foi aquela que apresentou melhor estabilidade. Dessa forma, a essa formulação foi adicionado TCM, o qual já é descrito como óleo constituinte do núcleo de nanocápsulas (GUTERRES et al., 1995; DALENÇON et al., 1997; MÜLLER et al., 2000; SCHAFFAZICK et al., 2002; ALVES et al., 2005; SCHAFFAZICK et al., 2006; POHLMANN et al., 2008; PAESE et al., 2008; FIEL et al., 2011; HOFFMEISTER et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013). Assim, pôde-se avaliar a influência da inserção desse óleo nos estudos de caracterização, avaliação da capacidade fotoprotetora, capacidade absorviva e penetração cutânea. Esta formulação foi denominada de NC₁.

A análise por difratometria de laser (Figura 14) demonstrou que a formulação NC₁ apresentou distribuição unimodal de partículas, com tamanho de partícula médio nanométrico.

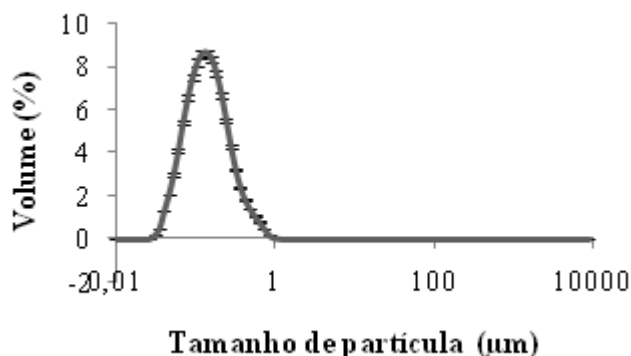


Figura 14. Distribuição do tamanho de partícula (μm) por volume (%) através de difratometria de laser da formulação NC₁ por difratometria de laser ($\pm\text{dp}$).

A análise das características físico-químicas da formulação NC₁ está demonstrada na **Tabela 16**. As formulações apresentaram diâmetro entre 80-200 nm, característico de nanocápsulas preparadas através do método de precipitação de polímero pré-formado (WEISS-ANGELI et al., 2008; ALVAREZ-ROMÁN et al., 2001). Observa-se que a adição de TCM no núcleo oleoso de NC₁ ocasionou o aumento do tamanho de partícula, em relação às demais formulações não contendo TCM (item 6.1.1). Em relação aos valores de PDI, obtiveram-se valores baixos, indicando que essa formulação, da mesma forma como as formulações contendo somente OMC, apresentou distribuição homogênea de partículas (VERMA et al., 2003).

Tabela 14. Caracterização da formulação NC₁ e NC₀ por espectroscopia de correlação de fótons, mobilidade eletroforética e potenciômetro ($\pm\text{dp}$).

Parâmetro	Resultado de NC ₁	Resultado de NC ₀ *
Tamanho de partícula	164, 25 \pm 6,79 nm ^a	108,7 \pm 1,2 nm ^b
PDI	0,15 \pm 0,03	0,20 \pm 0,05
Potencial zeta	-15,69 \pm 6,28 mV	-18,66 \pm 4,27 mV
pH	4,41 \pm 0,14	4,54 \pm 0,11

*As médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância

Os valores de pH obtidos foram similares àqueles apresentados pelas formulações contendo somente OMC ($p > 0,05$).

A **Figura 15** apresenta os resultados obtidos após análise por espalhamento múltiplo de luz, os quais podem refletir diferentes fenômenos de instabilidade. Pelo fato dessa formulação apresentar aspecto esbranquiçado, os valores de transmissão foram menores que 0,02%, sendo analisado somente o resultado de retroespalhamento. A análise do gráfico demonstra uma redução do retroespalhamento no topo o que pode indicar uma tendência à sedimentação (TURBISCAN LAB USER GUIDE, 2005), contudo, para nanopartículas, esse fenômeno já é descrito como reversível (SILVA et al., 2013; HOFFMEISTER et al., 2012; PAESE, 2008). Além disso, a ausência de alteração do tamanho de partícula (que estaria indicado por um aumento do sinal ao longo da cubeta) indica a baixa tendência para essa formulação na ocorrência de fenômenos de agregação irreversíveis.

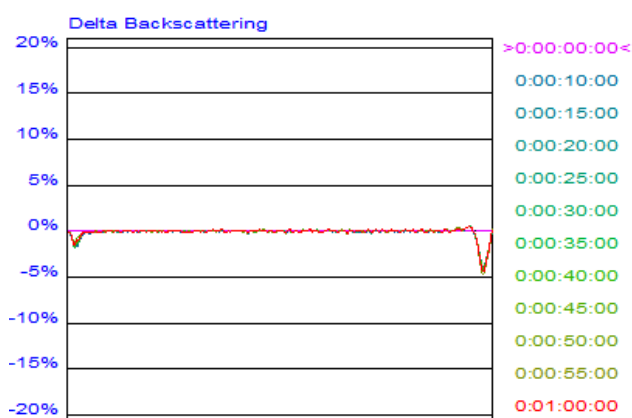


Figura 15. Variações de retroespalhamento da formulação NC₁ obtido por espalhamento múltiplo de luz.

Após a quantificação do OMC encapsulado em NC₁ por cromatografia líquida de alta eficiência, obteve-se teor médio, em triplicata, de $1,05 \pm 0,03$ mg de OMC. Obteve-se, portanto para cada uma das replicatas analisadas teores próximos ao teórico (1 mg/mL).

Então, após o preparo e caracterização de NC₁, obtiveram-se formulações com tamanho exclusivamente nanométrico, com baixo índice de polidispersão e com baixa tendência a fenômenos de instabilidade. A determinação do teor de filtro solar também

demonstrou a proximidade dos valores teóricos e experimentais. Assim, essa nova formulação, assim como aquelas contendo somente OMC no núcleo oleoso, apresentou qualidade nanotecnológica, sendo adequada para aplicação cutânea.

6.2.2. Caracterização das formulações pulverulentas preparadas a partir de NC₀ e NC₁

A lactose é um dissacarídeo obtido do leite, formado por uma unidade de glicose e uma da galactose. Possui aplicações na tecnologia farmacêutica como diluente em comprimidos e cápsulas, assim como adjuvante de secagem utilizado em produtos liofilizados (ROWE et al., 2009). Dessa forma, para a secagem das suspensões nanoparticuladas desenvolvidas, esse foi o adjuvante selecionado.

Após o preparo e caracterização, as suspensões de nanocápsulas contendo somente OMC (1 mg/mL) foram submetidas à secagem por aspersão formando assim nanocápsulas secas denominadas de NC_{0s} e NC_{1s}. O rendimento de secagem obtido foi de $77,33 \pm 1,52\%$ para NC_{0s} e de $69,98 \pm 7,09\%$ para NC_{1s}. Esses pós também apresentaram teor de OMC de $6,66 \pm 0,06$ mg/g pó para NC_{0s} e de $6,32 \pm 0,02$ mg/g de pó para NC_{1s}, obtendo recuperação próxima a 90% para ambas formulações.

A morfologia das formulações foi determinada através de microscopia eletrônica de varredura. A observação das fotomicrografias (Figura 16) permitiu verificar diferenças morfológicas entre o adjuvante de secagem e os pós das suspensões de nanocápsulas, o que já havia sido anteriormente descrito (HOFFMEISTER et al., 2012). As formulações de nanocápsulas secas, visualizada no aumento de 15.000 vezes, apresentaram uma estrutura esférica, com a presença de irregularidades.

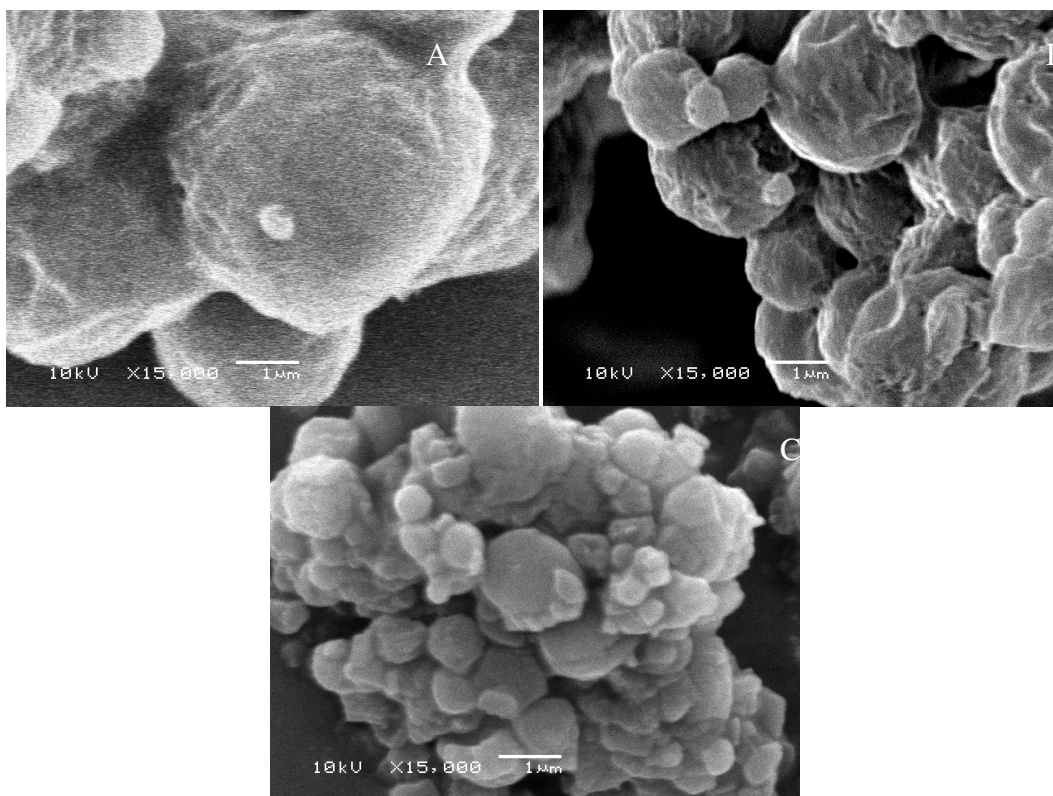


Figura 16. Fotomicrografias dos pós NC_0 (A) NC_1 (B) e do adjuvante de secagem (B) em aumento de 15.000 vezes por microscopia eletrônica de varredura.

Em estudo prévio, o uso da lactose como adjuvante propiciou uma secagem adequada com posterior possibilidade de desaglomeração das partículas quando adicionadas em água. Esse resultado demonstrou ser possível a retomada da suspensão coloidal, mesmo após o procedimento de secagem (TEWA-TAGNE et al., 2007).

A avaliação por via úmida pode ser importante para relacionar o tamanho final obtido, após estudo de desaglomeração, com o tamanho de partícula verificado após incorporação desses pós em formas semissólidas aquosas. Assim, as nanocápsulas secas obtidas neste trabalho foram submetidas à análise de tamanho de partícula em meio aquoso, para verificar o comportamento de desaglomeração.

Os gráficos de distribuição de tamanho de partícula encontram-se apresentados na Figura 17. Para ambas as formulações, na primeira análise (no tempo 0), verificou-se que mesmo após a secagem por aspersão, partículas nanométricas estavam presentes na formulação (Figura 17A e 17B). Após 60 minutos de análise, os gráficos de distribuição

de tamanho de partícula demonstraram que essa população nanométrica aumentou em relação à população micrométrica. Para NC_0s , após 1 hora de análise, o tamanho $D(4,3)$ obtido foi de, aproximadamente, 2 μm (Figura 17C). Para NC_1s , observou-se maior desaglomeração das partículas, em relação à NC_0s , obtendo-se tamanho de 546 nm após 60 minutos de análise (Figura 17D).

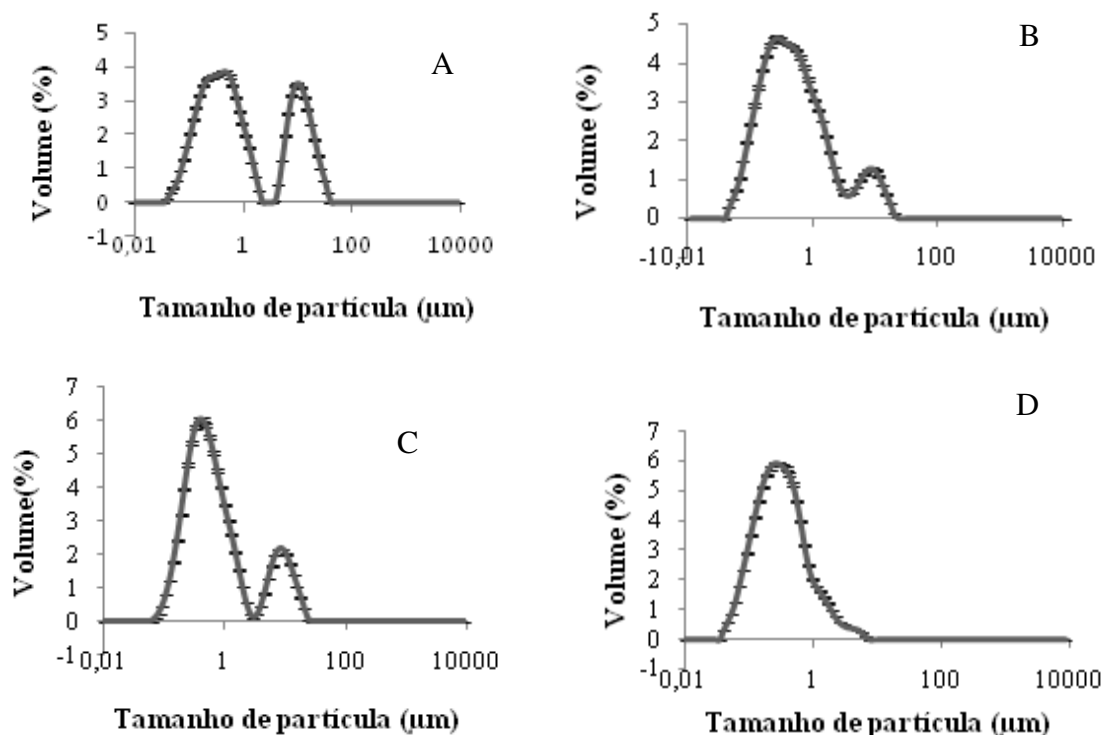


Figura 17. Distribuição do tamanho de partícula (μm) por volume (%) das nanocápsulas secas por difratometria de laser, onde (A) corresponde ao tamanho de partícula no tempo 0 de NC_0s , (B) corresponde ao tamanho de partícula no tempo 0 de NC_1s , (C) corresponde ao tamanho de partícula no tempo 60 minutos de NC_0s , (D) corresponde ao tamanho de partícula no tempo 60 minutos de NC_1s .

A determinação do diâmetro de partículas destas formulações por via seca (Tabela 15) foi realizada para verificar o comportamento na ausência de água. Além disso, essa análise também foi realizada para avaliar a homogeneidade das diferentes formulações desenvolvidas em comparação com o adjuvante de secagem (lactose). A análise dos pós, através de $d(0,1)$, $d(0,5)$, $d(0,9)$ e $d(4,3)$, demonstra que NC_1s apresentou tamanho de partícula maior que NC_0s e lactose. Contudo, o menor valor de Span obtido (por via seca) para essa formulação pode indicar a maior homogeneidade de tamanho. Essa maior homogeneidade foi observada também no estudo de desaglomeração via úmida

(Figura 17), onde a formulação NC_{1s} apresentou menor distribuição do tamanho de partícula que NC_{0s}, tanto no tempo 0 como após 1 hora de análise.

Tabela 15. Distribuição granulométrica da lactose nebulizada e nanocápsulas secas por via seca (em μm) por difratometria de laser ($\pm\text{dp}$).

Formulação	Diâmetro (d 4,3)	d (0,5)	d (0,1)	d(0,9)	Span
Lactose nebulizada	2,501 \pm 0,083	2,539 \pm 0,063	1,387 \pm 0,059	3,834 \pm 0,145	1,037 \pm 0,037
NC _{0s}	2,369 \pm 0,032	2,254 \pm 0,029	1,316 \pm 0,021	3,615 \pm 0,045	1,020 \pm 0,005
NC _{1s}	4,728 \pm 0,269	4,540 \pm 0,152	3,251 \pm 0,536	6,431 \pm 1,260	0,694 \pm 0,380

6.2.3. Estudo do gradiente de densidade de nanocápsulas, nanoemulsão e nanoesferas contendo OMC

O estudo do gradiente de densidade das formulações foi realizado com o intuito de verificar se haveria a formação de diferentes estruturas concomitantemente com a formação de nanocápsulas, sendo um parâmetro de avaliação da qualidade da formulação. Nesta técnica as partículas se concentram em uma zona correspondente à sua densidade. Como a densidade das nanocápsulas fica entre aquela apresentada pelo óleo e pelo polímero, e a densidade apresentada pelas nanoesferas é igual aquela apresenta pelo polímero, é possível distinguir nanocápsulas de nanoesferas (COUVREUR et al., 2002).

Até o momento não há trabalhos descritos na literatura envolvendo este estudo para suspensões de nanocápsulas com o polímero Eudragit S100[®]. Assim, foram preparadas além das nanocápsulas contendo OMC (NC₀) e nanocápsulas contendo OMC e TCM (NC₁), nanocápsulas apenas com TCM (NC_{TCM}), nanoesferas (NS), e uma nanoemulsão de OMC (NE_{OMC}). Essas formulações foram usadas como comparativos

para verificar a presença de nanoestruturas nas formulações objeto desse estudo (NC₀ e NC₁) (Figura 18).

As formulações de nanoesferas e nanoemulsão apresentaram duas bandas distintas, uma referente às suas respectivas partículas e uma segunda gerada provavelmente por uma dispersão do monoestearato de sorbitano estabilizado por polissorbato 80 (JÄGER, 2008). Todas as demais formulações também apresentaram essa banda, o que reforça a hipótese que ela seja proveniente de uma dispersão do monoestearato de sorbitano (matéria-prima comum a todas as formulações). A formulação de nanocápsulas NC₀ apresentou duas bandas. A primeira se apresentou bem espessa, na mesma altura apresentada pela banda da nanoesfera, da nanoemulsão e das nanocápsulas de TCM. Embora não seja possível afirmar que coexistam diferentes bandas misturadas, a sua espessura pode ser um indicativo de pelo menos uma banda adicional à de nanocápsulas. A segunda banda deve-se provavelmente à dispersão do monoestearato de sorbitano (JÄGER,2008).

A formulação NC₁ também apresentou as mesmas duas bandas, contudo, a primeira banda foi mais estreita, com tamanho e posição similar a banda apresentada pelas nanocápsulas de TCM. Com base nesses resultados, acredita-se que a formulação NC₀ tenha uma maior tendência à formação de partículas diferentes das nanocápsulas (como nanoesferas, por exemplo). Esse resultado é esperado, uma vez que a formulação NC₀ apresenta apenas 1mg/mL de óleo como formador do núcleo lipídico, já a formulação NC₁ é formada por 17 mg/mL de óleo (16 mg/mL de TCM e 1 mg/mL de OMC). Dessa forma, é possível que na formulação NC₀ esteja sobrando polímero em relação à quantidade de óleo, formando nanoesferas concomitantemente. A presença de menor mistura de partículas em NC₁ pode ser a explicação para a maior homogeneidade de partículas no insumo seco preparado a partir de NC₁ (NC_{1 s}) (item 6.2.2).

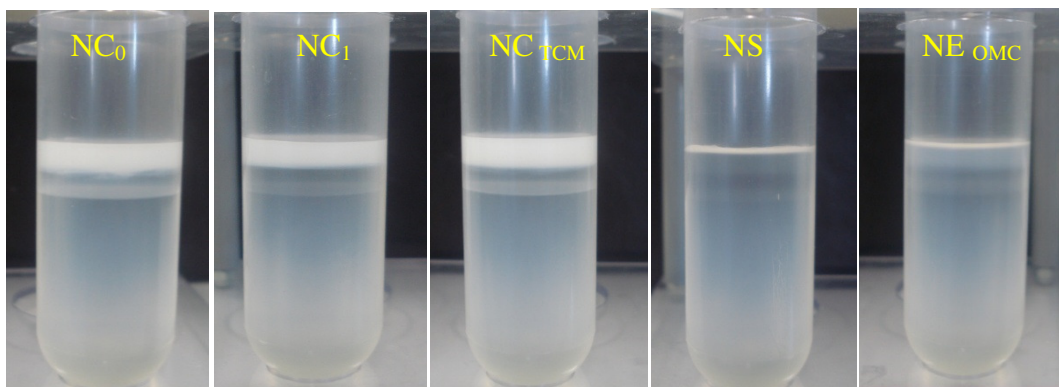


Figura 18. Resultados da análise do gradiente de densidade das formulações: NC₀, NC₁, NC_{TCM}, NS, NE_{OMC}.

6.2.4. Avaliação da fotoestabilidade do OMC nanoencapsulado

O filtro solar ideal é aquele que não sofre reações fotoquímicas. A ocorrência de decomposição do filtro reduz a sua capacidade de absorver a radiação, podendo também levar a reações fototóxicas e fotoalérgicas (CHATELAIN; GABARD, 2001). Em estudo realizado por Marrot e colaboradores (2004), foi avaliado o dano genético através da detecção de p53, em cultura de queratinócitos tratados com fotoprotetores fotoestáveis ou fotoinstáveis, após irradiação em simulador solar. A formulação fotoinstável induziu maior acúmulo de p53 em cultura de queratinócitos em relação a células tratadas com formulação fotoestável. Assim, a obtenção de um produto fotoestável é importante para evitar o dano genético induzido pela radiação. O OMC é um dos filtros solares mais utilizados em protetores solares, sendo a sua fotoisomerização relacionada à redução do FPS de 10% a 38 % dependendo do grau de isomerização do filtro solar (HUONG et al., 2007).

Assim, a encapsulação do filtro consiste em uma estratégia interessante, sendo descrita por vários autores (WEISS-ANGELI et al., 2008; PUGLIA et al., 2012; CARLOTTI et al., 2005; PERUGINI et al., 2002). Com o intuito de avaliar o aumento da fotoestabilidade do OMC com a nanoencapsulação, a análise da fotoestabilidade foi realizada por um período de 24 horas, sob radiação UVB, sob a qual se tem a ação do metoxicinamato de octila. A intensidade da radiação UVB de $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ W cm}^{-2}$ utilizada

no estudo é similar à radiação UVB emitida pelo sol ($1,3 \cdot 10^{-4} \text{ W cm}^{-2}$) (CARLOTTI et al., 2005), podendo então corresponder a situação real após exposição solar.

A degradação do OMC de cada uma das formulações durante o período de 24 horas está apresentada na Figura 17. Durante toda a análise, o OMC da solução metanólica (Sol.) foi aquele que mais sofreu degradação. Em 30 minutos de exposição à radiação, a concentração sofreu queda de 50% e em 1 hora de análise a concentração obtida foi de 35%. A partir de 4 horas de análise, a degradação continuou ocorrendo, obtendo-se concentração próxima a 30% até o fim da análise. A baixa fotoestabilidade é explicada pela isomerização do mesmo, onde a incidência da radiação ultravioleta sobre o OMC provoca a sua isomerização a cis-OMC, o qual apresenta menor capacidade de absorver a radiação UV (PATTANARGSON et al., 2004).

Para as suspensões de nanocápsulas, observa-se menor fotodegradação do OMC em relação à solução. Após 30 minutos, a concentração do OMC de NC₀ e NC₁ foi de 62% e 95% respectivamente. Esse dado já demonstra que NC₁, logo no início da exposição à radiação, apresentou maior efeito estabilizante. Em 4 horas de exposição, a concentração de OMC manteve-se em 49% e 65% para NC₀ e NC₁, respectivamente. A formulação NC₁ mostrou-se mais eficiente em evitar a degradação do OMC, durante todo período de análise. Portanto, verificou-se que a encapsulação é eficiente na fotoestabilização do OMC. O efeito protetor conferido pelas suspensões pode ser devido ao espalhamento de luz conferido pelas nanopartículas, reduzindo a intensidade de radiação que incide sobre o OMC (CARLOTTI et al., 2005). Além disso, observou-se também a influência da composição do núcleo oleoso das nanocápsulas na estabilidade do OMC. O maior efeito protetor conferido pela suspensão NC₁ pode ser explicado pela presença de TCM.

Para as formas pulverulentas, observou-se maior efeito fotoestabilizante para NC_{1s}. Embora a concentração, em 30 minutos de exposição, do OMC de NC_{1s} (81%) tenha sido menor que o OMC de NC_{0s} formulação NC_{0s} (92%), ela foi menos suscetível à degradação. Após 24 horas, a concentração de OMC de foi de 56% e de 35% para NC_{1s} e NC_{0s}, respectivamente. Assim, pode-se determinar que a secagem da formulação NC₁, é capaz de proporcionar efeito adicional na fotoestabilização do OMC. Uma vez que a sua forma líquida (NC₁) também foi capaz de aumentar a fotoestabilização do

OMC, fica evidente que a presença de TCM foi necessária para garantir maior estabilização do filtro solar. Puglia e colaboradores (2012) também verificaram que o TCM apresenta efeito fotoestabilizante sobre o OMC. Devido a alta afinidade entre OMC e TCM, a presença de TCM pode ter favorecido a localização do OMC no núcleo das nanocápsulas. Além disso, também é possível evitar a formação de nanoesferas, descrito para NC₀ (item 6.2.3), que apresentam menor carga.

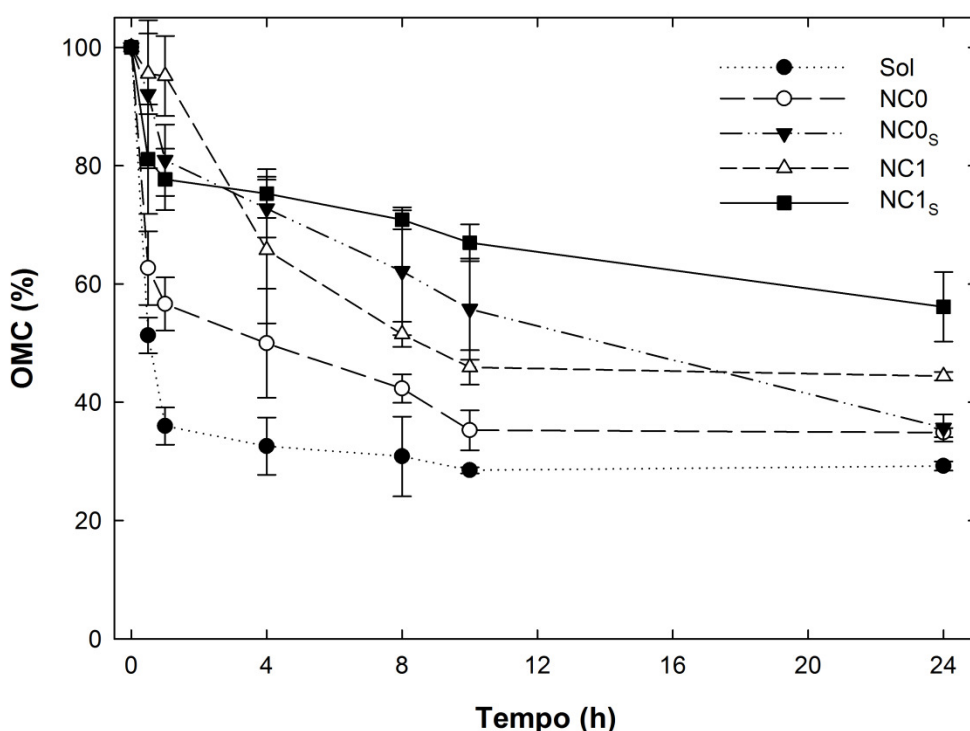


Figura 17. Concentração de OMC nas nanocápsulas, nanocápsulas secas e solução metanólica em função do tempo sob radiação UVB. Sol: solução metanólica de OMC.

Observa-se pela primeira vez que a obtenção de formulações pulverulentas contendo filtro solar e triglicerídeos de cadeia média é eficiente na fotoestabilização do OMC, podendo ser este tipo de sistema carreador aplicado para encapsulação de outros agentes fotoinstáveis. Assim, com a nanoencapsulação, especialmente, para NC₁ e NC_{1s}, foi possível aumentar a fotoestabilidade do OMC. Esse resultado pode acarretar uma melhor capacidade de absorção da radiação pelo filtro solar, evitando alterações no FPS após exposição à radiação ultravioleta (HOUNG et al., 2007). Além disso, com essas novas formulações desenvolvidas, evitando-se a fotodegradação, a ocorrência de toxicidade relacionada com a formação do isômero cis pode ser reduzida (BUTT; CHRISTENSEN, 2000).

As suspensões NC_0 e NC_1 expostas à radiação também foram analisadas quanto ao seu potencial zeta e tamanho, com intuito de verificar possíveis alterações ocasionadas pela irradiação. O potencial zeta de ambas as formulações manteve valores similares àqueles apresentados pelas formulações antes da exposição à radiação (Figura 18).

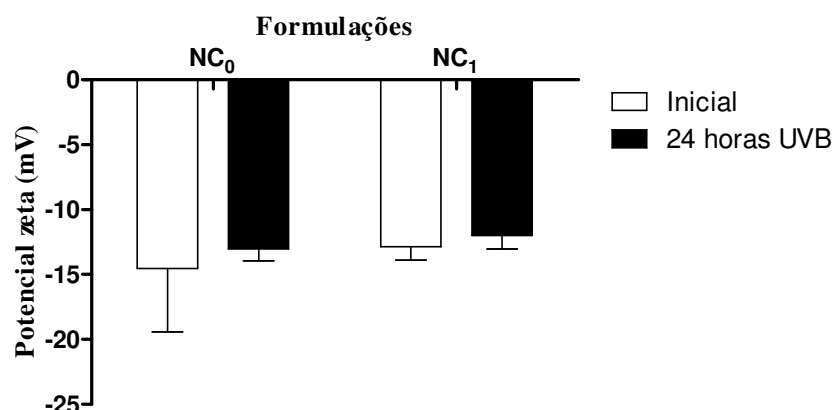


Figura 18. Potencial zeta das formulações antes e após a exposição à radiação UVB (\pm dp).

Os valores obtidos de tamanho de partícula e índice de polidispersão (PDI) estão descritos nas Figuras 19 e 20. A suspensão NC_1 apresentou após a irradiação, um tamanho de partícula levemente inferior àquele inicialmente obtido. Os valores de PDI também se mantiveram similares àqueles sem irradiação. Por sua vez, a formulação NC_0 , apresentou alteração no tamanho de partícula e PDI após irradiação, indicando a ocorrência de uma possível agregação da amostra indicada pelo aumento na polidispersão da mesma. No estudo do gradiente de densidade essa formulação apresentou maior tendência à mistura de partículas, que pode ter ficado ainda mais pronunciada após a irradiação. Assim, verifica-se a importância da obtenção de formulações com menor mistura de partículas, formando especialmente nanocápsulas, onde o OMC permanecendo no núcleo dessas fica protegido, apresentando menor degradação frente à radiação ultravioleta.

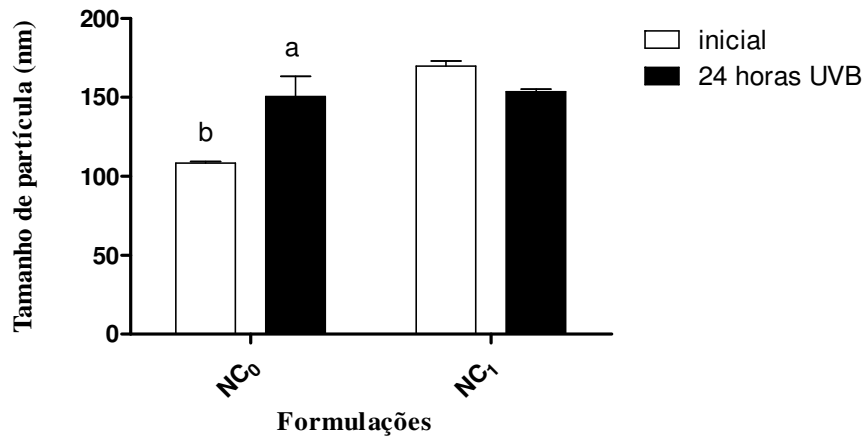


Figura 19. Tamanho de partícula das suspensões de nanocápsulas por espectroscopia de correlação de fótons, antes e após a exposição à radiação UVB (\pm dp). As médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

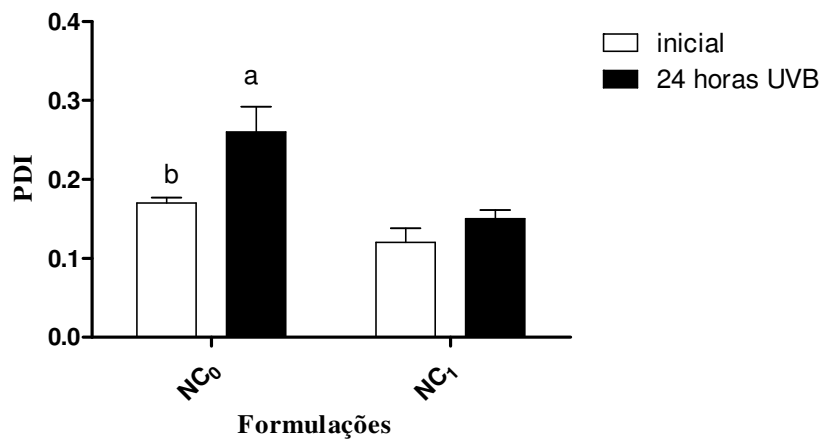


Figura 20. Índice de polidispersão (PDI) das suspensões de nanocápsulas por espectroscopia de correlação de fótons, antes e após a exposição à radiação UVB (\pm dp). As médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O tamanho de partícula das formas sólidas (NC_{0s} e NC_{1s}), obtido por difratometria de laser, foi de $2,369 \pm 0,032 \mu\text{m}$ e $4,728 \pm 0,274 \mu\text{m}$, respectivamente, antes da exposição à radiação. Após 24 de exposição à radiação os tamanhos obtidos ficaram próximos à $5,88 \mu\text{m}$ para NC_{0s} e $7,19 \mu\text{m}$ para NC_{1s} . Para ambas as formulações observou-se que houve agregação das partículas. Esse resultado pode ter sido devido em parte a uma absorção de água do ambiente por parte do adjuvante de secagem (lactose) ocasionando o aumento no tamanho de partícula. Quando a lactose monoidratada é submetida à secagem por aspersão, origina-se lactose amorfa, a qual é altamente higroscópica (HAQUE; ROOS, 2005). Embora se tenha observado o aumento do tamanho de partícula, esse não representa um fator limitante, visto que as nanocápsulas secas desenvolvidos são destinadas à aplicação tópica.

6.2.5. Caracterização das formas semissólidas

A escolha de um veículo adequado é importante para garantir aceitação cosmética pelo consumidor. Entre as formas que possuem grande aceitabilidade cosmética estão os géis classificados em géis alcoólicos, géis oleosos e hidrogéis (MITSUI, 1997). Os géis alcoólicos permitem aumentar podem provocar a desidratação cutânea. Além disso, o emprego de etanol também pode reduzir a eficácia dos fotoprotetores, uma vez que após aplicação da formulação na pele e exposição à radiação e calor, o álcool seca rapidamente fazendo com que se forma um filme descontínuo na pele (SHAATH, 2005). Os géis oleosos fornecem óleo para a pele e podem ser aplicados em produtos de uso no inverno ou em indivíduos com pele seca, em função da sua característica hidratante (SHAATH, 2005).

Os hidrogéis ou géis hidrofílicos devem conter na sua composição filtros solares solúveis em água ou contendo agentes capazes de solubilizá-los, mas ainda assim manter a característica de transparência ou semi-transparência do gel (SHAATH, 2005). Esse tipo de formulação proporciona uma sensação fresca na pele, sendo adequada para uso no verão e em peles oleosas (MITSUI, 1997).

Os hidrogéis, também denominados de géis hidrofílicos têm como característica o fácil espalhamento e a característica não-oleosas, sendo indicados para aplicação tópica, em peles oleosas, mistas ou normais (CORRÊA et al., 2005). Essas formulações são constituídas de moléculas pequenas ou grandes dispersas em um veículo líquido aquoso, formando uma estrutura de aspecto gelatinoso, após adição de um agente gelificante. Dentre esses agentes formadores de gel estão os derivados de celulose (carboximetilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose) e os carbômeros (ALLEN JUNIOR et al., 2013).

Nesse trabalho, os nanoinsumos previamente preparados e caracterizados foram incorporados em hidrogéis de Carbopol 980[®] para possibilitar a aplicação tópica destes e para a realização dos estudos posteriores de penetração cutânea, avaliação da capacidade fotoprotetora e capacidade absorviva. Dessa forma, estando os filtros solares lipofílicos alvos desse estudo, encapsulados, torna-se possível a incorporação em géis hidrofílicos.

A Figura 21 mostra as fotografias dos hidrogéis contendo OMC. Todos hidrogéis apresentaram aspecto brilhoso, homogêneo e com boa espalhabilidade. Os géis contendo OMC livre apresentaram cor transparente, com aspecto brilhoso e homogêneo. Os géis contendo nanocápsulas secas (NC_{0 s} e NC_{1 s}) e nanocápsulas aquosas (NC₀ e NC₁) apresentaram coloração esbranquiçada. Em relação ao aspecto apresentado pelos géis contendo os pós, os géis g_{NC0s} apresentaram a presença de grumos mais difíceis de dispersar. A formulação g_{NC1s} apresentou melhor aspecto que g_{NC0s}, sem a presença de grumos. Embora a análise das características organolépticas seja um parâmetro subjetivo, pode ser importante para garantir que possíveis alterações que possam ocorrer no produto, não irão afetar a efetividade do produto, bem como a aceitação pelo consumidor.

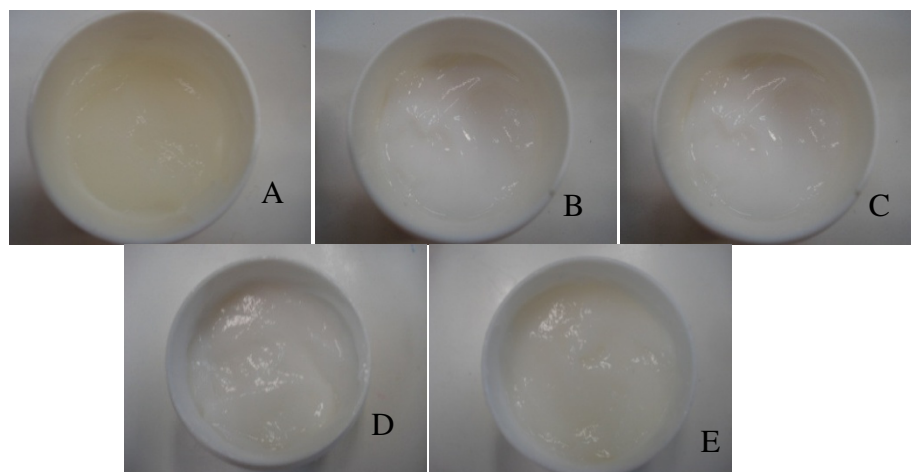


Figura 21. Fotografias dos géis contendo OMC na forma, contendo suspensões de nanocápsulas ou nanocápsulas secas (A: g_{OMC}, B: g_{NC0}; C: g_{NC1}; D: g_{NC0s}; E: g_{NC1s}).

A Tabela 16 apresenta os valores de pH de cada um dos semissólidos. As formulações não apresentaram diferenças entre si relacionando-se os valores de pH obtidos ($p > 0,05$), ficando próximos a 5. De acordo com Marrakchi & Maibach (2007), são observadas diferenças de pH entre as diferentes regiões da face, com valores variando entre 4,43 e 5,55. Assim, as formulações fotoprotetoras desenvolvidas sejam apropriadas para esse fim.

Tabela 16. Valores de pH das formulações semissólidas: g_{OMC} (gel contendo OMC livre), g_{NC0} (gel contendo a suspensão NC₀), g_{NC1} (gel contendo a suspensão de NC₁), g_{NC0s} (gel contendo a formulação pulverulenta NC_{0s}), g_{NC1s} (gel contendo a formulação pulverulenta NC_{1s}) ($\pm dp$).

Formulação	pH
g _{OMC}	5,65 ± 0,12
g _{NC0}	5,57 ± 0,05
g _{NC1}	5,55 ± 0,11
g _{NC0s}	5,51 ± 0,04
g _{NC1s}	5,51 ± 0,07

O diâmetro de partículas dispersas nos hidrogéis foi determinado para verificar a presença de nanopartículas mesmo após a adição das mesmas em formas semissólidas

(Figura 22). A formulação g_{OMC} apresentou presença somente de população micrométrica, com $d(0,5)$ de 2,698 μm (Figura 22 A), uma vez que não apresenta nanopartículas em sua composição. Essa formulação também apresentou padrão de distribuição de partículas similar àquele apresentado pelo gel de Carbopol[®] (Figura 22 B). As formulações g_{NC0} (Figura 22 C) e g_{NC1} (Figura 22 D) apresentaram presença de população micrométrica e nanométrica, sendo a primeira população devido à presença do gel. A população nanométrica foi maior para g_{NC1} que para g_{NC0} . Os tamanhos de partícula obtidos foram $d(0,5)$ de 191 nm e 3,907 μm para g_{NC1} e g_{NC0} , respectivamente.

As formulações contendo as nanocápsulas secas (g_{NC0s} e g_{NC1s}) apresentaram tamanhos maiores em relação aos semissólidos contendo as nanocápsulas aquosas. Esse resultado é esperado uma vez, que com a secagem das nanocápsulas, obtém-se um pó de tamanho micrométrico (Tabela 15). Contudo, g_{NC1s} (Figura 22 F), apresentou maior população nanométrica em relação à g_{NC0s} (Figura 22 E), com tamanho $d(0,5)$ de 584 nm. O resultado se correlaciona à desaglomeração do insumo constituinte desse hidrogel, o qual retoma tamanho nanométrico em comparação com o insumo NC_{0s} . A presença de população micrométrica para essas formulações deve-se à presença do gel de Carbopol[®] (Figura 25 B). Por sua vez, o gel g_{NC0s} apresentou maior presença de micropartículas, com tamanho $d(0,5)$ de 32,91 μm (Figura 22 E).

Assim, verifica-se que há a presença de nanopartículas após a incorporação das mesmas em géis, especialmente as formulações g_{NC1} e g_{NC1s} . Esse dado pode ser interessante visto que a manutenção de população nanométrica mesmo após a incorporação das nanocápsulas secas ou líquidas em géis, pode estar diretamente relacionado ao desempenho que essas formulações terão como fotoprotetores.

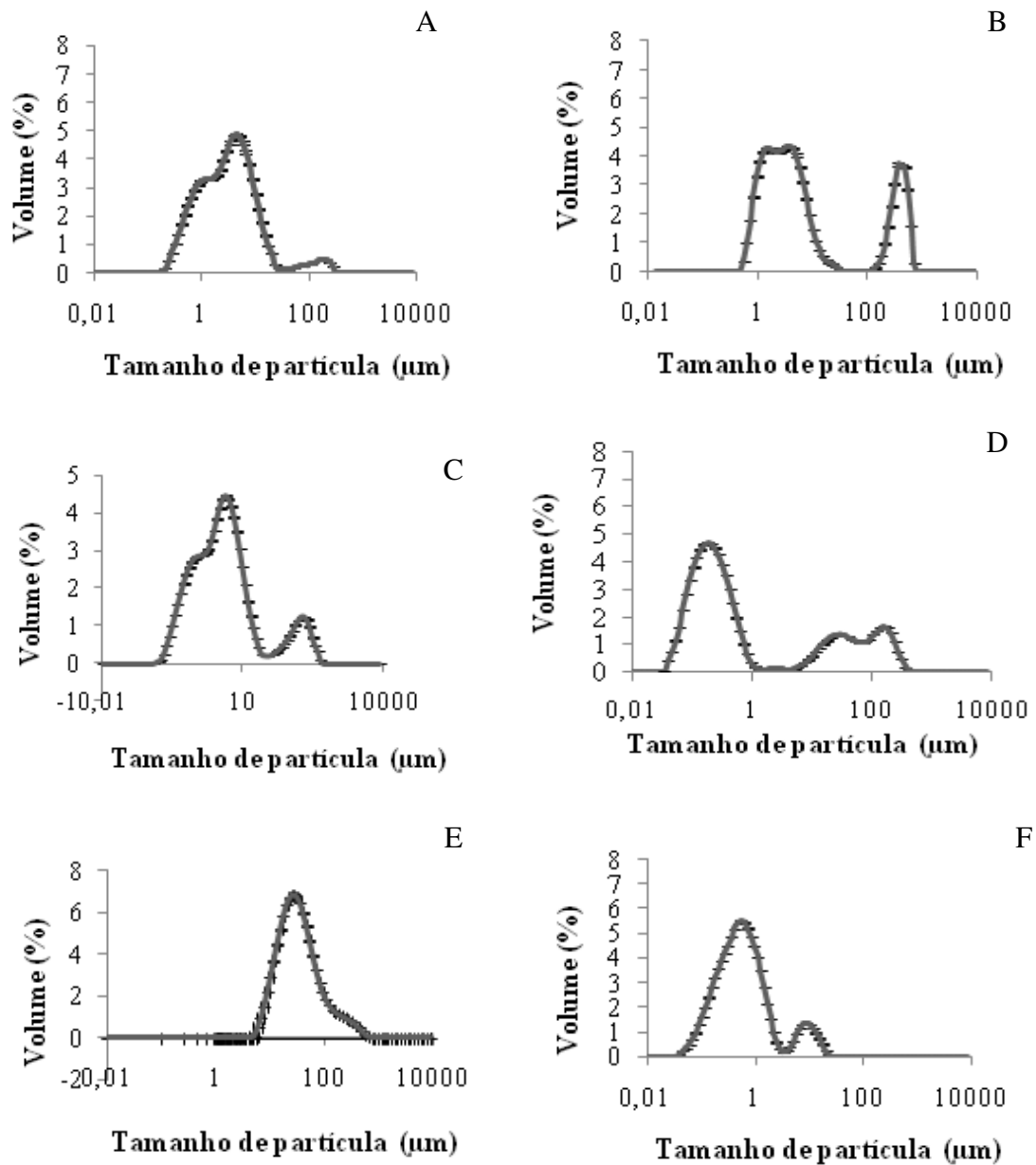


Figura 22. Distribuição do tamanho de partícula médio (μm) em volume (%) das formas semissólidas: g_{OMC} (A), gel de Carbopol[®] branco (B), g_{NC0} (C), g_{NC1} (D), g_{NC0s} (E), g_{NC1s} (F), por difratometria de laser.

A estabilidade de cosméticos deve ser avaliada para garantir a qualidade do produto ao longo do seu tempo de uso bem como garantir que o mesmo seja atrativo para o consumidor. As primeiras análises que devem ser feitas são as propriedades físico-químicas que incluem as avaliações de modificação de cor, odor, separação de fases e sedimentação de partículas (MITSUI, 1997).

Para avaliar de forma mais rápida possíveis fenômenos de precipitação e coalescência procedeu-se a análise por espalhamento múltiplo de luz. Os gráficos referentes à estabilidade das formulações g_{OMC} , g_{NC0} e g_{NC0s} estão apresentados na Figura 23. Para o gel de OMC, pelo fato do mesmo ser transparente, a variação de transmissão foi maior que 0,2% sendo necessária a análise dos gráficos de variação de retroespalhamento (A) e transmissão (B). Para as formulações g_{NC0} e g_{NC0s} , g_{NC1} e g_{NC1s} , a variação da transmissão das formulações foi menor que 0,2%, considerando-se os gráficos de variação de retroespalhamento (C e D). As formulações preparadas demonstraram uma tendência à estabilidade, pois a leve sedimentação observada é um fenômeno reversível e já descrito na literatura para esses tipos de formulações cosméticas (FORSTER et al., 1999). As formas semissólidas também demonstraram variação no retroespalhamento na região do meio da cubeta, especialmente a formulação g_{OMC} . Essa maior variação pode ser devido à presença de bolhas de ar nas formulações, que não puderam ser totalmente removidas antes do início das análises. Essa formulação também apresentou maior variação nos valores de transmissão no topo da cubeta, indicando a sua maior tendência à sedimentação em relação aos semissólidos contendo nanocápsulas

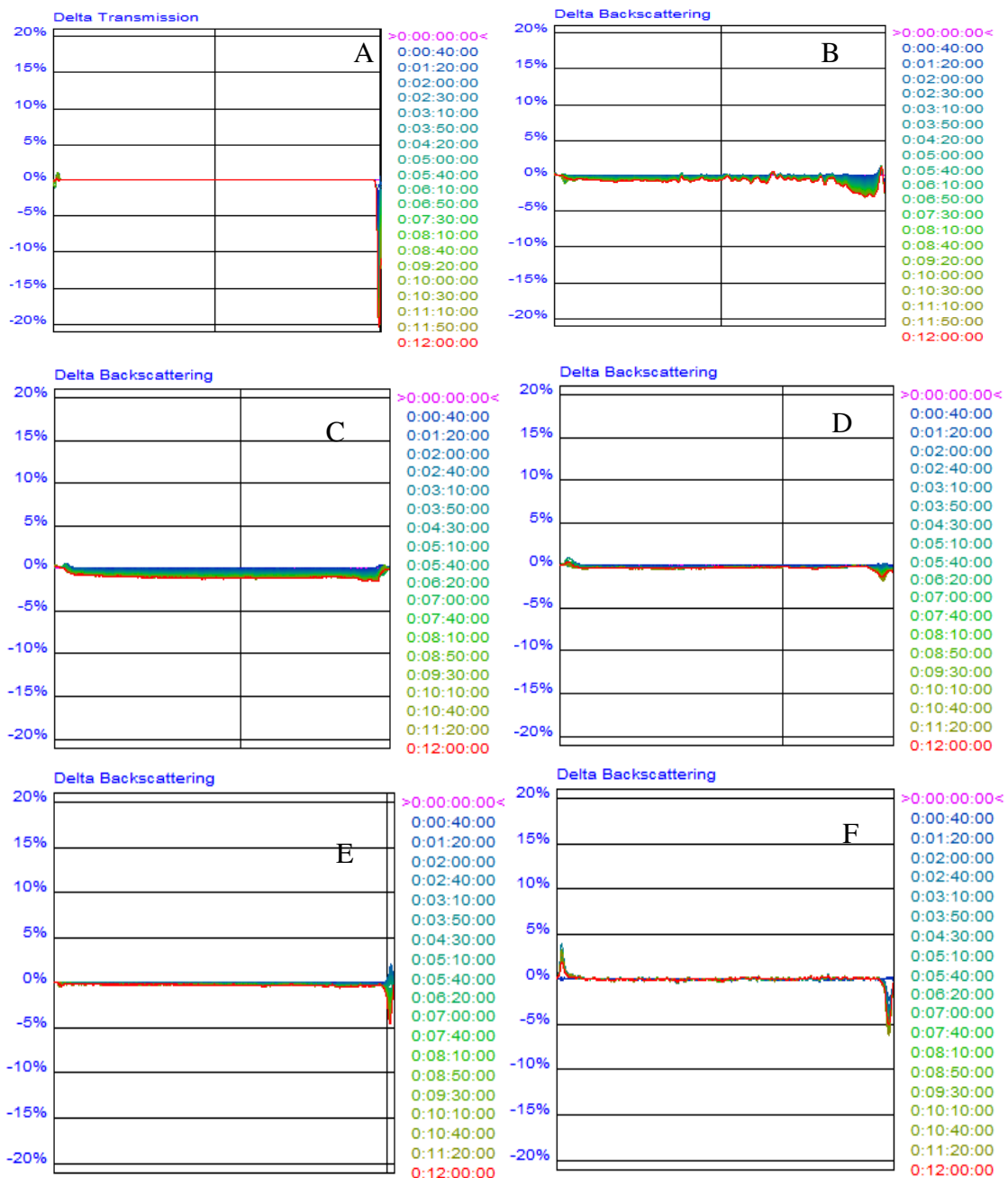


Figura 23. Gráficos de variação da transmissão (A) e retroespalhamento de g_{OMC} (B) g_{NC0} (C) e g_{NC0s} (D), g_{NC1} (E) e g_{NC1s} (F) obtidos por espalhamento múltiplo de luz.

6.2.6. Reologia das formulações semissólidas

A reologia estuda o escoamento de um material quando sobre o mesmo é aplicado uma força. Essa técnica tem sido muito utilizada na caracterização e análise da estabilidade de produtos farmacêuticos, com objetivo de garantir a qualidade lote a lote (ALMEIDA; BAHIA, 2003), assim como garantir uma adequada performance da forma

farmacêutica (AULTON, 2005). Além disso, o comportamento reológico também tem influência na liberação do ativo da forma semissólida (BARRY; WARBURTON, 1968).

Todos os semissólidos preparados nesse trabalho a partir de formulações nanotecnológicas e convencionais apresentaram perfis reológicos do tipo não-newtoniano. A modelagem matemática foi então realizada para determinar qual comportamento não newtoniano melhor descreve cada formulação. Para tal, os valores de coeficiente de regressão dos hidrogéis contendo somente OMC estão apresentados na Tabela 17. Adicionalmente, reogramas de cada hidrogel estão demonstrados na Figura 24.

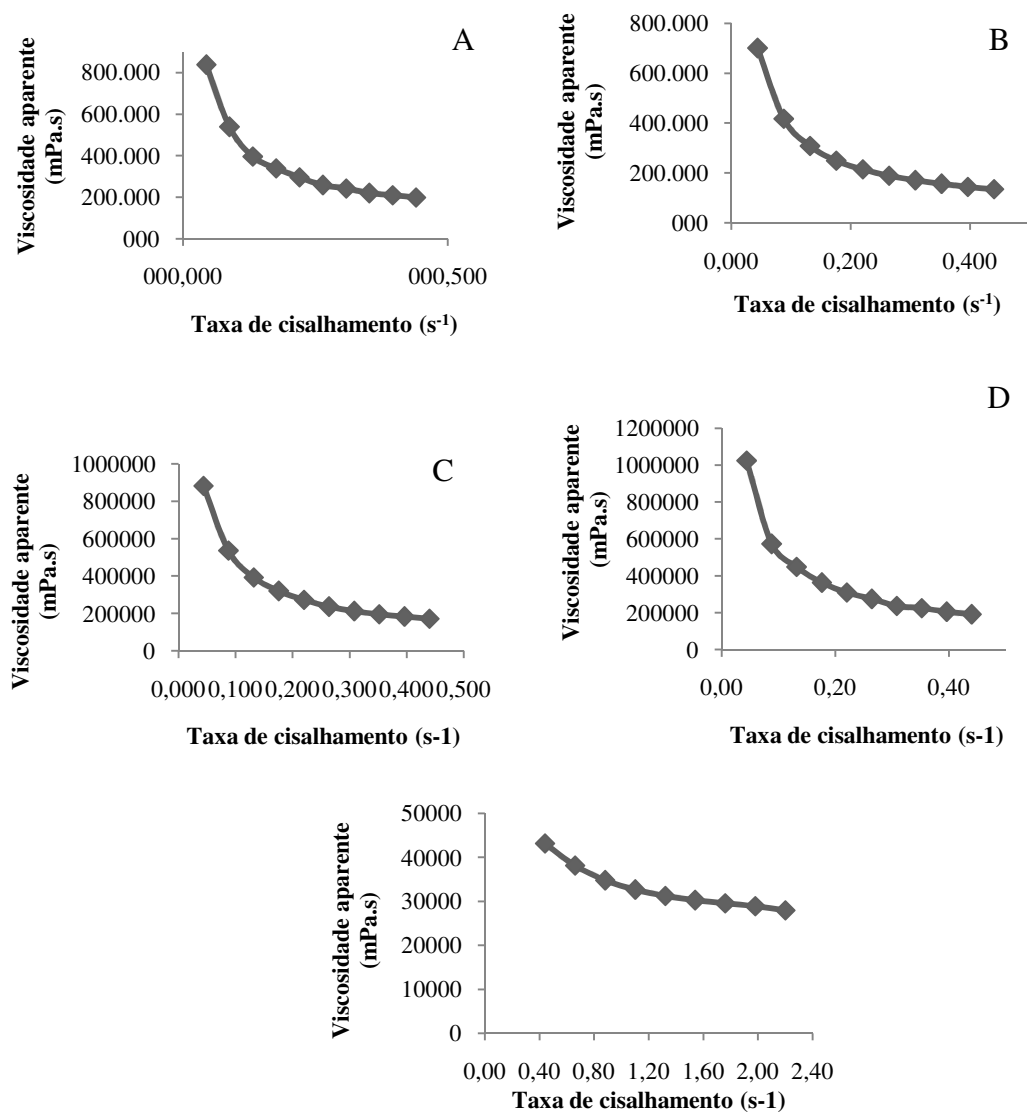


Figura 24. Reograma da viscosidade aparente versus taxa de cisalhamento dos hidrogéis, (A) g_{OMC}, (B) g_{NC0}, (C), g_{NC1}, (D), g_{NC0s}, (E) g_{NC1s}.

Todas as formulações apresentaram tendência a um comportamento pseudoplástico do tipo Ostwald. Estudos prévios já demonstram esse mesmo comportamento pseudoplástico para géis de Carbopol[®]. Corrêa e colaboradores (2005) avaliaram a influência do emprego de diferentes polímeros na obtenção dos géis, bem como a concentração desses. Independente do tipo de polímero usado (Carbopol[®] 940, Carbopol[®] Ultrez e Permulen[®]), foi obtido comportamento pseudoplástico para todas as formulações desenvolvidas (CORREËA et al., 2005). Kim e colaboradores (2003) avaliaram o comportamento reológico de géis de Cabopol[®] 941, verificando que independente da concentração de polímero ou de trietanolamina, o comportamento reológico obtido mantinha-se pseudoplástico do tipo de Ostwald. Esse comportamento pseudoplástico também foi observado para as formas semissólidas contendo nanopartículas (ALVES et al., 2005; PAESE, 2008; SIQUEIRA et al., 2011; CONTRI et al., 2010).

Além disso, esse perfil reológico é interessante para formulações fotoprotetoras, pois pode estar relacionado com o aumento do FPS da formulação já que devido à espalhabilidade conferida por estas formulações, é possível a formação de um filme protetor na pele (GASPAR; CAMPOS, 2003).

Tabela 17. Coeficientes de regressão referentes aos modelos matemáticos que descrevem os comportamentos plástico e pseudoplástico das formas semissólidas g_{OMC} , g_{NC0} e g_{NC0s} , g_{NC1} , g_{NC1s} .

Formulação	Bingham	Casson	Ostwald	Hershel-bulkley
g_{OMC}	$0,9444 \pm 0,0363$	$0,9708 \pm 0,0020$	$0,9859 \pm 0,0004$	$0,7720 \pm 0,047$
g_{NC0}	$0,9889 \pm 0,0081$	$0,9913 \pm 0,0089$	$0,9923 \pm 0,0046$	$0,9773 \pm 0,0175$
g_{NC1}	$0,9656 \pm 0,0362$	$0,9841 \pm 0,0180$	$0,9856 \pm 0,0083$	$0,9426 \pm 0,3171$
g_{NC0s}	$0,9581 \pm 0,0311$	$0,9837 \pm 0,0200$	$0,9851 \pm 0,0140$	$0,6735 \pm 0,1329$
g_{NC1s}	$0,9984 \pm 0,0023$	$0,9988 \pm 0,0007$	$0,9991 \pm 0,0009$	$0,4402 \pm 0,4778$

Para verificar a influência da presença de nanocápsulas no perfil reológico, géis contendo somente o filtro (g_{OMC}) também foram analisados. Esse apresentou comportamento não-newtoniano pseudoplástico, sugerindo que devido à similaridade de comportamento entre as formulações, a presença das suspensões de nanocápsulas não influenciou de forma pronunciada no comportamento reológico, de acordo com achados anteriores da literatura (PAESE, 2008; ALVES et al., 2005).

6.2.7. Avaliação da capacidade fotoprotetora

A avaliação da capacidade fotoprotetora tem por objetivo determinar a capacidade que formulações têm de proteger uma substância fotolábil da degradação após exposição à radiação UV (HOMMOSS, 2008). Neste trabalho, utilizou-se como agente fotolábil o resveratrol, o qual sob ação da radiação ultravioleta sofre isomerização de trans-resveratrol para cis-resveratrol (RODRÍGUEZ et al., 2012).

As formulações nanotecnológicas, bem como o filtro em sua forma livre, tiveram sua capacidade fotoprotetora avaliada através da capacidade de proteção de uma solução de resveratrol, pois o mesmo é uma substância altamente fotoinstável, apresentando tempo de meia-vida de 14,6 minutos (RODRÍGUEZ et al., 2012). Através da modelagem do perfil de fotodegradação do resveratrol, frente à proteção das formulações contendo OMC foi possível determinar o modelo que descreve a degradação, bem como a constante de degradação para cada formulação. Como resultado observou-se que o modelo que melhor descreve esses perfis é o monoexponencial (Tabela 18). A constante k calculada para cada perfil demonstrou que a formulação g_{NC1} foi aquela que mais evitou a degradação do resveratrol em comparação com as demais formulações.

A formulação contendo o OMC na forma livre não foi eficaz na fotoestabilização. No entanto, a formulação g_{NC1} , aumentou em quase 3 vezes o tempo de meia-vida do resveratrol ($p < 0,001$), sendo essa definida como a melhor formulação fotoprotetora. Esse seu melhor desempenho pode ser devido à nanoencapsulação do OMC, ficando protegido de isomerização (item 6.2.4) e aumentando, assim, a sua capacidade de absorver a radiação. Por outro lado, g_{NC0} não aumentou de forma eficaz o tempo de

meia-vida do resveratrol. Esse efeito já era previsto, uma vez que o estudo de fotoestabilidade realizado para a suspensão constituinte desse hidrogel (NC₀), já havia demonstrado uma menor fotoestabilidade para essa formulação. Embora as suspensões secas (NC_{0s} e NC_{1s}) tenham sido capazes de aumentar a fotoestabilidade do OMC, os respectivos hidrogéis não demonstraram resultado satisfatório. Assim, verificou-se que a formulação g_{NC1}, apresentou capacidade fotoprotetora realmente superior às demais, o que faz desta a formulação fotoprotetora mais adequada.

Tabela 18. Parâmetros cinéticos (coeficiente de correlação r, modelo do critério de seleção MSC, constante da velocidade de degradação K, tempo de meia-vida t^{1/2}) do efeito das formulações fotoprotetoras g_{OMC}, g_{NC0}, g_{NC1}, g_{NC0s}, g_{NC1s} na fotodegradação do resveratrol.

Modelo Monoexponencial				
Formulação	r	MSC	k (min ⁻¹)	t _{1/2} (min)
g _{OMC}	0,9743±0,0048	2,2964±0,2444	0,0356±0,0019	19,4299± 2,1729 ^b
g _{NC0}	0,9917±0,0009	2,8333±0,3630	0,0375±0,0035	18,4800± 1,7500 ^b
g _{NC1}	0,9198±0,0347	1,2975±0,0800	0,0100±0,0005	67,3585± 3,3708 ^a
g _{NC0s}	0,9979±0,0010	3,4723±0,2961	0,02857±0,0052	24,7885± 4,4054 ^b
g _{NC1s}	0,9849±0,0024	1,9929±0,5161	0,03066±0,0024	22,6032± 0,4302 ^b

As médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

6.2.8. Avaliação da penetração cutânea dos semissólidos contendo OMC

A avaliação da penetração cutânea foi realizada com intuito de determinar o grau de penetração das diferentes formulações nas camadas da pele, uma vez que os filtros solares devem preferencialmente estar localizados nas camadas mais externas da epiderme, para terem uma ação adequada na captação da luz ultravioleta (JIMÉNEZ et al., 2004).

As Figuras 25, 26 e 27 apresentam os resultados obtidos da penetração cutânea das formulações g_{OMC} , g_{NC_0} , g_{NC_1} , g_{NC_0s} , g_{NC_1s} em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, analisados em dois períodos de tempo diferentes. O tempo de contato do produto com a pele de 2 horas foi primeiramente escolhido devido a este ser o tempo recomendado para reaplicação do filtro solar (DIFFEY, 2001). Já o período de contato de 6 horas (WEISS-ANGELI et al., 2010) foi escolhido por corresponder a uma exposição solar, aproximada, de banhistas em um dia de passeio na praia.

A Figura 25 apresenta os resultados de penetração do OMC proveniente de cada uma das formulações no estrato córneo. A retenção no estrato córneo é importante para fotoprotetores, pois a efetividade destes está relacionada à sua aderência à pele, formando um filme protetor (TREFFEL & GABARD, 1996). Conforme observado nos resultados, a maior parte do OMC proveniente das formulações ficou retida no estrato córneo. Na análise de 2 horas, a formulação g_{NC_1} propiciou maior retenção do OMC do que no tempo de 6 h. Ainda assim, a quantidade retida dessa formulação se apresentou em uma maior quantidade que as demais ($p < 0,001$) para ambos os tempos de análise. Em comparação com g_{OMC} , o aumento da quantidade retida foi de quase 10 vezes. Este resultado aponta para um melhor desempenho das nanocápsulas contendo OMC e TCM (NC_1), as quais podem estar formando uma cobertura mais eficiente na pele (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2001).

As demais formulações não mostraram diferença estatística ($p > 0,05$), inclusive o hidrogel contendo a suspensão NC_0 . Com intuito de explicar o motivo pelo qual a formulação NC_1 obteve maior retenção nessa camada, foram levantadas duas hipóteses. A primeira é de que filtro solar poderia estar apresentando uma interação com o polímero na formulação NC_0 , dificultando a sua cedência para a pele. A adição dos triglicerídeos de cadeia média na formulação NC_1 diminuiria esta possível interação com o polímero e propiciaria maior liberação do OMC da formulação. A segunda hipótese é de que a adição de TCM estaria modificando a difusão do OMC das nanopartículas, aumentando a quantidade liberada.

Em relação às formulações secas incorporadas em hidrogéis (g_{NC_0s} e g_{NC_1s}), observou-se que não houve maior retenção em comparação com seus respectivos hidrogéis contendo apenas a suspensão ou gel contendo OMC na forma livre. Verifica-

se assim que a secagem das suspensões dificultou a retenção do OMC nesta camada. Isso ocorre possivelmente devido a uma incorporação irregular dos pós aos seus respectivos géis, resultado que ainda poderia ser correlacionado à menor capacidade fotoprotetora. Ademais, a secagem das nanocápsulas, obtendo assim micropartículas, pode também levar à menor formação de um filme adesivo na pele em comparação com as nanopartículas (EKAMBARAM et al., 2012), o que por consequência poderia levar à uma menor eficiência dessas formulações na absorção da radiação UV. No tempo de 6 horas (Figura 21), observa-se que também há duas vezes maior retenção do OMC proveniente de g_{NC1} em comparação com g_{OMC} e as demais formulações ($p < 0,001$).

Avaliando-se o efeito do tempo sobre as formulações, verificou-se que em 6 horas há uma redução da quantidade de OMC ($p < 0,001$) retido em comparação ao tempo de 2 horas. Esse resultado pode estar sugerindo que o máximo de concentração de OMC retido, a partir da formulação g_{NC1} , se dá após 2h de aplicação. Após esse período a formulação pode estar degradando ou sendo absorvida pelas demais camadas da pele.

Diferentemente do relatado por Weiss e colaboradores (2010), Jiménez e colaboradores (2004) e Vettor e colaboradores (2010) avaliando a penetração cutânea de semissólidos contendo OMC nanoencapsulado, neste trabalho obteve-se maior retenção no estrato córneo para o filtro solar proveniente de nanopartículas. Esse resultado é desejável, pois o filtro solar deve estar localizado preferencialmente na porção externa do estrato córneo e não na superfície da pele. A localização no estrato córneo permite a sua imobilização, enquanto que a sua localização na superfície da pele pode ocasionar a sua remoção devido ao contato com água ou fricção (GUPTA et al., 1999), dificultando, assim, a sua ação na absorção da radiação. Além disso, o veículo também exerce influência na penetração do filtro solar (YENER et al., 2003; TREFFEL & GABARD, 1996). Com o emprego de veículos hidrofílicos, há haja menor interação entre ele e o filtro solar, favorece uma maior partição e difusão do filtro solar na pele (WALTERS, 2002). Mas, em função da característica altamente lipofílica do OMC ($\log P=5,96$), a sua penetração nas camadas inferiores fica limitada (JIMÉNEZ et al., 2004).

Estrato córneo

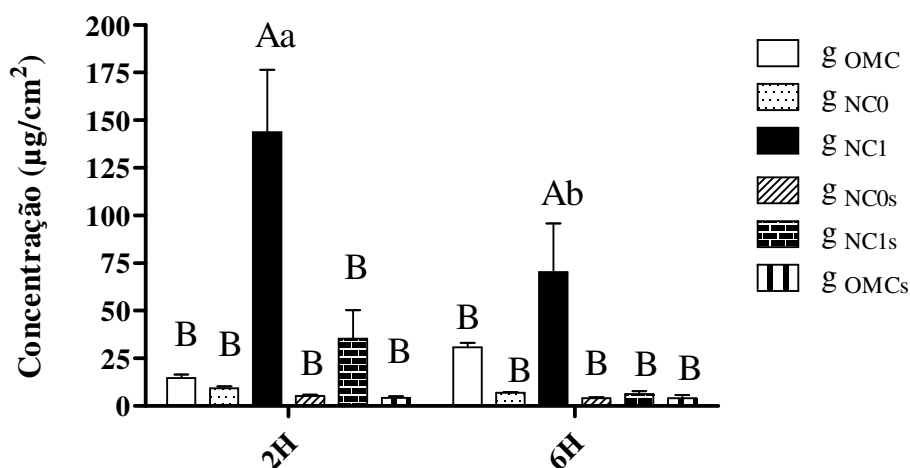


Figura 25. Distribuição do OMC das formulações g OMC, g NC0, g NC1, g NC0s, g NC1s e g OMCs no estrato córneo, no período de 2 horas e 6 horas. As médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem dentro do mesmo período de tempo (2 horas ou 6 horas). As médias seguidas por letras minúsculas iguais não apresentam diferença entre os períodos de tempo (entre 2 horas e 6 horas).

A Figura 26 mostra a penetração do OMC a partir das diferentes formulações na epiderme viável. Após 2 horas de estudo, não foram observadas diferenças entre os perfis de distribuição do OMC ($p > 0,05$) para as diferentes formulações. No tempo de 6h, a formulação g NC1 apresentou maior retenção que g NC0s ($p < 0,001$). As demais formulações apresentaram concentrações semelhantes nessa camada da pele ($p > 0,05$). Além disso, observa-se que há penetração do OMC nessa camada para todas as formulações, inclusive a formulação contendo OMC livre (g OMC) indicando que a retenção nesta camada pode ser uma característica do próprio filtro solar, uma vez que em outros trabalhos (JIMÉNEZ et al., 2004; VETTOR et al., 2010; WEIS-ANGELI et al., 2010) também foi observado esse resultado. Devido ao caráter lipofílico do OMC, esse apresenta maior afinidade por camadas superiores da pele, mesmo para a formulação livre. Assim, a epiderme representa uma barreira à penetração do OMC (WEIS-ANGELI et al., 2010).

Portanto, os resultados demonstram que a formulação g NC1 apresenta maior retenção no estrato córneo, o que faz dela uma melhor formulação fotoprotetora até o momento. No estudo da capacidade fotoprotetora (item 6.2.7), essa formulação também mostrou melhor desempenho, corroborando esse dado. As formulações contendo as suspensões secas não favoreceram a retenção no estrato córneo em relação às demais

formulações. Esses carreadores não seriam, portanto, os mais apropriados para aplicação como fotoprotetores.

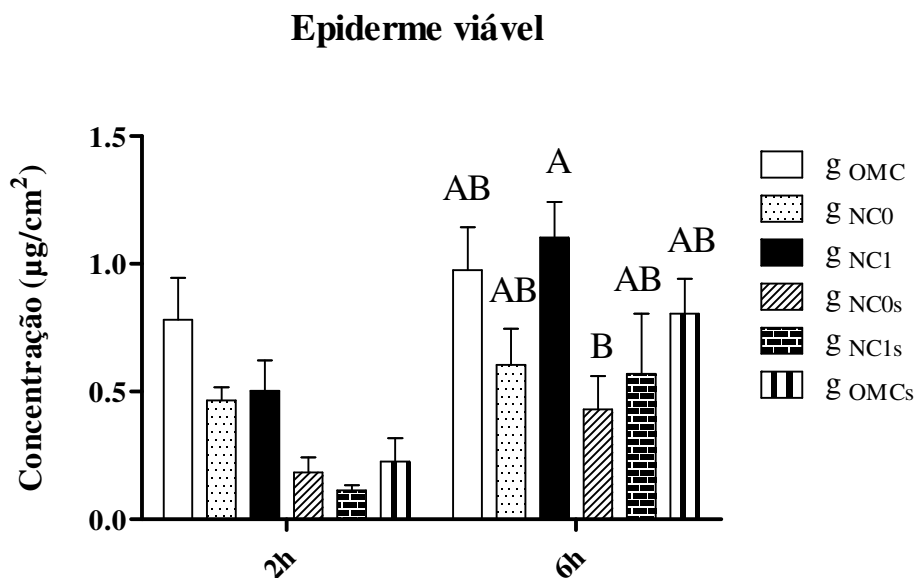


Figura 26. Distribuição do OMC das formulações g OMC, g NC0, g NC1, g NC0s, g NC1s e g OMCs na epiderme, no período de 2 horas e 6 horas. As médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem dentro do período de 6 horas.

A Figura 27 apresenta os resultados de distribuição na derme das formulações no tempo de 2 horas e 6 horas. Em 2 horas de experimento, não se observou diferença entre as formulações ($p > 0,05$), mantendo concentrações semelhantes para todas as formulações. Em estudos prévios realizados também foram detectadas baixas concentrações na derme de OMC provenientes de formulações contendo nanopartículas (JIMÉNEZ et al., 2004; WEIS-ANGELI et al., 2010; VETTOR et al., 2010) ou de emulsões contendo o filtro na forma livre (CHATELAIN et al., 2003).

Contudo, no tempo de 6 horas, observou-se um aumento da concentração de OMC para a formulação g NC1s em relação ao tempo de 2 horas ($p < 0,001$) indicando ser necessário maior tempo de contato da formulação com a pele, para permitir maior liberação nessa camada. Essa formulação também apresentou maior distribuição na derme em relação às demais ($p < 0,001$).

O adjuvante de secagem utilizado, a lactose, atua como agente promotor de permeação através de um mecanismo de formação de poros (VERMA et al., 2013). A

degradação dos corneócitos é um processo natural que ocorre no estrato córneo, originando lacunas. Em situações normais, essas lacunas formam um sistema descontínuo não permeável. Mas, em casos de permeabilização, essas lacunas podem aumentar formando uma rede permeável a substâncias. Os fatores que provocam a permeabilização são a oclusão, hidratação prolongada e sonoforese. A situação aplicada a esse estudo é a de oclusão, levando a hidratação do estrato córneo quando água se acumula nessa camada. Com isso, ocorre a dilatação dos corneócitos, a distensão dessas lacunas e a formação de um sistema descontínuo por onde substâncias hidrofílicas e lipofílicas podem penetrar (PRAUSNITZ et al., 2012). Assim, como g_{NC1s} propiciou uma penetração e maior retenção do OMC na derme após 6 horas de análise, ela passa a ser uma formulação interessante para a incorporação de substâncias que necessitem liberação controlada e prolongada nessa camada. Porém, somente o adjuvante de secagem não explica a maior retenção do OMC de g_{NC1s} , pois a formulação g_{NC0s} , que foi seca com o mesmo adjuvante, não apresentou o mesmo comportamento. Esse resultado pode ser devido à combinação da nanotecnologia aliada ao adjuvante de secagem (lactose). Além disso, a presença de TCM também poderia estar favorecendo a maior liberação do OMC.

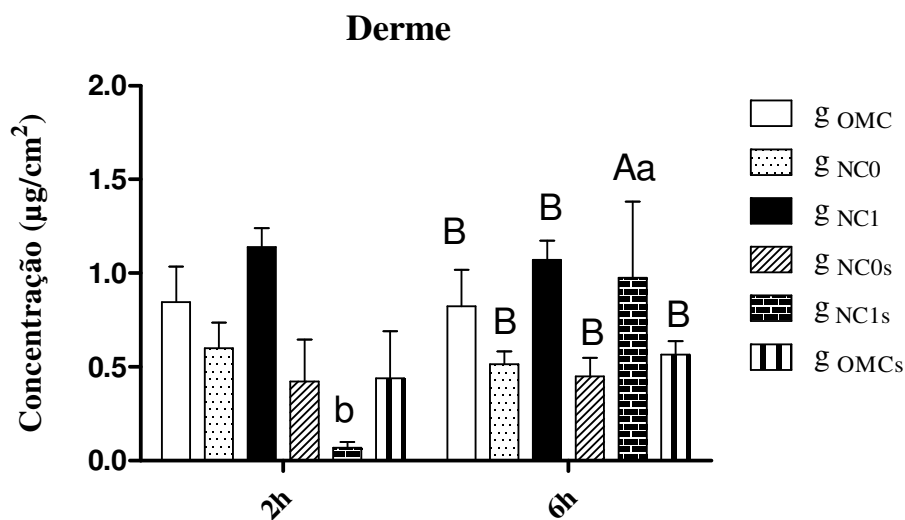


Figura 27. Distribuição do OMC das formulações g_{OMC} , g_{NC0} , g_{NC1} , g_{NC0s} , g_{NC1s} e g_{OMCs} na derme, no período de 2 horas e 6 horas. As médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem dentro do mesmo período de tempo (2 horas ou 6 horas). As médias seguidas por letras minúsculas iguais não apresentam diferença entre os períodos de tempo (entre 2 horas e 6 horas).

A penetração/permeação na pele de filtros solares está relacionada a vários fatores, dentre os quais estão o veículo da formulação e as propriedades físico-químicas dos filtros solares (BENSON et al., 2005). Para nenhuma das formulações foi detectado o OMC no meio receptor, situação já anteriormente relatada por outros estudos para nanocápsulas contendo este filtro solar (JIMÉNEZ et al., 2004; VETTOR et al., 2010; WEISS-ANGELI et al., 2010). Este resultado pode ser explicado pelo alto coeficiente de partição octanol-água do OMC (5,68), favorecendo a localização do mesmo no estrato córneo e impedindo a sua penetração em tecidos aquosos (JIMÉNEZ et al., 2004).

Os resultados, a partir de uma avaliação global, demonstraram que há influência do núcleo oleoso das nanocápsulas sobre o perfil de distribuição nas camadas da pele. A suspensão NC₀, contendo somente OMC, e sua respectiva forma pulverulenta não propiciaram a retenção preferencial em nenhuma das camadas da pele. A formulação NC₁, que além do filtro solar continha no núcleo TCM, favoreceu o acúmulo do filtro na superfície da pele impedindo a penetração em camadas mais profundas (VETTOR et al., 2010). A secagem, especialmente da suspensão NC₁, favoreceu a penetração na derme em relação às demais formulações, sendo, portanto essa formulação apropriada para veiculação de substâncias/fármacos para os quais é requerida ação nessa camada da pele.

6.2.9. Calorimetria exploratória diferencial

A análise por calorimetria exploratória diferencial foi realizada para confirmar uma das hipóteses geradas para explicar o melhor desempenho da formulação contendo a suspensão NC₁ em relação à formulação contendo a suspensão NC₀. Para isso, primeiramente foi avaliado o comportamento de cada matéria prima isoladamente (OMC, TCM, EUD). Após foi avaliado o comportamento das matérias primas em associação, obtendo-se misturas binárias e terciárias. Por fim, foi avaliado o comportamento das suspensões de nanocápsulas NC₀ e NC₁.

O polímero isoladamente obteve um único pico endotérmico em 86,84°C, correspondente à sua fusão. O TCM apresentou temperatura de fusão de -4,14°C. O filtro solar não mostrou eventos endotérmicos na faixa de temperatura analisada. As misturas físicas binárias (polímero e OMC e polímero e TCM) e a mistura terciária apresentaram temperatura correspondente à fusão do polímero similar à matéria-prima isoladamente (Tabela 19). Para as suspensões NC₀ e NC₁, as temperaturas de fusão correspondentes ao polímero ficaram próximas àquela obtida para o Eudragit S 100[®] isoladamente. Este resultado indica que não há interação entre o polímero e o OMC. Sendo assim, a hipótese de que a adição de TCM ao núcleo oleoso das suspensões de nanocápsulas reduziria a interação do polímero com o OMC foi refutada.

A mistura terciária OMC+EUD+TCM apresentou alteração da temperatura de fusão do TCM, o qual ficou mais negativo em relação à análise do TCM isoladamente. Esse resultado pode ser explicado pela interação intermolecular, do tipo forças Van der Waals entre o TCM e OMC (FIEL et al., 2011). Por sua vez, verificou-se que a partir do momento da nanoencapsulação do OMC e TCM, a temperatura de fusão correspondente ao TCM foi maior em relação àquela obtida para o TCM isoladamente e para a mistura física OMC+EUD+TCM. A reduzida interação entre esses componentes pode indicar a influencia do TCM na liberação do OMC (CASTELLI et al., 2005). Assim, sugere-se que na formulação g_{NC1}, estaria ocorrendo a liberação mais rápida do OMC da partícula que na formulação g_{NC0}, explicando o motivo pelo qual obteve-se maior concentração do filtro solar no estrato córneo para g_{NC1}.

Tabela 19. Temperatura de fusão das matérias primas/ misturas ou suspensões obtidas durante o ciclo de aquecimento e resfriamento.

Matérias primas/Misturas/Suspensões	Temperaturas de fusão	
	Pico 1	Pico 2
Matérias primas		
EUD	-	89,22
OMC	-	-
TCM	-4,08	-
Misturas físicas		
EUD+OMC	-	88,77
OMC+EUD+TCM	-5,97	87,10
Suspensões de nanocápsulas		
NC ₀	-	89,00
NC ₁	1,13	88,51

Portanto, a análise de DSC permitiu verificar que não há interação entre o polímero e OMC na formulação NC₀. De fato, há interação entre OMC e TCM, de modo que esse último estaria alterando a liberação do OMC das partículas. Por sua vez, a formulação NC₀, que não apresenta TCM em sua constituição, apresentou menor liberação do OMC das partículas, o que se relaciona à sua menor retenção no estrato córneo, no estudo *in vitro*.

6.2.10. Avaliação da capacidade absorptiva das formas semissólidas

As formulações desenvolvidas foram avaliadas quanto a sua capacidade de absorver a radiação a fim de verificar qual dessas apresentaria um melhor desempenho. Essa análise foi realizada com os hidrogéis g_{OMC}, g_{NC1} e g_{NC0}. A análise não foi realizada para os hidrogéis contendo as suspensões secas (g_{NC0s} e g_{NC1s}). Uma vez que essas foram as formulações com a menor retenção no estrato córneo, não são fotoprotetores ideais, havendo, portanto menor concentração do filtro disponível para absorver a radiação. A Tabela 20 apresenta as absorvâncias obtidas para os semissólidos contendo somente OMC. Esses apresentaram dois picos de absorção: um em 225 e outro em 310 nm.

Tabela 20. Absorbância das formas semissólidas g_{OMC}, g_{NC0}, g_{NC1} em comprimento de onda de 225 ou 310 nm por espectrofotometria.

Hidrogéis	Comprimento de onda	Absorbância
g _{OMC}	225 nm	0,5527
g _{NC0}		0,1186
g _{NC1}		0,4807
g _{OMC}	310 nm	0,3669
g _{NC0}		0,1709
g _{NC1}		0,3486

Wissing e Müller (2002a) descreveram que nanocápsulas por si só atuam espalhando ou refletindo a luz. Assim, com a obtenção de formulações fotoprotetoras contendo OMC nanoencapsulado, tem-se efeito sinérgico de filtro solar orgânico encapsulado com as nanocápsulas, as quais por si só atuam como filtros físicos (OLVEIRA-MARTINEZ et al., 2005). Desta forma, o esperado seria um melhor ou semelhante comportamento do hidrogel contendo as nanocápsulas em comparação ao contendo o filtro na forma livre. No entanto, a formulação de g_{NC0} apresentou menor absorção em comparação com os demais semissólidos. Já, a formulação g_{NC1}, apresentou maiores valores de absorbância, muito próximas às obtidas para o hidrogel g_{OMC} (Figura 28). Esse resultado se relaciona aos dados obtidos previamente de DSC (item 6.2.9) onde a presença de TCM poderia estar aumentando a liberação do OMC das nanopartículas, bem como aumentando a sua solubilidade no núcleo com uma consequente maior disponibilização do filtro. Adicionalmente, com a encapsulação do OMC, especialmente para a suspensão NC₁, observou-se efeito fotoestabilizador proporcionado pela nanoencapsulação (item 6.2.4). Esse efeito também pode contribuir para evitar a alteração do FPS ocasionada pela isomerização do OMC quando há exposição à radiação ultravioleta (HUONG et al., 2007).

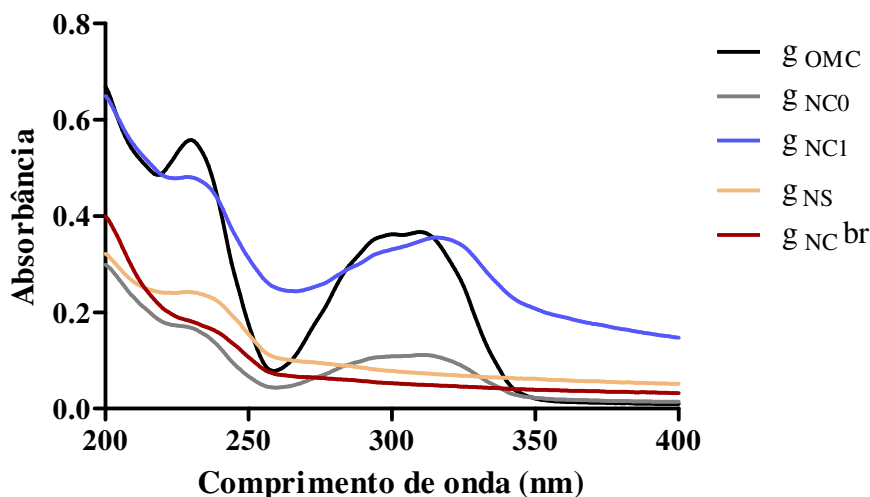


Figura 28. Análise da capacidade absorptiva das formas semissólidas: g NC₀, g NC₁, g NS (gel contendo apenas nanoesferas), g NC br (gel contendo nanocápsulas de TCM) e g OMC por espectrofotometria.

A análise da capacidade absorptiva do hidrogel contendo nanocápsulas brancas (g NC br) e gel contendo nanoesferas (Figura 30) mostram que há uma pequena absorção para ambos, sendo este efeito devido ao espalhamento de luz provocado pelo tamanho destas nanoestruturas (PAESE, 2008). Wissing e Müller (2002b) e Paese (2008) verificaram que há efeito sinérgico entre formulações contendo nanopartículas brancas com formulações de filtro solar encapsulado em nanopartículas. Embora tenha sido observado absorção para o hidrogel contendo nanoesferas, a presença de mistura de nanoesferas e nanocápsulas em NC₀, observado no estudo do gradiente de densidade (item 6.2.9), provoca redução de capacidade fotoprotetora (item 6.2.7).

6.2.11. Avaliação de pele suína tratada com os semissólidos com exposição à radiação UVB

Nessa avaliação foi observado o efeito da presença de radiação ultravioleta em peles suínas tratadas ou não com as formulações nanoparticuladas contendo OMC. Uma vez que a pele suína é aquela que, dentre as peles de animais, é a que mais se assemelha à pele humana (HUONG et al., 2007), os resultados apresentados simulam situações de exposição à radiação UVB.

As fotomicrografias apresentadas na Figura 29 mostram as peles suínas tratadas ou não com semissólidos contendo OMC. A pele suína sem tratamento e exposta à radiação ultravioleta (Figura 29 B) mostrou-se bastante danificada, com escamações quando comparadas às demais peles tratadas com as formulações contendo OMC (Figura 29 C, D, E, F, G) e com a pele sem tratamento e sem exposição à radiação UV (Figura 29 A). O papel relevante dos filtros solares fica assim evidente na proteção contra danos físicos também. Conforme observado nas imagens, as peles expostas à radiação apresentaram diferentes efeitos para cada uma das formulações. A formulação g_{OMC} foi aquela que demonstrou menor capacidade de proteção cutânea (Figura 29 C) o que se deve à baixa capacidade fotoprotetora (item 6.2.7) e a baixa retenção no estrato córneo (item 6.2.8). A formulação g_{NC0} (Figura 29 D) apresentou uma melhor fotoproteção em comparação com a formulação livre. Esse efeito pode ser decorrente do efeito hidratante proporcionado pela suspensão de nanocápsulas (WISSING; MÜLLER, 2002b) as quais reduzem a perda de água transepidérmica, possivelmente evitando a descamação da pele. Já o hidrogel g_{NC1} (Figura 29 E) foi aquele que mais protegeu contra o dano induzido pela radiação. Os efeitos protetores observados para g_{NC1} podem ser devido a sua maior capacidade fotoprotetora (item 6.2.7) e maior retenção no estrato córneo (6.2.8) em relação às demais formulações. As formulações contendo as suspensões secas (Figura 29 F e 31 G) não propiciaram aumento da proteção em relação às demais formulações. Estes efeitos se relacionam à baixa retenção no estrato córneo (item 6.2.8) e menor capacidade fotoprotetora (item 6.2.7) conferida por essas formulações.

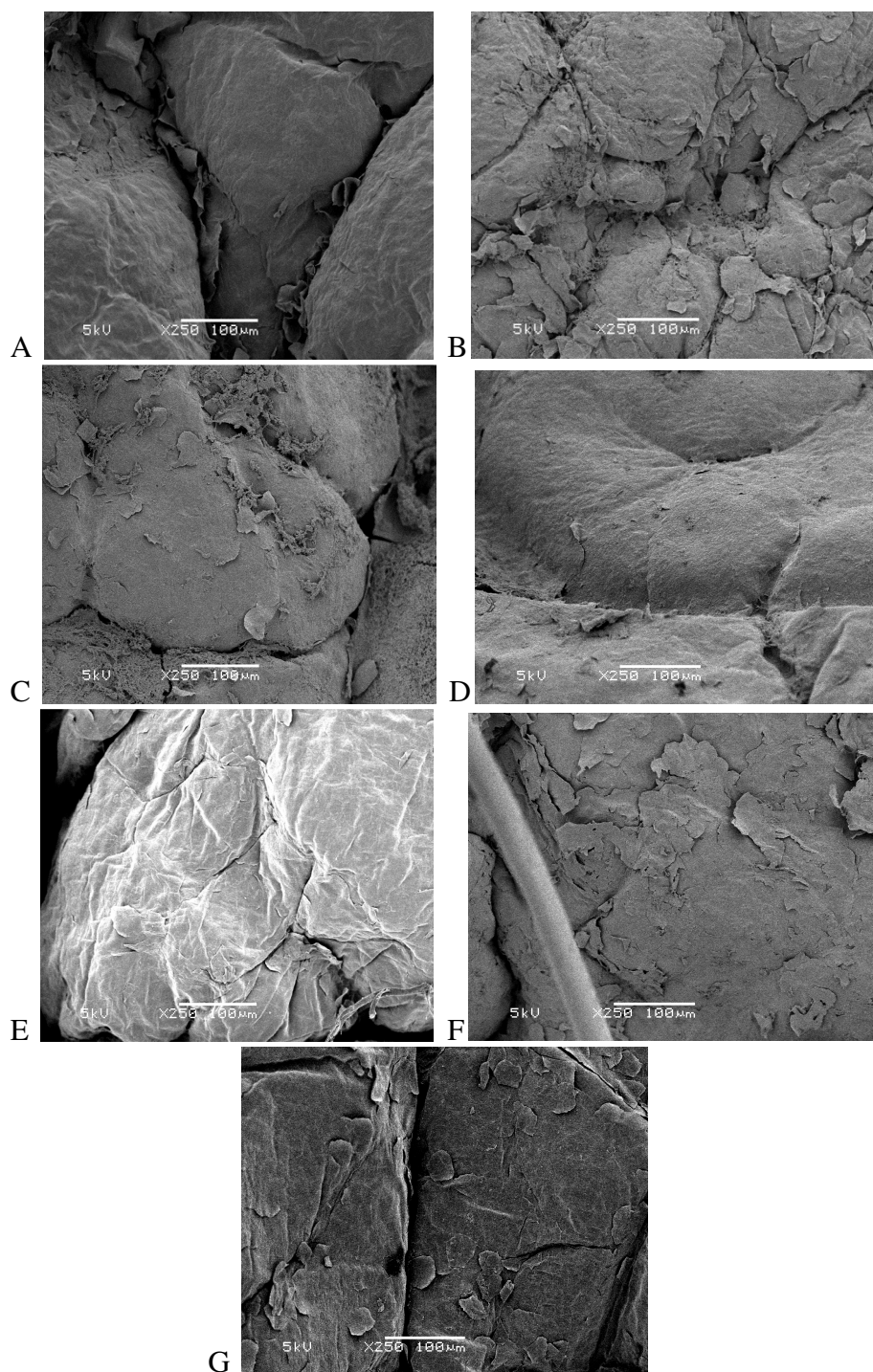


Figura 29. Fotomicrografias de peles suínas obtidas por MEV. Pele suína sem exposição à radiação UVB e sem tratamento (A), pele suína com exposição à luz UV sem tratamento (B). Pele suína com exposição à radiação UVB tratada com g_{OMC} (C), pele suína tratada com g_{NC} (D), pele suína tratada com g_{NCI} (E), pele suína tratada com g_{NC0s} (F), pele suína tratada com g_{NC1s} (G).

Na Figura 30 estão apresentados os pelos presentes nestes mesmos fragmentos de peles expostos à radiação, avaliados através de MEV. O pelo sem tratamento e com exposição à radiação mostrou-se extremamente danificado, conforme é possível observar na Figura 30 A. O tratamento com a formulação livre (Figura 30B) reduziu os efeitos prejudiciais provocados pela radiação, mas esses ainda eram persistentes. Por sua vez, observou-se que as formulações de g_{NC0} , g_{NC1} , e g_{NC0s} e g_{NC1s} preveniram os danos provocados pela radiação (Figura 30 C, D, E, F).

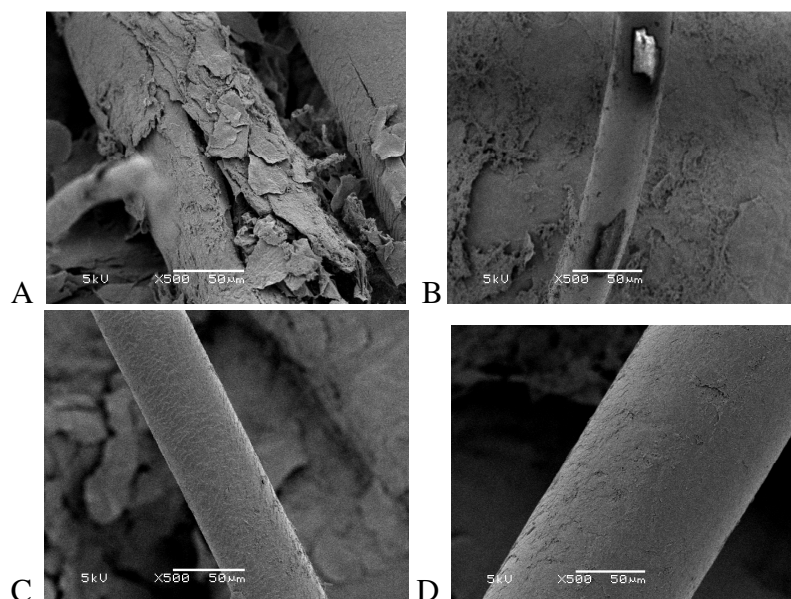


Figura 30. Fotomicrografias de pelo suíno obtidas por MEV. Pelo suíno com exposição à luz UV sem tratamento (A), pelo suíno com exposição à luz UV contendo g_{OMC} (B), pelo suíno com exposição à luz UV contendo g_{NC0} (C), pele suína com exposição à luz UV contendo g_{NC0s} (D), pele suína com exposição à luz UV contendo g_{NC1} (E), pele suína com exposição à luz UV contendo g_{NC1s} (F).

6.3. Avaliação da associação de filtros solares à formulação NC₁

6.3.1. Caracterização das formulações NC₂, NC₃ e NC₄

Considerando o resultado anterior onde as suspensões secas contendo somente OMC não apresentaram melhor desempenho, os estudos subseqüentes foram realizados apenas com as forma líquidas, sem a realização de secagem. A formulação NC₁, a qual apresentou melhor desempenho, foi usada como formulação base para adição de outros filtros solares. Ao núcleo oleoso contendo OMC e TCM foram adicionados octiltriazone e/ou bemotrizinol. A obtenção de suspensões contendo mais de um filtro solar pode aumentar a efetividade dos mesmos frente ao bloqueio da radiação ultravioleta.

A Figura 31 apresenta os resultados de tamanho de partícula por difratometria de laser das suspensões NC₂ (contendo OMC e octiltriazone), NC₃ (contendo OMC e bemotrizinol) e NC₄ (contendo OMC, octiltriazone e bemotrizinol). Todas as formulações apresentaram tamanho nanométrico, sendo, portanto adequadas para os estudos posteriores.

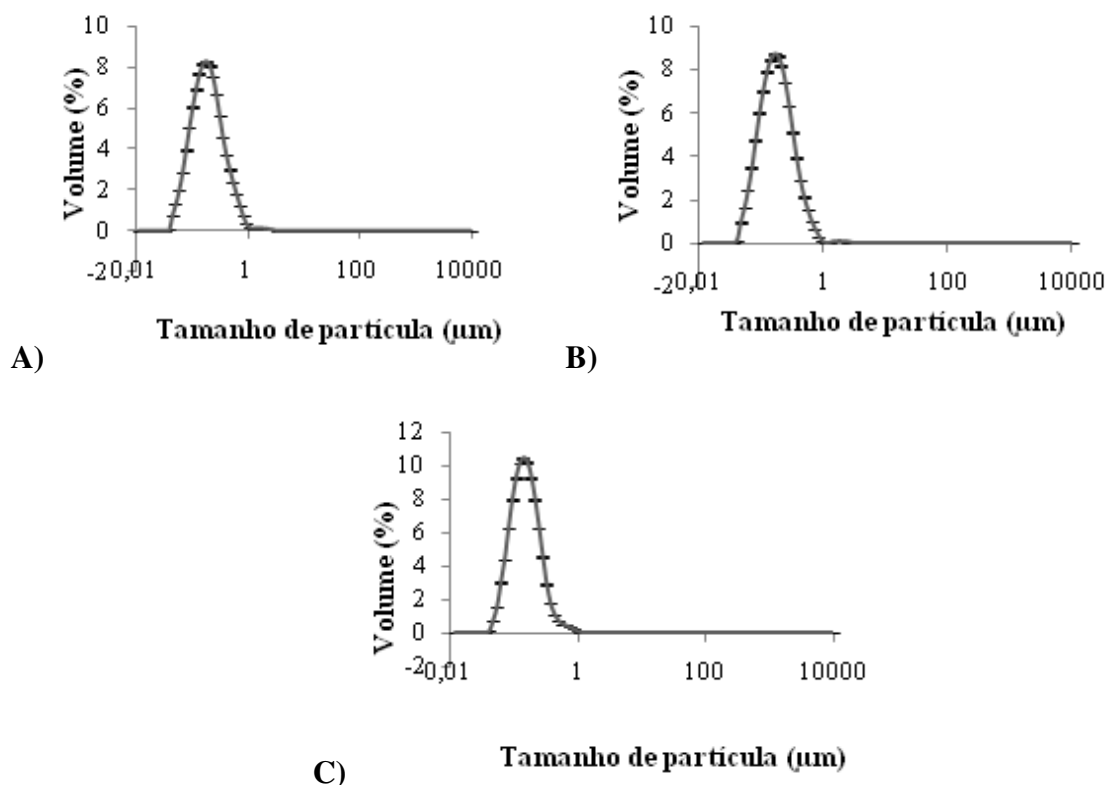


Figura 31. Distribuição do tamanho de partícula (μm) por volume (%) das formulações contendo OMC, OCT e BMT: NC₂ (A), NC₃ (B) e NC₄ (C) por difratometria de laser ($\pm dp$).

A análise por espectroscopia de correlação de fótons demonstrou a relação entre a concentração desses filtros solares com o tamanho de partícula final (Figura 32). A formulação NC₄, composta dos três filtros solares, totalizando 1 mg/mL de cada um dos três filtros, apresentou o menor tamanho de partícula ($158,30 \pm 4,21$ nm). Já as formulações NC₂ e NC₃ apresentaram tamanhos médios de $179,96 \pm 1,95$ e $174,52 \pm 4,13$ nm, respectivamente, sendo similares entre si ($p > 0,005$). Embora em todas as formulações a concentração final seja de 3 mg/mL de filtros solares, nas formulações NC₂ e NC₃, foram empregados somente dois filtros solares, sendo o segundo filtro em concentração de 2 mg/mL. Assim, esse segundo filtro solar, com maior concentração, pode ter contribuído para o maior tamanho de partícula para NC₂ e NC₃.

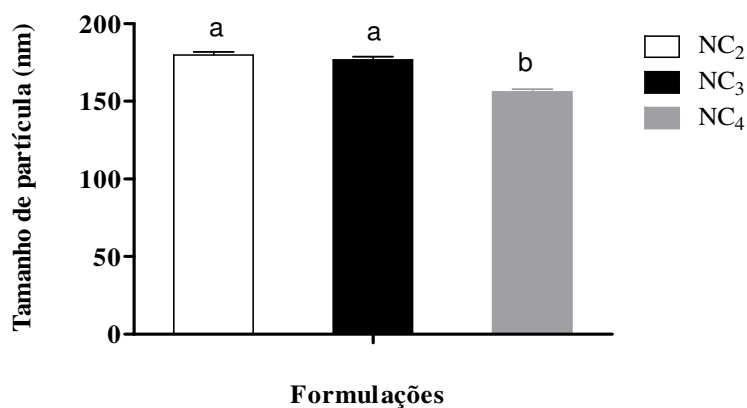


Figura 32. Tamanho de partícula médio (nm) das suspensões de nanocápsulas NC₂, NC₃, NC₄ por intensidade através de espectroscopia de correlação de fótons ($\pm dp$). As médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O baixo índice de polidispersão (Figura 33) indica estabilidade relativa das suspensões, demonstrando que as mesmas são adequadas para estudos de avaliação/eficácia *in vitro*.

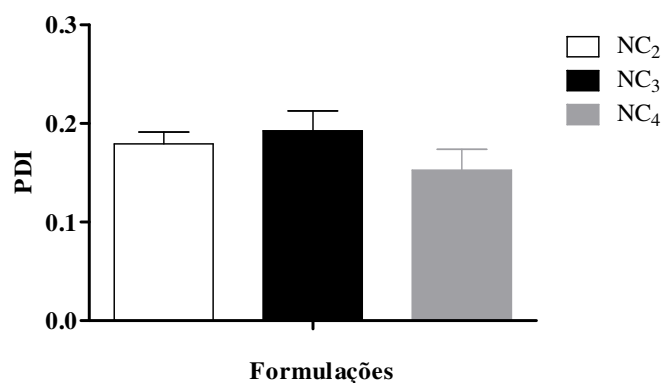


Figura 33. Índice de polidispersão (PDI) das suspensões de nanocápsulas NC₂, e NC₃ e NC₄ por espectroscopia de correlação de fótons ($\pm dp$).

Os valores de pH e potencial zeta (Tabela 21) desses insumos foram similares entre si e em relação às formulações contendo somente OMC ($p > 0,05$).

Tabela 21. Características físico-químicas das formulações NC₂, NC₃ e NC₄ obtidas por mobilidade eletroforética e potenciometria (\pm dp).

Formulação	Potencial zeta (mV)	pH
NC ₂	-18,08 \pm 1,70	4,41 \pm 0,07
NC ₃	-17,15 \pm 2,67	4,33 \pm 0,10
NC ₄	-18,51 \pm 1,17	4,41 \pm 0,05

A Figura 36 apresenta os resultados de análise por espalhamento múltiplo de luz das formulações NC₂, NC₃ e NC₄. Pelo fato de essas formulações apresentarem coloração esbranquiçada, e a variação de transmissão ter sido menor que 0,2%, foram analisados somente os gráficos de retroespalhamento. As suspensões apresentaram fenômenos dinâmicos que foram se modificando ao longo da análise. NC₂ apresentou inicialmente uma maior tendência à sedimentação, a qual diminuiu no fim de análise, verificado através da redução e aumento do retroespalhamento no topo e no fundo da cubeta, respectivamente. NC₃ apresentou, além de fenômeno de sedimentação, uma leve tendência à cremagem, verificado através do aumento do retroespalhamento no topo da cubeta. Por sua vez, a formulação NC₄, apresentou inicialmente uma baixa tendência à cremagem, a qual se modificou para uma baixa tendência à sedimentação, no fim da análise. Também observou-se que não houve modificações no meio da cubeta, que representam alterações de tamanho de partícula e indicam a ocorrência de floculação e coalescência, fenômenos irreversíveis. Assim, da mesma forma como para as formulações contendo somente OMC, as formulações apresentaram baixa tendência à sedimentação e cremagem, fenômenos reversíveis, demonstrando a estabilidade dessas formulações.

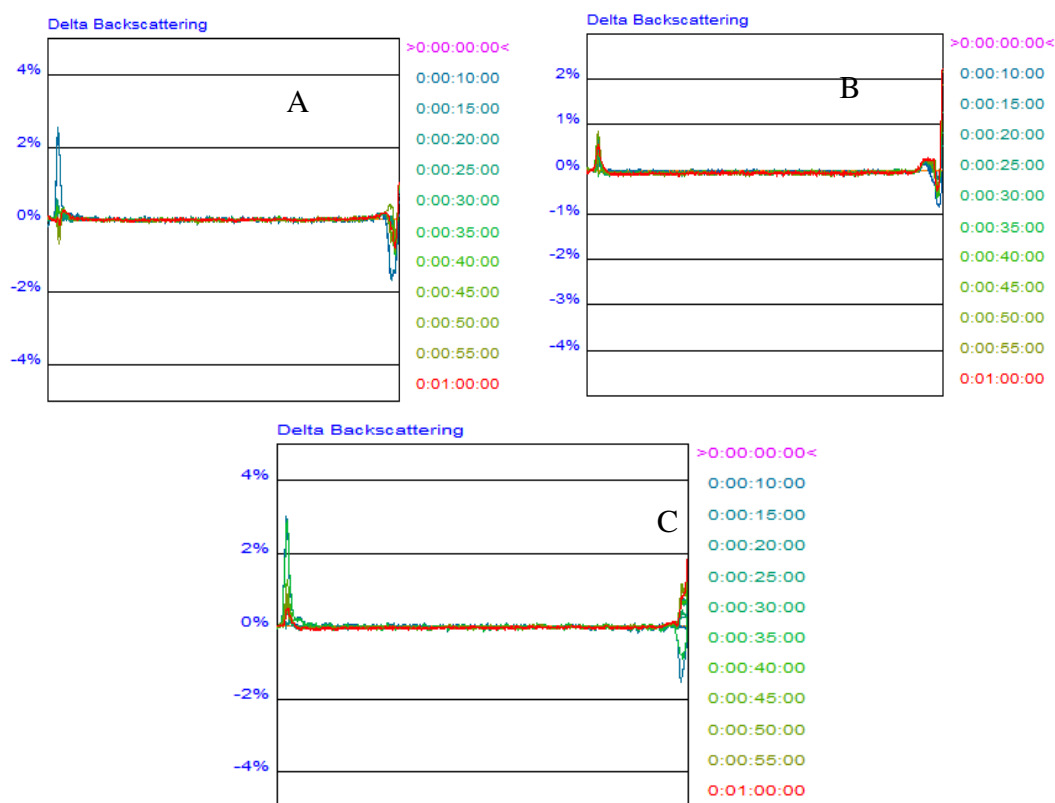


Figura 36. Variações de retroespalhamento da formulação NC₂ (A) NC₃ (B) e NC₄ (C) obtidos por espalhamento múltiplo de luz.

6.3.2. Avaliação da estabilidade das suspensões de nanocápsulas contendo filtros solares

A estabilidade corresponde ao período de tempo no qual o produto mantém-se dentro de limites especificados, e que durante o período de armazenamento mantenha as características que possuía no momento da sua fabricação (SILVA et al., 2009). A estabilidade dos produtos farmacêuticos depende da temperatura, umidade, de propriedades físicas e químicas do próprio produto, bem como da forma farmacêutica e do processo de fabricação (BRASIL, 2005). A avaliação da estabilidade física de suspensões de nanocápsulas envolve o monitoramento do pH, tamanho de partícula e potencial zeta, com intuito de verificar possíveis fenômenos físicos de alteração do tamanho de partícula e potencial zeta em função do tempo.

Para a avaliação da estabilidade, as formulações foram avaliadas no dia da sua preparação e 14 dias após. A análise macroscópica das formulações demonstrou que não

houve alterações visuais de cor, mantendo a coloração esbranquiçada anteriormente observada para as formulações após a preparação das mesmas. Além disso, também não foram observados fenômenos de agregação, sedimentação ou separação de fases. A análise de tamanho de partícula por espectroscopia de correlação de fótons demonstrou que não houve modificações significativas nos valores para nenhuma das formulações (Figura 34). A avaliação desse parâmetro é uma característica importante das suspensões de nanocápsulas, pois variações no tamanho de partícula representam a ocorrência de coalescência ou agregação (MAGENHEIM; BENITA, 1991). Em concordância com o resultado de tamanho, também não foram observadas alterações nos valores de PDI (Figura 35) onde aumento nos valores também pode indicar a presença de agregados (GUTERRES et al., 1995).

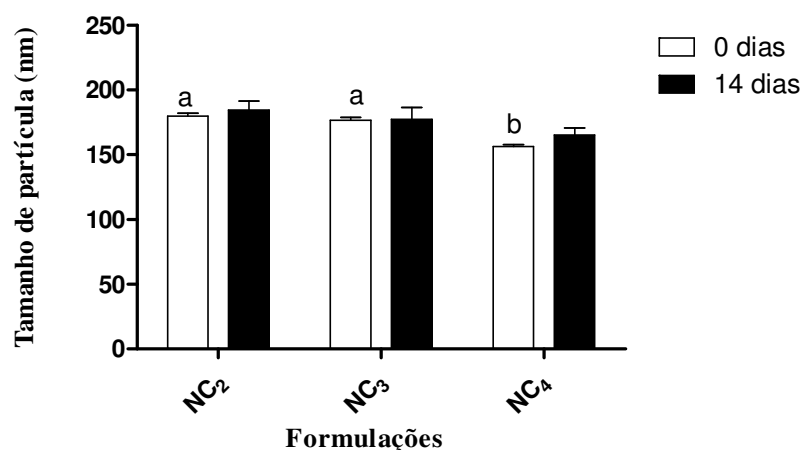


Figura 34. Tamanho de partícula médio das suspensões de nanocápsulas armazenadas à temperatura ambiente após o preparo e após 14 dias. As médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.

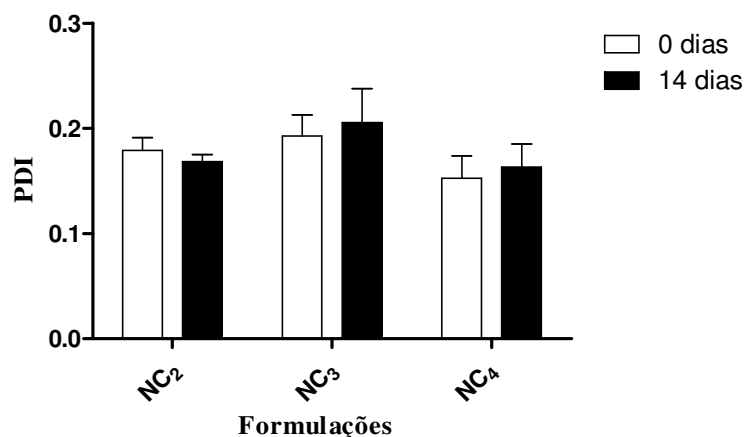


Figura 35. Índice de polidispersão médio das suspensões de nanocápsulas armazenadas à temperatura ambiente após o preparo e após 14 dias.

A Figura 36 mostra os resultados de potencial zeta obtidos para as formulações. Essas mantiveram valores próximos aos iniciais (entre -16 e -18 mV). As formulações NC₂ e NC₃ mostraram uma redução e aumento, respectivamente, do valor médio de potencial zeta após 14 dias de análise. Porém essas variações observadas não foram significativas ($p > 0,05$). Em relação à formulação NC₄ também não foi observada diferença significativas após 14 dias ($p > 0,05$). Esse dado corrobora com os resultados de tamanho de partícula e PDI anteriormente descritos, mostrando a estabilidade das suspensões obtidas (Figura 34 e 35).

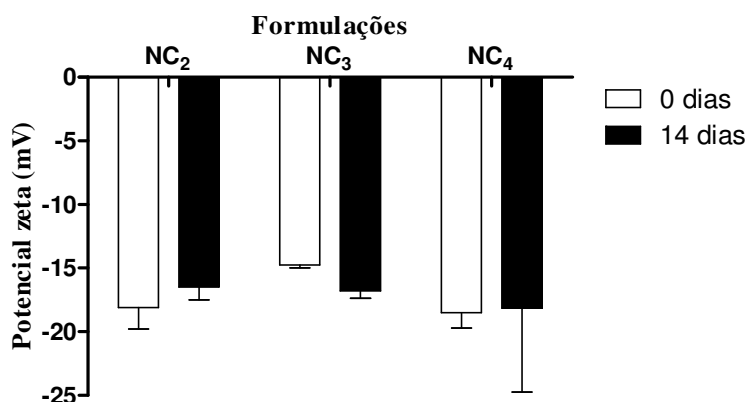


Figura 36. Potencial zeta das suspensões de nanocápsulas após o preparo e após 14 dias armazenadas à temperatura ambiente.

A ocorrência de acidez em uma análise de pH de suspensões de nanocápsulas armazenadas, deve-se à mobilidade da cadeia polimérica (LOPES et al., 2000) ou à

passagem do fármaco para a fase aquosa (GUTERRES et al., 1995). Lopes e colaboradores (2000) explicam que a redução do pH de suspensões de nanocápsulas preparadas com Eudragit S 90[®] deve-se a mobilidade da cadeia polimérica, onde o aumento da concentração dos íons hidrônio ocorre por dissociação dos grupos carboxílicos presentes na interface polímero/água. A Figura 37 mostra os valores de pH obtidos após 14 dias de armazenamento. Para essas formulações não foram observadas modificações significativas ($p>0,05$) estando em concordância com o resultado obtido por Schaffazick e colaboradores (2007) no qual após 30 dias de análise, nanocápsulas contendo o mesmo polímero (Eudragit S 100[®]) não mostraram alterações.

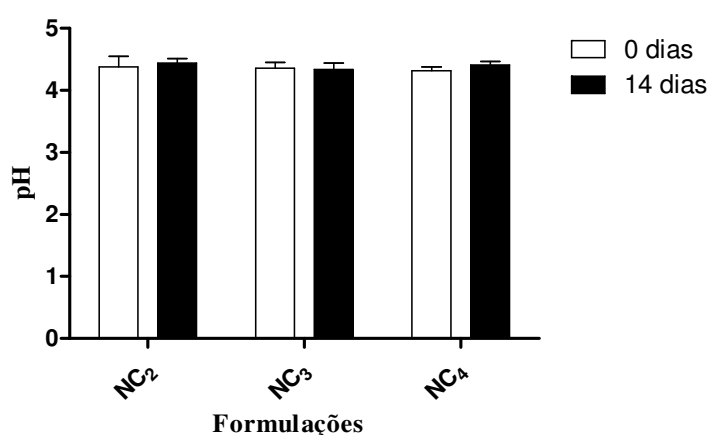


Figura 37. Valores de pH das das suspensões de nanocápsulas após o preparo e após 14 dias armazenadas à temperatura ambiente.

As formulações apresentaram tamanho de partícula com distribuição monomodal, sem variações de pH, demonstrando estabilidade física durante o período de 14 dias de análise. Portanto, as suspensões de nanocápsulas se mantiveram apropriadas para aplicação tópica.

6.3.3. Doseamento e eficiência de encapsulação dos filtros solares OMC, OCT e BMT contidos nas nanocápsulas

Os filtros solares contidos nas nanocápsulas foram doseados através de CLAE em metodologia previamente validada (ANEXO III) e os resultados encontram-se na Tabela 22. Todas as formulações apresentaram altas taxas de recuperação, obtendo-se

doseamentos próximos ao valor teórico (1mg/mL para OMC em todas as formulações, 2 mg/mL de OCT e BMT na formulação NC₂ e NC₃, respectivamente, e 1mg/mL de OCT e BMT na formulação NC₄).

Tabela 22. Doseamento dos filtros solares encapsulados.

Formulação	OMC (mg/mL)	OCT (mg/mL)	BMT (mg/mL)
NC ₂	0,92 ± 0,11	1,91 ± 0,17	-
NC ₃	0,96 ± 0,2	-	2,03 ± 0,3
NC ₄	0,91 ± 0,12	0,95 ± 0,2	1,03 ± 0,001

A eficiência de encapsulação corresponde a um parâmetro muito importante a ser determinado após a preparação de nanocápsulas, pois permite obter a quantidade de filtro solar que está encapsulado, diretamente relacionado a efetividade dos nanoinsumos. Esse parâmetro sofre influência de diferentes fatores que incluem o óleo utilizado como constituinte do núcleo oleoso e características do fármaco (GUTERRES et al., 1995). A taxa de encapsulação foi determinada para os filtros octiltriazona e bemotrizinol. Na formulação NC₂ obteve-se 99,9% de eficiência de encapsulação para a octiltriazona. Na formulação NC₃ obteve-se 99,2% de eficiência de encapsulação para o bemotrizinol. Na formulação NC₄ obteve-se 98,23% e 98,25% de eficiência de encapsulação para octiltriazona e bemotrizinol, respectivamente. Esses resultados são atribuídos a alta lipofilia dos filtros solares, obtendo-se altas taxas de encapsulação em todas as formulações desenvolvidas (MORA-HUERTAS et al., 2010).

6.3.4. Caracterização das formas semissólidas

Os nanoinsumos NC₂, NC₃ e NC₄ foram incorporados em hidrogéis de Carbopol 980[®]. A Figura 38 apresenta as fotografias dos géis contendo filtros solares. Todos hidrogéis apresentaram aspecto brilhoso, homogêneo e fluido. Os hidrogéis contendo os filtros na forma livre (g_{OMC-OCT-BMT}) apresentaram coloração levemente amarelada em função da presença do bemotrizinol. Os géis contendo nanocápsulas (g_{NC2}, g_{NC3}, g_{NC4}) apresentaram coloração esbranquiçada devido à presença da suspensão de nanocápsulas.

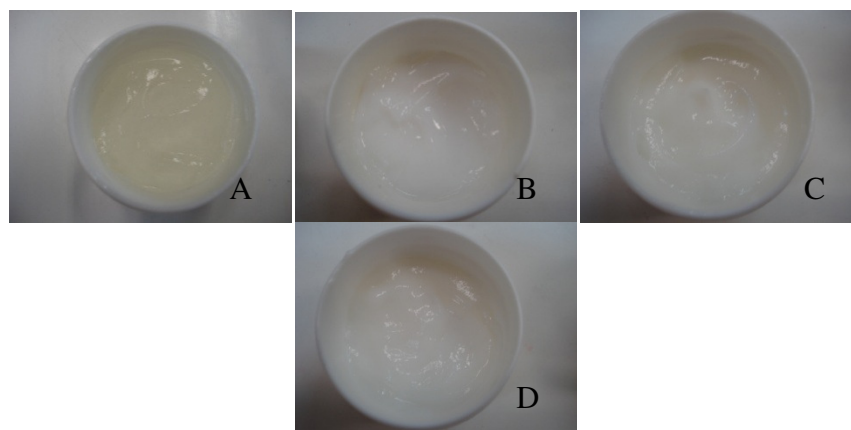


Figura 38 Fotografias dos géis contendo os filtros na forma livre e nanoencapsulados (A: g OMC-OCT-BMT; B: g NC₂, C: g NC₃, D: g NC₄).

A Tabela 23 apresenta os valores de pH dos semissólidos, os quais ficaram próximos a 5,00, sem diferença significativa entre os géis g NC₂, g NC₃ e g NC₄ ($p > 0,05$) e entre esses géis e aqueles contendo somente OMC ($p > 0,05$).

Tabela 23. Valores de pH das formulações semissólidas g OMC, g OMC-OCT-BMT, g NC₂, g NC₃ e g NC₄ ($\pm dp$).

Formulação	pH
g OMC-OCT-BMT	5,51 \pm 0,05
g NC ₂	5,50 \pm 0,09
g NC ₃	5,52 \pm 0,13
g NC ₄	5,53 \pm 0,06

A Figura 39 apresenta os tamanhos de partícula dos hidrogéis contendo os filtros solares. O hidrogel g OMC-OCT-BMT apresentou distribuição unicamente micrométrica, com $d(0,5)$ de 266,790 μm , enquanto os demais semissólidos (g NC₂, g NC₃ e g NC₄) apresentaram tamanho de partícula menores. Os géis contendo os filtros nanoencapsulados também apresentaram tamanho de partícula maior que aquele apresentado por g NC₁, provavelmente devido à presença de pequenas populações micrométricas que acabam por contribuir para o cálculo do D[4,3] final. As formulações NC₂ e NC₃ apresentaram maior tamanho de partícula que NC₄ (item 6.3.1). Assim, em concordância com esse resultado, foram obtidos maiores tamanhos de partícula para g

NC2 e g NC3. É importante ressaltar que a presença de populações micrométricas nessas formulações também se deve à presença do gel de Carbopol®.

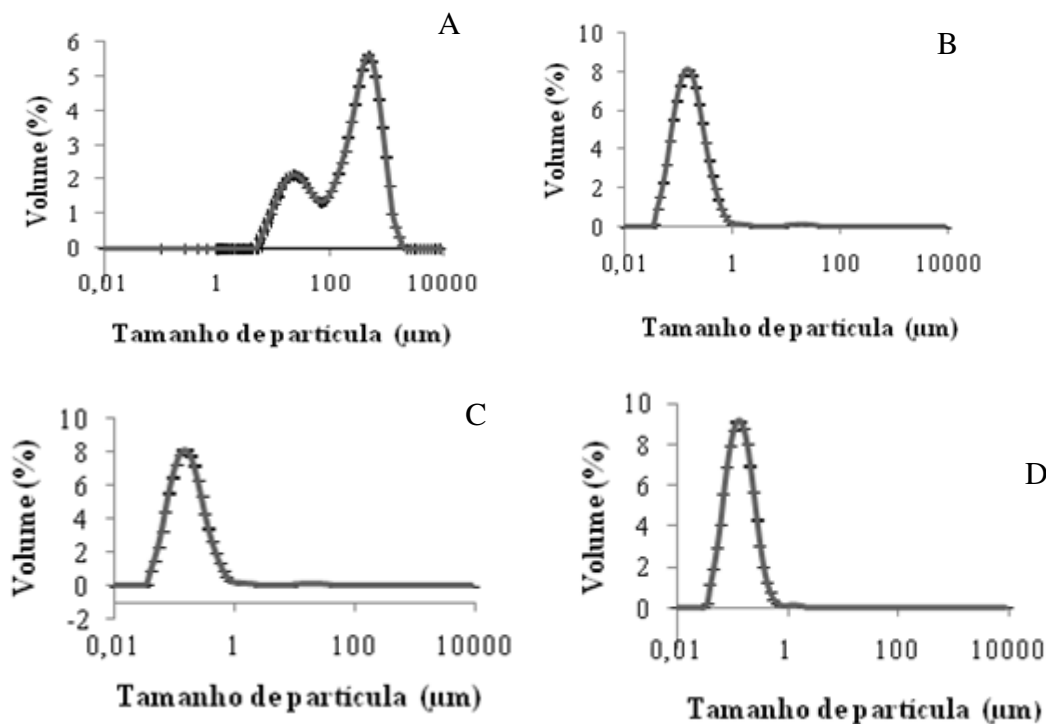


Figura 39. Distribuição do tamanho médio de partícula médio (μm) em volume (%) das formas semissólidas: g OMC-OCT-BMT (A), g NC2 (B), g NC3 (C), g NC4 (D), por difratometria de laser.

A Figura 40 apresenta os resultados obtidos na investigação de fenômenos de instabilidade nas formulações semissólidas. Todos os hidrogéis apresentaram comportamentos semelhantes entre si e às suspensões de nanocápsulas constituintes desses géis. O semissólido contendo os filtros solares na forma livre apresentou variação de transmissão maior que 0,2%. Assim, foram analisados ambos gráficos, de retroespalhamento e transmissão. Embora esse hidrogel tenha apresentado maior tendência à sedimentação e a cremagem que os demais hidrogéis, os fenômenos observados são reversíveis, o que não ocasiona perda de estabilidade.

Os hidrogéis g NC2 e g NC3 apresentaram tendência à sedimentação e após 12 horas de análise, verificou-se um leve aumento do retroespalhamento no topo da cubeta, que indica uma leve presença de cremagem. O gel g NC4 apresentou inicialmente leve tendência à cremagem juntamente com fenômeno de sedimentação, observado no fim da

análise desse semissólido. Os baixos valores de variações de retroespalhamento (entre 1% a 2%) verificados no topo e no fundo da cubeta para esses hidrogéis indica a estabilidade dos mesmos.

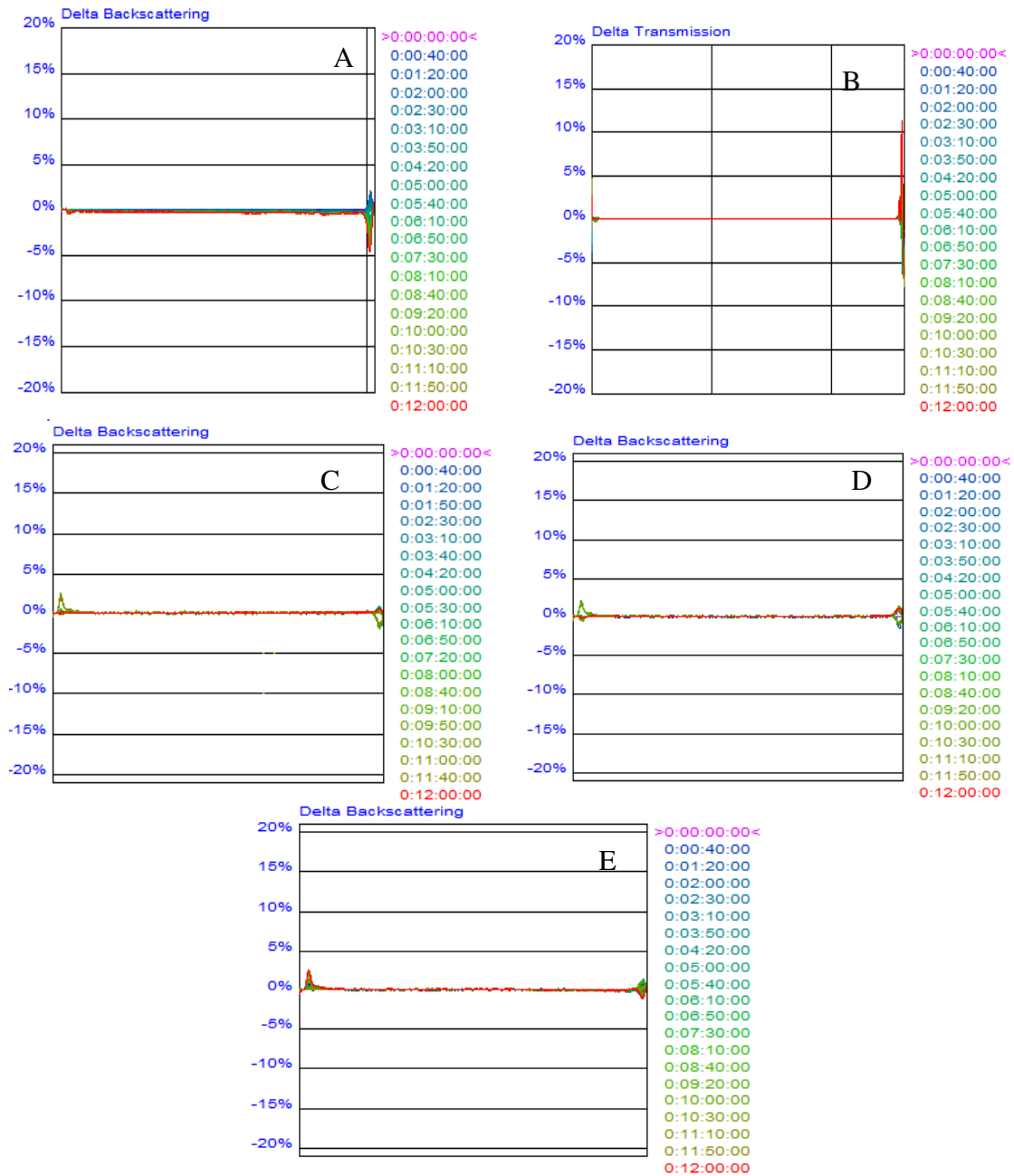


Figura 40. Gráficos de variação da transmissão (A) e retroespalhamento de g OMC-OCT-BMT (B) g NC2 (C) e g NC3 (D), g NC4 (E) obtidos por espalhamento múltiplo de luz.

6.3.5. Reologia das formulações semissólidas

A Tabela 24 apresenta os resultados de coeficiente de regressão obtidos para os hidrogéis contendo OMC, OCT e BMT, demonstrando tendência a comportamento plástico.

Tabela 24. Coeficientes de regressão referentes aos modelos matemáticos que descrevem os comportamentos plástico e pseudoplástico das formas semissólidas $g_{OMC-OCT-BMT}$, g_{NC2} , g_{NC3} e g_{NC4} .

Formulação	Bingham	Casson	Herschel-Bulkley	Ostwald
$g_{OMC-OCT-BMT}$	$0,9837 \pm 0,0048$	$0,9939 \pm 0,0047$	$0,9815 \pm 0,0070$	$0,9646 \pm 0,0052$
g_{NC2}	$0,9789 \pm 0,0018$	$0,9969 \pm 0,0014$	$0,9835 \pm 0,0053$	$0,8945 \pm 0,039$
g_{NC3}	$0,9700 \pm 0,0020$	$0,9749 \pm 0,0116$	$0,9636 \pm 0,0200$	$0,9636 \pm 0,0200$
g_{NC4}	$0,9685 \pm 0,089$	$0,9869 \pm 0,0085$	$0,9856 \pm 0,0184$	$0,7593 \pm 0,0141$

Contudo, os reogramas desses géis (Figura 41) demonstram um comportamento pseudoplástico similar àqueles apresentados pelos géis contendo somente OMC.

Os géis contendo filtros na forma livre ($g_{OMC-OCT-BMT}$) apresentaram o mesmo comportamento que as suspensões de nanocápsulas contendo esses filtros, demonstrando que as suspensões de nanocápsulas não alteraram o perfil reológico.

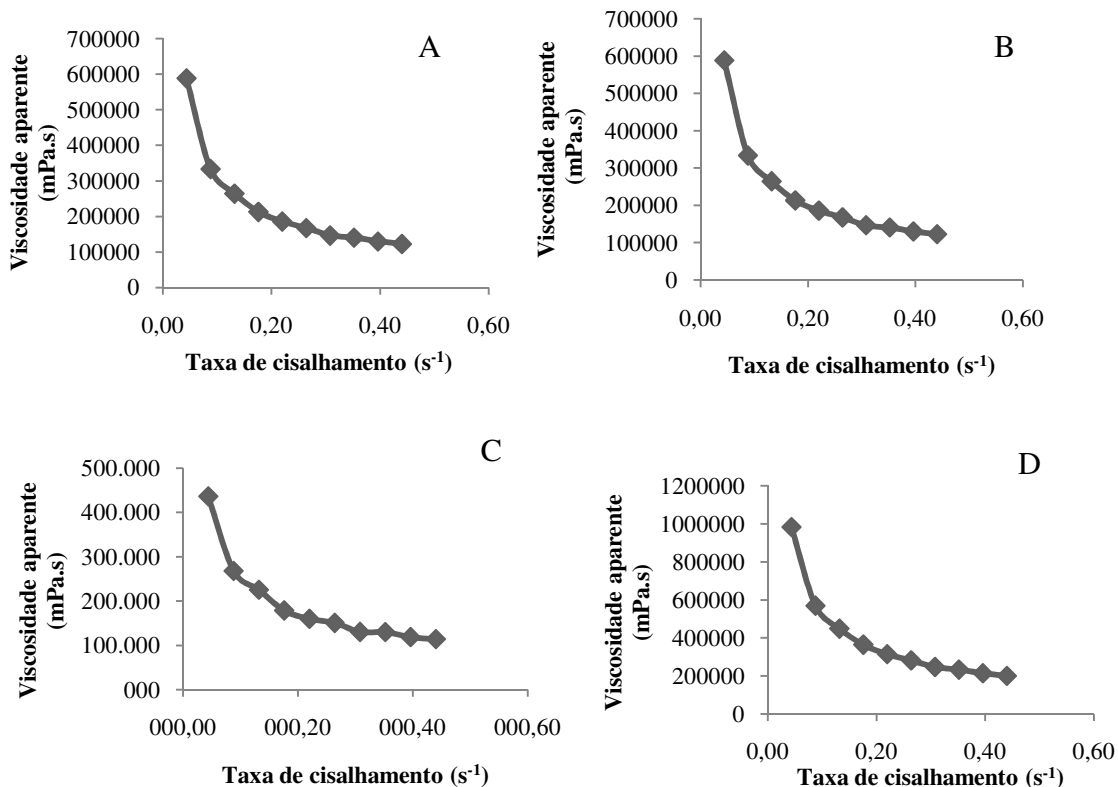


Figura 41. Reograma da viscosidade aparente versus taxa de cisalhamento dos géis contendo filtros solares: (A) g OMC-OCT-BMT, (B) g NC2, (C) g NC3, (D) g NC4.

Assim, observou-se que tanto os géis contendo somente OMC ou aqueles géis contendo associação de filtros apresentaram o mesmo tipo de comportamento pseudoplástico. Portanto, foi possível a obtenção de hidrogéis contendo associação de filtros solares que também apresentem comportamento reológico adequado para fotoprotetores, possibilitando a formação homogênea de filme na pele (GASPAR; CAMPOS, 2003).

6.3.6. Avaliação da capacidade fotoprotetora

A capacidade fotoprotetora dos hidrogéis contendo os filtros solares associados também foi avaliada e os resultados apresentados na Tabela 25. Essas novas formulações também apresentaram melhor ajuste ao modelo monoexponencial. Os semissólidos contendo filtros solares na forma livre foram aquelas para os quais se obteve menor tempo de meia-vida do resveratrol, sendo esse valor igual ao anteriormente determinado para o gel contendo apenas OMC na forma livre. As formulações contendo somente OMC ou associação de filtros nanoencapsulados apresentaram melhor desempenho que as formulações não-nanotecnológicas, o que também pode ser devido à característica das nanocápsulas atuarem por si só como refletores da radiação ultravioleta, conforme observado para hidrogel de nanocápsulas brancas (item 6.2.10). Assim, as nanocápsulas que atuam como filtros físicos em adição aos filtros solares nanoencapsulados contribui para a melhor efetividade dessas formulações na absorção da radiação ultravioleta. Embora os géis g_{NC2} e g_{NC3} , não tenha apresentado diferença entre si ($p > 0,05$), eles foram capazes de aumentar o tempo de meia vida do resveratrol em comparação com os géis na forma livre ($p < 0,0001$). Demonstra-se assim que essas formulações apresentaram maior capacidade em evitar a degradação do resveratrol. Entre os hidrogéis contendo nanocápsulas, verificou-se diferença somente para o gel g_{NC4} ($p < 0,001$). Esse resultado demonstra que a hipótese proposta foi alcançada, ou seja, a nanoencapsulação de três filtros solares aumentou a capacidade fotoprotetora da formulação.

A formulação g_{NC1} , anteriormente descrita apresentou tempo de meia-vida de 67 minutos, sem diferença estatística para g_{NC2} e g_{NC3} . No entanto, a formulação g_{NC4} aumentou significativamente ($p < 0,001$) o tempo de meia-vida do resveratrol em comparação ao g_{NC1} . Esse resultado é esperado uma vez que quanto maior a concentração de filtros solares em uma formulação, maior será a capacidade fotoprotetora da mesma. Além disso, a adição da octiltriazona e bemotrizinol permite o aumento da fotoestabilidade do OMC (CHATELAIN; GABARD, 2001), o que pode ter contribuído, também, para a melhor capacidade fotoprotetora apresentada por esse semissólido. Além disso, as nanocápsulas atuam refletindo a luz, o que contribui para a obtenção de formulações mais efetivas (item 6.2.10)

Em relação às formulações contendo filtros solares na forma livre, o aumento da concentração de 1 mg/mL de filtro solar (em g_{OMC}) para 3 mg/mL de filtros solares (g_{OMC-OCT-BMT}) não alterou o tempo de meia-vida do resveratrol. Nessas formulações, foram empregadas as mesmas concentrações utilizadas nas nanopartículas, para que fosse possível fazer um comparativo. Portanto, a nanoencapsulação dos filtros solares permitiu obter formulações com melhor capacidade absorviva em relação às respectivas formulações não-nanotecnológicas.

Tabela 25. Parâmetros cinéticos (coeficiente de correlação r, modelo do critério de seleção MSC, constante cinética k, tempo de meia-vida $t_{1/2}$) do efeito das formulações fotoprotetoras g_{OMC-OCT-BMT}, g_{NC1}, g_{NC2}, g_{NC3}, g_{NC4}, na fotodegradação do resveratrol.

Formulação	r	MSC	k	$t_{1/2}$ (min)
g _{OMC-OCT-BMT}	0,9767± 0,0013	2,3145 ± 0,4241	0,0346± 0,0013	19,9903 ± 2,6904 ^c
g _{NC2}	0,9078±0,0327	1,1060± 0,0640	0,0098± 0,0002	70,5158 ± 2,1058 ^b
g _{NC3}	0,9900 ± 0,0281	1,3544 ± 0,5351	0,0096 ± 0,0004	71,3793 ± 4,4456 ^b
g _{NC4}	0,9710± 0,0198	2,1195± 0,4180	0,0082± 0,0002	83,8057 ± 2,5601 ^a

As médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

6.3.7. Avaliação de penetração cutânea das formulações

De acordo, com o estudo anterior, a formulação g_{NC4} apresentou um melhor desempenho aumentando o tempo de meia-vida do resveratrol em relação à formulação contendo os filtros não-nanoencapsulados e em relação às formulações g_{NC2} e g_{NC3}. Assim, o estudo de penetração cutânea foi realizado para a formulação g_{NC4} e o gel contendo os filtros na forma livre. Embora, as formulações analisadas contenham os três filtros solares (OMC, OCT e BMT) concomitantemente, os resultados são apresentados

separadamente para cada filtro solar com intuito de facilitar a visualização. As Figuras 44, 45 e 46 apresentam os resultados de retenção cutânea no estrato córneo de cada um dos filtros solares nanoencapsulados ou na forma livre.

A Figura 42 apresenta os resultados de retenção cutânea do OMC. No tempo de 2 horas, não houve diferença ($p > 0,05$) do filtro solar proveniente das formulações no estrato córneo. Porém, no tempo de análise de 6 horas, o OMC da formulação g_{NC4} apresentou maior retenção em relação à formulação $g_{OMC-OCT-BMT}$ ($p < 0,001$). Relacionando-se o efeito do tempo, houve redução da concentração tanto do OMC proveniente do $g_{OMC-OCT-BMT}$ como do OMC proveniente de g_{NC4} de 2 para 6 horas ($p < 0,001$). Contudo, a concentração de g_{NC4} se manteve mais alta, demonstrando que a formulação é capaz de sustentar a liberação do filtro.

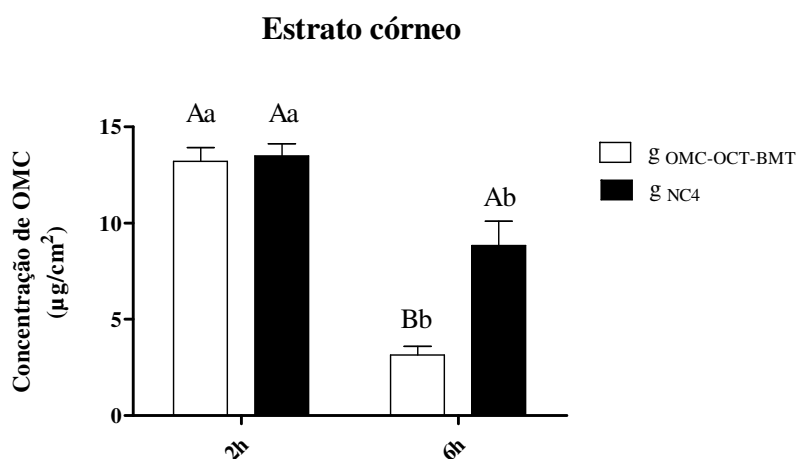


Figura 42. Distribuição do OMC das formulações $g_{OMC-OCT-BMT}$, g_{NC4} no estrato córneo, no período de 2 horas e 6 horas. As médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem dentro do mesmo período de tempo (2 horas ou 6 horas). As médias seguidas por letras minúsculas iguais não apresentam diferença entre os períodos de tempo (entre 2 horas e 6 horas).

Também foi realizado um comparativo da distribuição do OMC no estrato córneo das formulações contendo somente esse filtro solar nanoencapsulado (g_{NC1}) e aquelas contendo a associação de filtros nanoencapsulados (g_{NC4}). A retenção do OMC da formulação g_{NC1} foi maior que o encontrado para a formulação g_{NC4} , tanto no tempo de 2 horas como no de 6 horas. O OMC de g_{NC1} apresentou distribuição de aproximadamente, $140 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $70 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ em 2 horas e 6 horas, respectivamente. Já o OMC de g_{NC4} apresentou retenção de aproximadamente $13 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ em 2 horas e 8

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ em 6 horas de análise. Gupta e colaboradores (1999) avaliaram a penetração cutânea de filtros solares isoladamente ou em associação, e também observaram que quando foi realizada associação dos filtros, houve menor retenção do OMC no estrato córneo.

Na Figura 43 está apresentada a distribuição de octiltriazona a partir do g_{OMC-OCT-BMT} e do g_{NC4} no estrato córneo. Em 2 horas, a OCT da formulação g_{NC4} não apresentou maior retenção que a OCT da formulação livre ($p>0,05$). Em 6 horas, observa-se que há redução da concentração de OCT de ambas as formulações em comparação com o tempo de 2 horas ($p<0,001$). No entanto, a OCT da formulação g_{NC4} obteve maior retenção nesse tempo de análise ($p<0,001$).

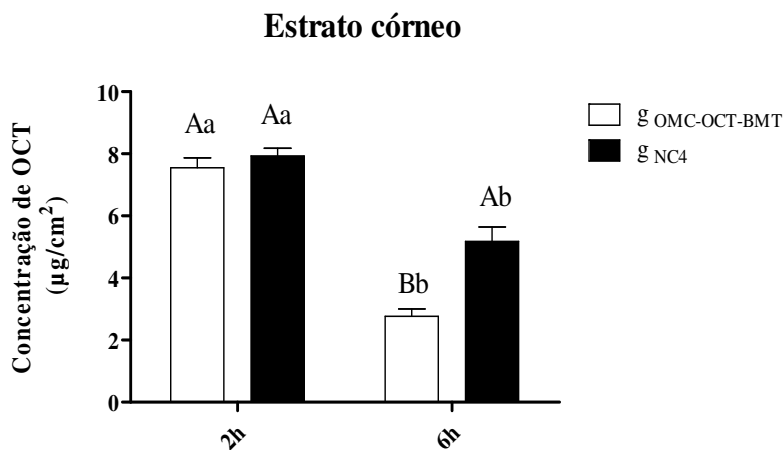


Figura 43. Distribuição do OCT das formulações g_{OMC-OCT-BMT}, g_{NC4} no estrato córneo, no período de 2 horas e 6 horas. As médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem dentro do mesmo período de tempo (2 horas ou 6 horas). As médias seguidas por letras minúsculas iguais não apresentam diferença entre os períodos de tempo (entre 2 horas e 6 horas).

Em estudo realizado por Potard e colaboradores (1999), formulações fotoprotetoras contendo filtros solares orgânicos OMC, benzofenona-3, benzofenona-4, octiltriazona e octocrileno apresentaram comportamento semelhante àquele apresentado pelos filtros solares do presente estudo. Os autores descrevem que após 16 horas de experimento em pele humana, os filtros solares OMC e OCT apresentaram maior retenção no estrato córneo, próximo a $9,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para o OMC e $4,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para o OCT. Esses dois filtros juntamente com a benzofenona-3 e o octocrileno possuem caráter

lipofílico, apresentando, portanto maior acúmulo no estrato córneo. Já a benzofenona-4 apresentou menor retenção nessa camada devido ao seu caráter mais hidrofílico.

O BMT apresentou comportamento diferente (Figura 44) daqueles observados para os filtros solares OMC e OCT (Figuras 42 e 43). Em 2 horas de análise não se observou diferença da retenção do filtro solar ($p>0,05$) para nenhuma das formulações (livre e nanoencapsulada). Porém, no tempo de 6 horas, a concentração no tecido da formulação de BMT encapsulado aumentou ($p<0,001$) em relação ao tempo de 2 horas e à formulação de BMT não encapsulado. Por sua vez, a concentração do filtro solar da formulação g_{OMC-OCT-BMT} reduziu em 6 horas em comparação com a retenção obtida para essa formulação no tempo anterior de análise ($p<0,001$).

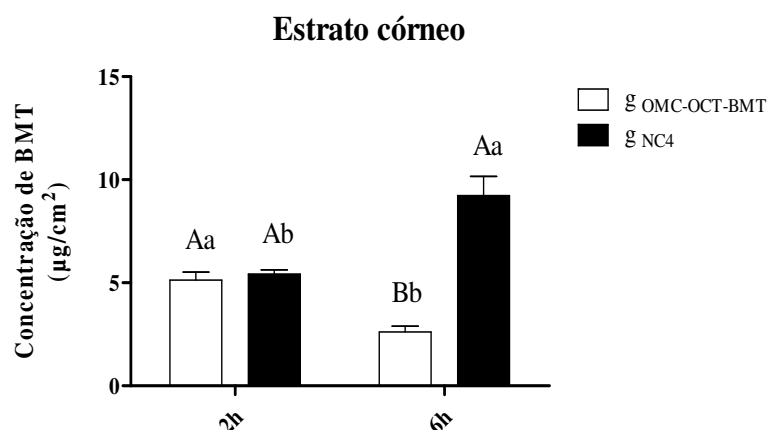


Figura 44. Distribuição do BMT das formulações g_{OMC-OCT-BMT}, g_{NC4} no estrato córneo, no período de 2 horas e 6 horas. As médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem dentro do mesmo período de tempo (2 horas ou 6 horas). As médias seguidas por letras minúsculas iguais não apresentam diferença entre os períodos de tempo (entre 2 horas e 6 horas).

Os resultados obtidos para a retenção dos filtros no estrato córneo podem ser explicados pelos seguintes motivos:

- O OMC atua como veículo dos demais filtros solares, o que pode ter consequentemente dificultado a sua liberação, explicando o motivo pelo qual, a formulação g_{NC1} apresentou maior retenção que g_{NC4}.

- Quando são desenvolvidos fotoprotetores contendo filtros solares cristalinos, tais como a octiltriazona, é necessária a solubilização desses para que haja difusão do filtro solar para a pele. A baixa retenção no estrato córneo para 2 horas de análise do OCT e BMT pode ser devido à baixa solubilidade de ambos os filtros nos óleos utilizados nesse trabalho. A OCT apresenta 14% de solubilidade em OMC e 6% em triglicerídeos de cadeia média, enquanto que o BMT apresenta 17% de solubilidade em OMC e 5% em TCM (HERZOG et al., 2013). Assim, devido à solubilidade limitada do OCT e BMT, a difusão para a pele pode se tornar mais lenta tanto para formulação livre como para a nanoencapsulada.
- A maior retenção dos filtros contidos nas nanocápsulas após 6 horas de análise pode ser devido ao maior tempo de oclusão possibilitando aumento na hidratação da pele, favorecendo uma melhor difusão dos filtros (CROSS et al., 2001) ou também pode ser devido à liberação sustentada proporcionada pelos filtros solares nanoencapsulados.
- O bemotrizinol (BMT) quando nanoencapsulado apresentou comportamento diferente do OMC e OCT nanoencapsulados, possibilitando dobrar a concentração de BMT de g_{NC4} em comparação com o BMT de $g_{OMC-OCT-BMT}$. Esse efeito pode ser devido ao fato do BMT apresentar maior solubilidade em OMC e TCM que a OCT, o que possibilita a sua maior difusão na pele.

Adicionalmente, nessas nanocápsulas contendo associação de filtros, na forma sólida, poderá haver uma estrutura mais rígida, menos flexível que nanocápsulas contendo somente o OMC. Com isso pode estar dificultada a penetração no estrato córneo de formulações contendo filtros solares nanoencapsulados em relação a formulações contendo OMC nanoencapsulado. Fiel e colaboradores (2011) realizaram estudo de microscopia de força atômica com intuito de verificar a flexibilidade de nanocápsulas e nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC). Nas últimas, no núcleo há a presença de uma dispersão de um sólido, o monoesterato de sorbitano, e um óleo, enquanto nas nanocápsulas, o núcleo é constituído somente de óleo. Assim, a presença do monoesterato de sorbitano em NLC tornou as nanopartículas mais rígidas em relação às nanocápsulas. Dessa forma, essa alteração de flexibilidade pode provocar

modificações nas propriedades de deformação das partículas, favorecendo ou dificultando a passagem por barreiras biológicas.

O conjunto dos resultados demonstrou que a veiculação dos três filtros em nanocápsulas também contribuiu para um melhor desempenho, refletido pela formulação g_{NC4} após 6 horas de análise. Para uma proteção solar adequada, normalmente é necessária a reaplicação do fotoprotetor a cada 2 horas. Porém, frequentemente, a sua reaplicação após esse período não é um costume para muitos usuários (PRUIM et al., 1999). Nesse caso, formulações como g_{NC4} mostram-se interessante, pois garantem maior eficácia na proteção contra a radiação UVA e UVB, por um maior tempo de exposição à radiação.

As Figuras 45, 46 e 47 apresentam a retenção cutânea na epiderme viável para cada um dos filtros solares das formulações livre ou nanoencapsulada. Para os filtros OMC e BMT, não se observou diferença entre a formulação nanoencapsulada (g_{NC4}) ou livre ($g_{OMC-OCT-BMT}$) ($p > 0,05$). Também não se observou variação de concentração dos filtros que penetraram nessa camada em diferentes tempos de análise ($p > 0,05$). Para o OCT (Figura 48), observou-se somente que em maior tempo de análise, há redução da quantidade de filtro disponível no tecido tanto para a formulação livre quanto para a nanoencapsulada em relação ao tempo inicial ($p < 0,001$).

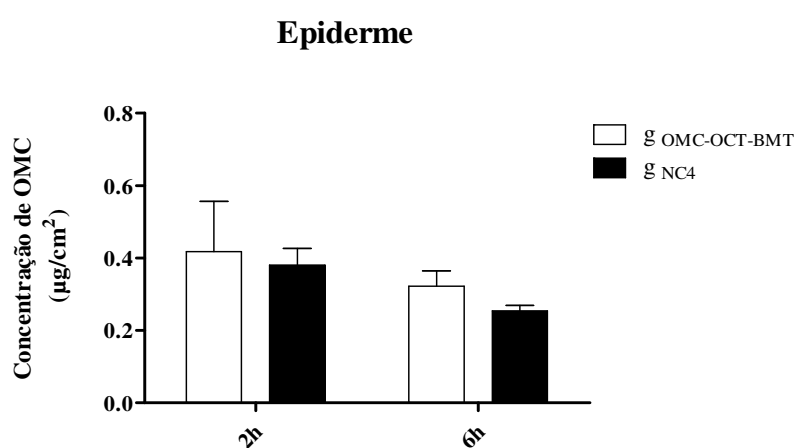


Figura 45. Distribuição do OMC das formulações $g_{OMC-OCT-BMT}$, g_{NC4} na epiderme, no período de 2 horas e 6 horas.

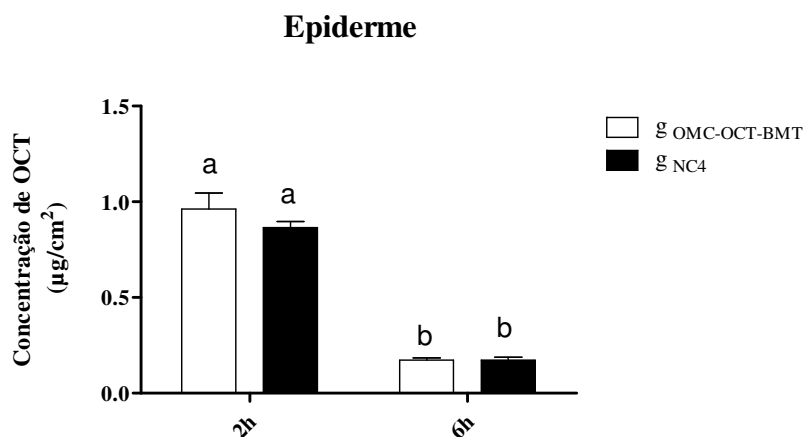


Figura 46. Distribuição do OCT das formulações g OMC-OCT-BMT, g NC4 na epiderme, no período de 2 horas e 6 horas. As médias seguidas por letras minúsculas iguais não apresentam diferença entre os períodos de tempo (entre 2 horas e 6 horas).

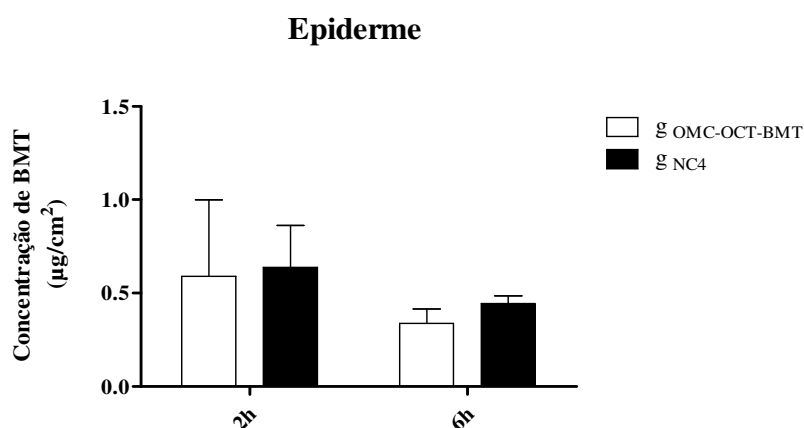


Figura 47. Distribuição do BMT das formulações g OMC-OCT-BMT, g NC4 na epiderme, no período de 2 horas e 6 horas.

As Figuras 48, 49 e 50 apresentam a retenção na derme para cada um dos filtros solares das formulações livre ou nanoencapsulada. Na derme, da mesma forma como observado na epiderme, a única diferença observada deve-se ao OCT (Figura 49), o qual apresenta redução da concentração em função do tempo para ambas formulações ($p < 0,001$). Contudo, não foi possível a sua detecção no meio receptor, indicando a baixa penetração desse filtro em camadas mais profundas da pele. Para os outros filtros, não se observa diferença de retenção nessa camada ($p < 0,05$) (Figuras 48 e 50).

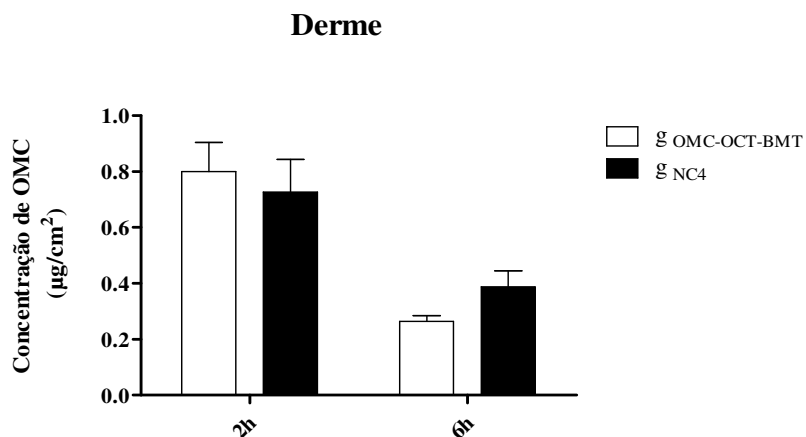


Figura 48. Distribuição do OMC das formulações g OMC-OCT-BMT e g NC4 na derme, no período de 2 horas e 6 horas.

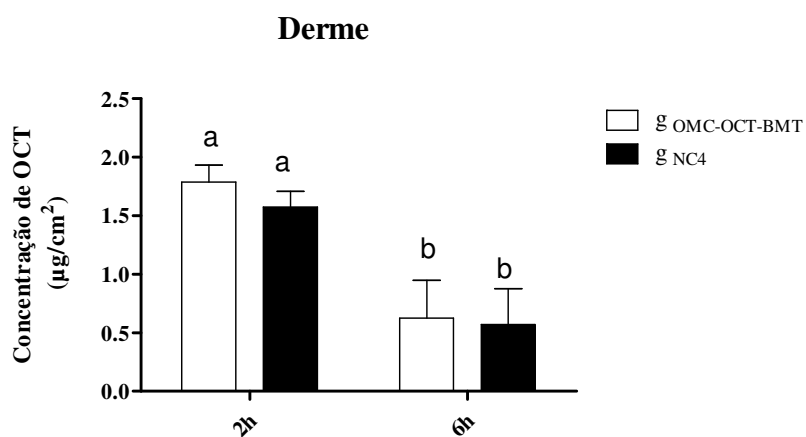


Figura 49. Distribuição do OCT das formulações g OMC-OCT-BMT, g NC4 na derme, no período de 2 horas e 6 horas. As médias seguidas por letras minúsculas iguais não apresentam diferença entre os períodos de tempo (entre 2 horas e 6 horas).

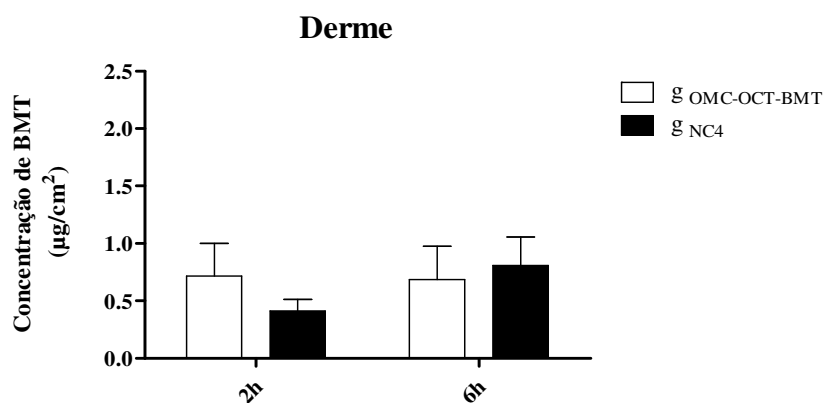


Figura 50. Distribuição do BMT das formulações g OMC-OCT-BMT, g NC4 na derme, no período de 2 horas e 6 horas.

Durand e colaboradores (2009) preparam formulações contendo associação de filtros solares e determinaram a penetração cutânea dos mesmos. Visto que o filtro solar bisoctrizole apresentou menor passagem através da pele em comparação com o OMC, os autores observaram que a penetração cutânea está relacionada ao peso molecular. Filtros com peso molecular acima de 500 g mol^{-1} têm uma penetração cutânea mais dificultada. Assim, a baixa penetração do BMT e OCT observada nesse estudo tanto para epiderme como para a derme, deve-se ao peso molecular que esses apresentam. Por sua vez, o OMC embora apresente peso molecular menor (SWEETMAN, 2009), é lipossolúvel, o que faz com que o mesmo tenha baixa afinidade pela derme (WEISS-ANGELI et al., 2010).

No meio receptor, não foi possível quantificar a presença dos demais filtros (OMC e BMT) em nenhum dos tempos analisados estando de acordo com dados já publicados na literatura. Puglia e colaboradores (2014) verificaram que não foi possível detectar a presença de OCT e BMT de nanopartículas lipídicas no meio receptor. Em relação ao OMC, os autores verificaram que houve permeação, em baixa concentração, mas que o fluxo obtido foi menor para os carreadores lipídicos nanoestruturados em relação à nanoemulsões, demonstrando o anteriormente relatado de que nanopartículas são melhores carreadores para filtros solares.

Recentemente, a regra dos 500 Daltons, passou a ser recomendada pela União Européia. De acordo com essa lei, filtros solares que apresentem peso maior que 500 daltons, terão baixa penetração cutânea, uma vez que essas moléculas por serem grandes, não conseguem passar pela camada córnea (BOS; MEINARDI, 2000). Tanto a octiltriazona, que apresenta peso de 823 Daltons, quanto o bemotrizinol, com peso de 629 Daltons, apresentam como característica a baixa penetração cutânea (SAATH, 2010). Assim, a substantividade dos filtros solares pode ser garantida (POTARD et al., 1999). Essa característica se refere à habilidade que os mesmos têm de serem ou ficarem absorvidos a substratos da queratina, minimizando a penetração percutânea dos mesmos (VARVARESOU, 2006), explicando assim a baixa penetração na epiderme viável, derme e ausência no meio receptor nesse trabalho.

Embora g_{NC4} não tenha apresentado comportamento superior no estrato córneo que o gel livre ($g_{OMC-OCT-BMT}$) em 2 horas de análise, tendo sido requerido maior tempo

de contato, o mesmo demonstrou eficiente capacidade fotoprotetora. A eficiente encapsulação dos filtros (os quais obtiveram taxa de encapsulação acima de 98%), juntamente com as nanopartículas, que apresentam efeito no bloqueio da radiação UV, demonstra que carreadores nanoparticulados podem eficientemente serem aplicados para veiculação de filtros solares.

6.3.8. Capacidade absorptiva dos hidrogéis

A capacidade absorptiva dos hidrogéis $g_{\text{OMC-OCT-BMT}}$, g_{NC2} , g_{NC3} e g_{NC4} está apresentada na Figura 51. As formulações apresentaram 4 picos de absorção, em 225, 310, 314 e 343 nm. A absorção em 310 nm corresponde à absorção do OMC e BMT; 314 nm corresponde à absorção máxima da OCT e 343 nm à absorção máxima do BMT (GONTIJO et al., 2009). As formulações contendo as suspensões de nanopartículas apresentaram absorbância próxima à formulação livre para o λ máximo de absorção, contudo apresentaram absorbância superior em outros comprimentos de onda. Esse resultado sugere uma ação das nanocápsulas como filtros físicos (WISSING; MÜLLER, 2002b), contribuindo para o aumento da absorbância em determinadas regiões do espectro. Para 343 nm, observou-se que a encapsulação dos filtros acarretou uma maior absorção, especialmente a formulação g_{NC3} , a qual contém maior concentração de BMT. A formulação g_{NC4} , foi aquela que apresentou os maiores valores de absorbância, mesmo com os filtros (OCT e BMT) em menor concentração, aumentando, assim, a capacidade que os mesmos têm de absorver a radiação.

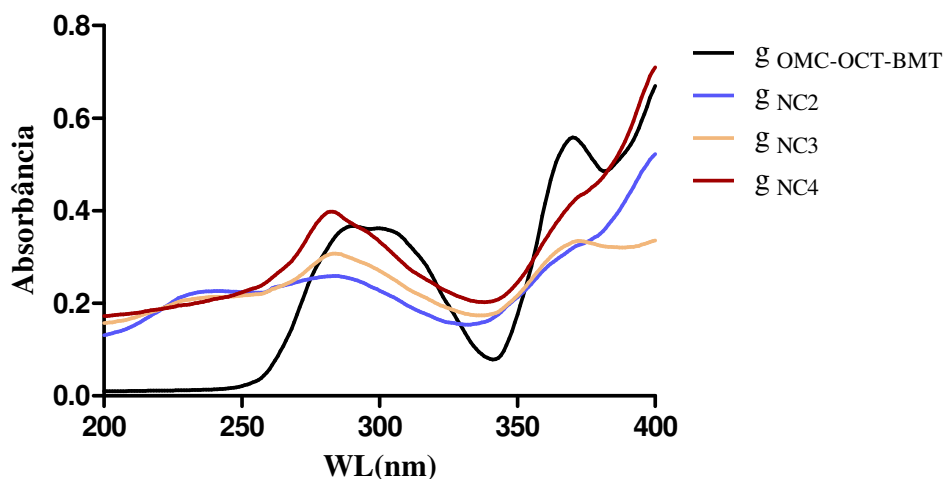


Figura 51. Análise da capacidade absorptiva das formas semissólidas: g OMC-OCT-BMT, g NC2, g NC3, g NC4 por espectrofotometria.

A Figura 52 apresenta a capacidade absorptiva dos géis contendo as suspensões de nanopartículas apenas. A formulação g_{NC4} apresentou melhor desempenho na absorção da radiação, resultado o qual está relacionado com a sua maior capacidade fotoprotetora (item 6.3.6) e pelo fato de apresentar mais filtros solares que g_{NC1}. Ainda, esse resultado sugere que exista um sinergismo entre os filtros, uma vez que essa formulação (g_{NC4}) apresentou melhor desempenho do que aquelas (g_{NC2} e g_{NC3}) contendo associação do OMC com somente um dos demais filtros contendo o dobro de concentração. Embora as formulações g_{NC2} e g_{NC3} apresentem mais de um filtro solar em sua composição, estas não apresentaram melhor desempenho na absorção da radiação ultravioleta quando comparadas com a formulação contendo apenas OMC. Esse resultado ainda se correlaciona à capacidade fotoprotetora apresentada por esses semissólidos, os quais não apresentaram diferença entre si (item 6.3.6).

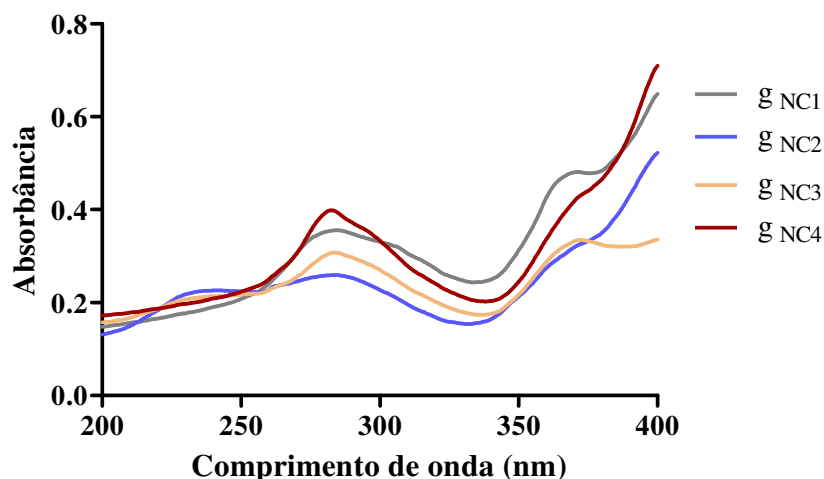


Figura 52. Análise da capacidade absorptiva das formas semissólidas: g_{NC1} , g_{NC2} , g_{NC3} , g_{NC4} por espectrofotometria.

Assim, a encapsulação do OMC (NC_1) propiciou a obtenção de géis contendo essas suspensões com melhor capacidade absorptiva em relação aos demais hidrogéis contendo somente OMC. A obtenção de formulações com mais de um filtro solar encapsulado oferece efeito adicional na capacidade absorptiva. As formulações g_{NC4} , contendo um total de 3 mg/mL de filtros solares, e g_{NC1} , contendo somente OMC, apresentaram a melhor capacidade absorptiva, o que pode acarretar em aumento no FPS dessas formulações.

Conforme descrito por Nikolic e demais autores (2011), o desenvolvimento de fotoprotetores com menor concentração de filtros solares pode reduzir os possíveis efeitos colaterais, mas que permitam ainda um aumento de FPS. Essa é uma estratégia interessante principalmente para o desenvolvimento de formulações destinadas ao uso em regiões mais delicadas, para as quais o consumidor está disposto a investir mais, garantindo assim um produto mais efetivo e mais seguro.

6.3.9 Avaliação de peles suínas tratadas com os semissólidos

Na Figura 53 estão apresentadas as fotomicrografias das peles tratadas com os semissólidos. Esses resultados estão em concordância com os dados anteriores da

capacidade fotoprotetora, penetração cutânea e capacidade absorptiva. A formulação g_{NC4}, apresentou maior retenção no estrato córneo (item 6.3.7), em período de exposição prolongada, o que se reflete na sua maior capacidade fotoprotetora (item 6.3.6) e capacidade absorptiva (6.3.8). Por sua vez, a formulação g_{OMC-OCT-BMT} pelo fato de ter apresentado menor retenção no estrato córneo (item 6.3.7), menor capacidade fotoprotetora (6.3.6) e absorptiva (6.3.8), propiciou menor fotoproteção.

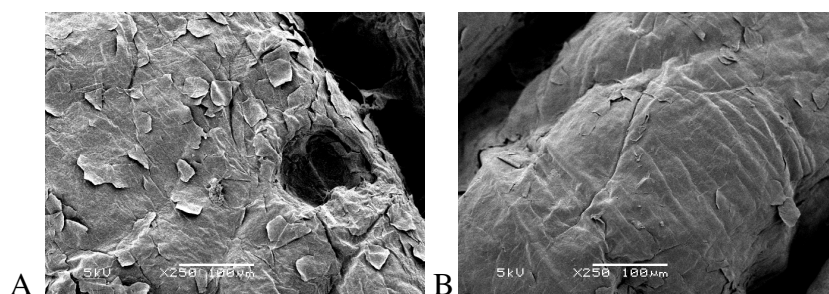


Figura 53. Fotomicrografias das peles suínas obtidas por MEV após exposição à radiação UVB. Pele suína tratada com g_{OMC-OCT-BMT} (A), pele suína tratada com g_{NC4} (B).

A Figura 54 apresenta as fotomicrografias dos pelos tratados com os semissólidos. Conforme já evidenciado para as formulações contendo somente OMC, a obtenção de nanocápsulas contendo filtros solares apresenta efeito fotoprotetor. Esses resultados demonstram que tanto as formulações contendo somente OMC como aquelas contendo associação dos filtros, podem ter também aplicação para prevenção de danos capilares provocado pela radiação UV.

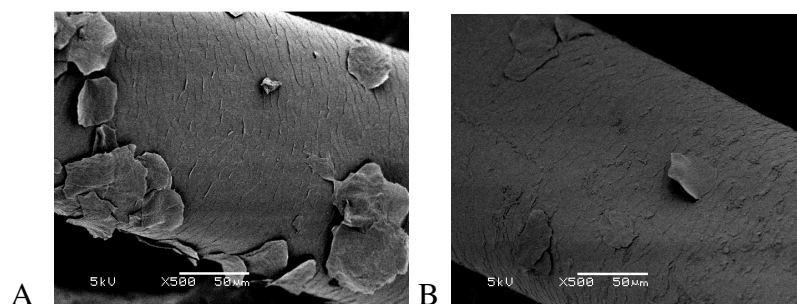


Figura 54. Fotomicrografias de pelo suíno obtidas por MEV. Pelo suíno tratado com g_{OMC-OCT-BMT} (A), pelo suíno tratado com g_{NC4} (B).

7. CONCLUSÃO

Nesse trabalho foram preparados três grupos de formulações nanotecnológicas com variações quantitativas no núcleo oleoso, os quais foram devidamente caracterizados pelas técnicas de espectroscopia de correlação de fótons e difração de laser, apresentando tamanho nanométrico condizente para todas as técnicas. A avaliação da estabilidade química para as formulações contendo somente OMC, no núcleo das nanocápsulas, em concentração de 1mg/mL ou 4,8 mg/mL, demonstrou que a concentração ideal para eficiente encapsulação, é a de menor concentração. Adicionalmente, as formulações mostraram-se estáveis após avaliação por espalhamento múltiplo de luz.

A secagem das nanopartículas contendo somente OMC ou associação de OMC e TCM foi obtida com sucesso. As formulações secas contendo OMC e TCM, denominadas de NC_{1 s}, propiciaram a retomada do tamanho nanométrico. No estudo do gradiente de densidade, a formulação NC₁ (contendo OMC e TCM), apresentou uma menor tendência a formação de mistura de nanoestruturas, apontando a necessidade da incorporação desse agente ao núcleo das nanopartículas. Essa modificação na formulação ainda mostrou-se efetiva para um aumento da fotoestabilização OMC. A obtenção da forma pulverulenta NC_{1 s}, também aumentou de forma significativa o tempo de meia-vida do OMC, o que aponta a secagem como uma boa estratégia para a fotoestabilização desse filtro solar.

Todas as formas semissólidas contendo os nanoinsumos avaliados através da determinação do pH, comportamento reológico, características organolépticas e estabilidade, mostram-se adequadas para aplicação cosmética e uso tópico. O uso do adjuvante hidrofílico lactose facilitou a incorporação da maioria das formas pulverulentas em hidrogéis.

A composição do núcleo oleoso das nanocápsulas influenciou no perfil de distribuição cutânea dos hidrogéis contendo essas nanopartículas. A formulação g_{NC1}, obtida a partir da suspensão contendo OMC e TCM, apresentou desempenho bastante superior ao g_{NC0}, obtido a partir da suspensão contendo somente metoxicinamato de octila. A análise por calorimetria exploratória diferencial permitiu verificar que a presença concomitante de TCM e OMC em NC₁ acarretou uma mudança no pico de fusão do TCM, o que sugere uma interação que pode levar a uma modificação na

difusão do OMC das nanopartículas, propiciando a sua maior liberação em relação à formulação contendo somente metoxicinamato de octila. As formulações contendo as suspensões secas não apresentaram adequada retenção no estrato córneo, não sendo portando as formulações fotoprotetoras mais adequadas. A formulação g_{NC1 S}, apresentou maior retenção na derme, o que indica também que essa formulação é interessante para veicular substâncias para as quais se requer ação nessa camada da pele. No estudo da capacidade fotoprotetora e absorvidade molar, g_{NC1} também apresentou melhor desempenho. A avaliação das peles suínas expostas à radiação e tratadas com os fotoprotetores também demonstrou maior proteção conferida pelos géis contendo suspensão de nanopartículas quando comparado com suas respectivas formulações contendo o(s) filtro(s) livre(s).

As suspensões contendo associação de filtros, preparados a partir da formulação NC₁, foram estruturadas com base em variações na concentração dos filtros octiltriazone e bemotrizinol. Essas formulações apresentaram adequada caracterização após análise de tamanho de partícula, pH e aspectos visuais. Essas também demonstraram adequada estabilidade física durante o tempo de análise, sendo, portanto esses insumos adequados para veiculação em semissólidos. A avaliação dos géis mostrou que os mesmos apresentaram características adequadas para aplicação cutânea.

No estudo de penetração cutânea, a formulação g_{NC4}, contendo um total de 3 mg/mL de filtros solares encapsulados (1 mg/mL do metoxicinamato de octila, 1 mg/mL de octiltriazone e 1 mg/mL de bemotrizinol) apresentou maior retenção no estrato córneo para 6 horas de tempo de análise, sendo essa formulação interessante para garantir maior proteção frente à exposição ultravioleta em período de tempo prolongado. No estudo da capacidade fotoprotetora e capacidade absorviva, o hidrogel g_{NC4} apresentou melhor performance, superior até mesmo àquele apresentado por g_{NC1}. Esse resultado deve-se à maior quantidade de filtros solares contidos em g_{NC4}, os quais podem estar atuando sinergicamente. Na avaliação das peles suínas tratadas com o gel g_{NC4} ou o gel contendo filtros solares na forma livre, da mesma forma como observado para os géis contendo somente OMC, as nanocápsulas conferiram melhor efeito fotoprotetor. Portanto esse trabalho demonstra a superioridade das nanopartículas desenvolvidas, levando a resultados bastante superiores em relação às formas convencionais.

O conjunto dos resultados demonstrou a possibilidade de veiculação de mais de um filtro solar no núcleo de nanocápsulas, sem a perda das características nanotecnológicas do sistema. Ficou evidente que essa veiculação foi benéfica visto que a formulação onde os filtros estavam em menor concentração individual (1mg/mL cada em NC₄, ao invés de 2 mg/mL como em NC₂ e NC₃) apresentou resultados superiores quanto à absorvidade molar e a capacidade fotoprotetora.

8. REFERÊNCIAS

ALLEN JUNIOR, L.V.; POPOVICH, N.G; ANSEL, H.C. *Formas farmacêuticas & sistemas de liberação*. 9ªed. Porto Alegre: Artmed, p.405-407, 2013.

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

ALVAREZ-ROMÁN, R.; KALYA, Y.N.; GUY, R.H.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release* , v.9, p.53–62, 2004a.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R.H.; FESSI, H. Enhancement of Topical Delivery from Biodegradable Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, v.21, p. 1818-1825, 2004b.

ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. *Pharmazie*, v.60, p.900-904, 2005.

AUBIN, F. Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. *European Journal of Dermatology*, v.13, p. 515-523, 2003.

AULTON, M.E. *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora, p.58, 389-390, 2005.

BARRY, B.W.; WARBURTON,B. Some Rheological Aspects of cosmetics. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, v. 9, p. 725-744, 1968.

BASF. Uvinul[®], Uvinul T[®] 150. Data Sheet, 2001. Disponível em <www.basf.com>. Acesso em 13 de abril de 2013.

BASF, Tinosorb S[®]. Technical Information, 2011. Disponível em< www.basf.com>. Acesso em 01 de outubro de 2013.

BECK, R.C.R; POHLMANN, A.R.; HOFFMEISTER, C.; GALLAS, M.R.; SCHAEFER, U.F.; GUTERRES, S.S.; LEHR, C.M.. Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: Correlation between in vitro drug release and drug transport across Caco-2 cell monolayers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 67, p. 18–30, 2007.

BENSON, H.A.E.; SARVEIYA, V.; RISK. S.; ROBERTS, M.S. Influence of anatomical site and topical formulation on skin penetration of sunscreens. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, v.1, p. 209-218, 2005.

BOS, J.D.; MEINARDI, M.M.H.M. The 500 Dalton Rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental Dermatology*, v.9, p.165-169, 2000.

BOSE, B.; AGARWAL, S.; Chatterjee, S.N. UV-A induced lipid peroxidation in liposomal membrane. *Radiation and Environmental Biophysics*, V.128, p. 59-65, 1989.

BRASH,D.E.; RUDOLPH, J.A.; SIMON, J.A.; LIN, G.; MCKENNA, G.J.; BADEN, H.P.; HALPERIN, A.J.; PONTÉN, J. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.188, P. 10124-10128, 1991.

BRASH, D.E.; JONASON, A.S.; KUNALA, S.; LEFFELL, D.J. Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotions. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceeding*, v. 1, p.136, 2002 (Abstract).

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº899. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, 2003. Disponível em http://www.portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>.

BRASIL, Resolução nº 01. Guia para realização de estudos de estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: DF, 2005. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18109&word>. Acesso em 07 de janeiro de 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA- 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 União, Brasília, DF, 17 mar. 2006. Disponível em: <http://www.e-legis.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20 de mar. 2013.

BUTLER, H (Ed). *Poucher's perfumes, cosmetics and soaps*. 10ªed. Dordrecht Kluwer Academic: Nova Iorque, p.394,395, 2000.

BUTT, S.T.; CHRISTENSEN, T. Toxicity and phototoxicity of chemical sun filters. *Radiation Protection Dosimetry*, v. 91, p. 283–286, 2000.

CALDERILLA-FAJARDO, S.B.; CÁZARES-DELGADILLO, J.; VILLALOBOS-GARCÍA, R.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; GANEM-QUINTANAR, A.; ROBLES, R. Influence of sucrose esters on the in vivo percutaneous penetration of octyl methoxycinnamate formulated in nanocapsules, nanoemulsion, and emulsion. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.31, p.107-113, 2006.

CARLOTTI, M.E.; SAPINO, S.; VIONE, D.; PELIZZETTI, R.; UGAZIO, E.; MOREL, S. Study on the Photostability of Octyl-p-Methoxy Cinnamate in SLN. *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 26, p.809–816, 2005.

CHATELAIN, E.; GABARD, B. Photostabilization of Butyl methoxydibenzoylmethane (Avobenzon) and Ethylhexyl methoxycinnamate by Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), a New UV Broadband Filter. *Photochemistry and Photobiology*, v.74, p.401-405, 2001.

CHATELAIN, E.; GABARD, B.; SURBER, C. Skin Penetration and Sun Protection Factor of Five UV Filters: Effect of the Vehicle. *Skin pharmacology and applied skin physiology*, v.16, p.8-35, 2003.

COBLENTZ, W.W. The Copenhagen Meeting Of The Second International Congress On Light. *Science*, v.76, p.412-415, 1932.

CONTRI, R.V.; KATZER, T.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Chitosan Hydrogel Containing Capsaicinoids-Loaded Nanocapsules: An Innovative Formulation for Topical Delivery. *Soft Materials*, v. 8, p. 370-385, 2010.

COUVREUR, P.; BARRAT, G.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v.19, p.99-134, 2002.

CROSS, S.E.; JIANG, R.; BENSON, H.A.; ROBERTS, M.S. Can Increasing the Viscosity of Formulations be used to Reduce the Human Skin Penetration of the Sunscreen Oxybenzone? *Journal of Investigative Dermatolog*, v. 117, p. 147–150, 2001.

DARVIN, M.E.; HAAG, S.F.; LADEMANN, J., ZASTROW, L.; WOLFRAM, S.; MEINKE, M. Formation of Free Radicals in Human Skin during Irradiation with Infrared Light. *Journal of Investigative Dermatology*, v.130, p.629-631, 2010.

DE HAES, P.; GARMYN, M.; DEGREEF, H.; VANTIEGHEM, K.; BOUILLON, R.; SEGAERT, S. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits ultraviolet B induced apoptosis, Jun kinase activation, and interleukin-6 production in primary human keratinocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 89, p. 663–673, 2003.

DIFFEY, B.L. When should sunscreen be reapplied? *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 45, p.882-885, 2001.

DURAND, L.; HABRAN, N.; HENSCHER, V. A.; AMIGHI, K. In vitro evaluation of the cutaneous penetration of sprayable sunscreen emulsions with high concentrations of UV filters. *International Journal of Cosmetic science*, v. 31, p. 279-292, 2009.

EKAMBARAM, P.; SATHALI, A.H.; PRIYANKA, K. Solid lipid nanoparticles: a review. *Scientific Reviews & Chemical Communications*, v.2, p. 80-102, 2012.

FIEL, L.A.; REBELO, L.M.; SANTIADO, T.M.; ADORNE, M.D.; GUTERRES, S.S.; SOUSA, J.S. POHLMANN, A.R. Diverse deformation properties of polymeric nanocapsules and lipid-core Nanocapsules. *Soft Matter*, v.7, p.7240-7247, 2011.

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

FORSTER, T.H.; WALDMANN-LAUE, M.; BOTH, W.; JASSOY, C. Lipoprotein Creams: Utilization of Multifunctional Ingredients for the Preparation of Cosmetic Emulsions with Excellent Skin Compatibility. *International Journal of Cosmetic Science*, v.21, p. 253-264, 1999.

GARBE, C.; PERIS, K.; HAUSCHILD, A.; SAIAG, P.; MIDDLETON, M.; SPATZ, A.; GROB, J.J.; MALVEHY, J.; NEWTON-BISHOP, J.; STRATIGOS, A.; PEHAMBERGER, H.; EGGERMONT, A. Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *European Journal of Cancer*, v. 46, p. 270-283, 2010.

GASPAR, L.R.; CAMPOS, P.M.B.G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 250, p.34-44, 2003.

GILCHREST, B.A.; KRUTMANN, J. (Eds). *Skin aging*. Springer: Berlin, p.9-22, 33-44, 2006.

GULBAKE, A.; JAIN, A.; KHARE, P.; JAIN, S.K. Solid lipid nanoparticles bearing oxybenzone: In-vitro and in-vivo evaluation. *Journal of Microencapsulation*, v. 27, p. 226–233, 2010.

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

GUTERRES, S.S.; FESSI, H.; BARRAT, G.; DJ.-P. DEVISSAGUET, J.-P.; PUISIEUX, F. Poly(DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 113, p. 57-63, 1995.

GUTERRES, S.S.; WEISS, V.; DE LUCCA, F.L.; POHLMANN, A.R. Influence of Benzyl Benzoate as Oil Core on the Physicochemical Properties of Spray-Dried Powders from Polymeric Nanocapsules Containing Indomethacin. *Drug delivery*, v.7, p.195-199,2000.

GUTERRES, S.S.; MÜLLER, C.R.; MICHALOWSKI, C.B.; POHLMANN, A.R.; DALLA COSTA, T. Gastro-intestinal tolerance following oral administration of spray-dried diclofenac-loaded nanocapsules and nanospheres. *S.T.P Pharma Sciences*, v.11, p.229-233,2001.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. *Fundamentos de física*. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006,v.2.

HANNO, I.; ANSELMINI, C.; BOUCHEMAL, K. Polyamide Nanocapsules and Nano-emulsions Containing Parsol® MCX and Parsol® 1789: In Vitro Release, Ex Vivo Skin Penetration and Photo-Stability Studies. *Pharmaceutical Research*, v.29, p.559-573, 2012.

HAQUE, M.K.; ROOS, Y.H. Crystallization and X-ray diffraction of spray-dried and freeze-dried amorphous lactose. *Carbohydrate Research*, v. 340, p. 293-301, 2005.

HARVEY, D. *Modern Analytical Chemistry*. EUA: McGRAW-HILL, p. 369-371, 2000.

HATTORI, Y.; NISHIGORI, C.; TANAKA, T.; UCHIDA, K., NIKAIDO, O.; OSAWA, T.; HIAI, H.; IMAMURA, S.; TOKOYUNI, S. 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine Is Increased in Epidermal Cells of Hairless Mice after Chronic Ultraviolet B Exposure. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 107, p.107, 733–737, 1996.

HAYWOOD, R. Relevance of sunscreen application method, visible light and sunlight intensity to free-radical protection: A study of ex vivo human skin. *Photochemistry and Photobiology*, v. 82, 1123– 1131, 2006.

HERZOG, B.; GIESINGER, J.; SCHNYDER, M. Solubility of UV absorbers for sunscreens is essential for the creation of light feel formulations. *SÖFW Journal*, v.7, p.7-13, 2013.

HERZOG, B.; WEHRLE, M.; QUASS, K. Photostability of UV Absorber Systems in Sunscreens. *Photochemistry and Photobiology*, v.85, p.869-8878, 2009.

HOFFMEISTER, C. R.D.; DURLI, T.L.; , SCHAFFAZICK, S.R.; RAFFIN, R.P.; BENDER, E.A.; BECK, R.C.R.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Hydrogels containing redispersible spray-dried melatonin-loaded nanocapsules: a formulation for transdermal-controlled delivery. *Nanoscale Research Letters*, v., 7, p.1-13, 2012.

HOMMOSS, A. *Nanostructured lipid carriers (NLC) in dermal and personal care formulations*. Tese para obtenção do título de Doctor rerum naturalium. Free University Berlin: Alemanha; 2009.

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

ICH, International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 1996. Disponível em: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>. Acesso em: 02 de fevereiro 2012.

JÄGER, E.; Venturini, Cristina G.; Poletto, F. S.; Colomé, L. M.; Pohlmann, J.P.U; Bernardi, A.; Battastini, A. M. O.; Guterres, S.S.; Pohlmann, A. R. Sustained Release from Lipid-Core Nanocapsules by Varying the Core Viscosity and the Particle Surface Area. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v.5, p. 130-140, 2009.

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

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 10ªed. Guanabara Koogan:Rio de Janeiro, p.360, 366, 2004.

KALIA, Y.N.; GUY, R. Modeling transdermal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.48, p.159-172, 2001.

KALSI, P.S. *Spectroscopy of organic compounds*. 6thed. New Age International: New Delhi, p.9,2004.

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

KOIVUKANGAS, V.; KALLIOINEN, M.; AUTIO-HARMAINEN, H.; OIKARINEN, A. UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin in vivo. *Acta Dermato-Venereologica*, v. 74, p. 279–282, 1994.

KUNISADA, M.; SAKUMI, K.; TOMINAGA, Y.; BUDIYANTO, A.; UEDA, M.; ICHIHASHI, M.; NAKABEPPU, Y.; NISHIGORI C. 8-Oxoguanine formation induced by chronic UVB exposure makes Ogg1 knockout mice susceptible to skin carcinogenesis. *Cancer Research*, v. 15, p. 6006-60010, 2005.

KVAN, E.; TYRRELL, R. Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis*, v.18, p.2379-2384, 1997.

LIM, H.N.; DRAELOS, Z.D (Eds). *Clinical guide to sunscreens and photoprotection*. Informa HealthCare: Nova Iorque, p.7, 2009.

LIM, H.W.; HÖNIGSMANN, H.; HAWK, J.L. M (Eds). *Photodermatology*, Informa HealthCare: Nova Iorque, p.16-23, 42-54, 2007.

LOPES, S.E.C.; POHLMANN, A.R.; BASSANI, V.L.; GUTERRES, S.S. Polymeric colloidal systems containing ethionamide: preparation and physico-chemical characterization. *Pharmazie*, v. 55, p. 527-530, 2000.

LUPPI, B.; CERCHIARA, T.; BIGUCCI, F.; BASILE, R.; ZECCHI, V. Polymeric nanoparticles composed of fatty acids and polyvinylalcohol for topical application of sunscreens. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.56, p. 407-411, 2004.

MARCATO, P.D.; CAVERZAN, J.; ROSSI-BERGMANN, B.; PINTO, E.F.; MACHADO, D.; SILVA, R.A.; JUSTO, G.Z.; FERREIRA, C.V.; DURÁN, N. Nanostructured polymer and lipid carriers for sunscreens. Biological Effects and Skin permeation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 11, p.1880-1886, 2011.

MARRAKCHI, S.; MAIBACH, H.I. Biophysical parameters of skin: map of human face, regional, and age-related differences. *Contact dermatitis*, v.57, p. 28-34, 2007.

MARROT, L.; BELAIDI, J.P.; LEJEUNE, F.; MEUNIER, J.R.; ASSELINEAU, D.; BERNERD, F. Photostability of sunscreen products influences the efficiency of protection with regard to UV-induced genotoxic or photoageing-related endpoints. *British Journal of Dermatology*, v. 151, p. 1234–1244, 2004.

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

MENON, E.L.; MORRISON, H. Formation of Singlet Oxygen by Urocanic Acid by UVA Irradiation and Some Consequences Thereof. *Photochemistry and Photobiology*, v.75, p.565-569, 2002.

MITSUI, T. Stability of cosmetics. In: *New Cosmetic Science*. Elsevier: Amsterdam, p.191, 351-352, 1997.

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

MÜLLER, C.R.; BASSANI, V.L.; POHLMANN, A.R.; MICHALOWSKI, C.B.; PETROVICK, P.R.; GUTERRES S.S. Preparation and Characterization of Spray-Dried Polymeric Nanocapsules. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v.26, p. 343-347, 2000.

NICULAE, G.; LACATUSU, I.; BADEA, N.; MEGHEA, A. Lipid nanoparticles based on butyl-methoxydibenzoylmethane: in vitro UVA blocking effect. *Nanotechnology*, v. 23, p.1-10, 2012.

NICULAE, G.; BADEA, N.; MEGHEA, A.; OPREA, O.; LACATUSU, L. Coencapsulation of Butyl-Methoxydibenzoylmethane and Octocrylene into Lipid Nanocarriers: UV Performance, Photostability and in vitro Release. *Photochemistry and Photobiology*, v 89, p. 1085–1094, 2013.

NIKOLIC, S.; C.M. KECK, C.M.; ANSEMI, C.; MÜLLER, R.H. Skin photoprotection improvement: Synergistic interaction between lipid nanoparticles and organic UV filters. *International Journal of Pharmaceutics* , v. 414, p. 276– 284, 2011.

OLIVEIRA, C.P.; VENTURINI, C.G.; DONIDA, B.; POLETTO, F.S.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. An algorithm to determine the mechanism of drug distribution in lipid-core nanocapsule formulations. *Soft Matter*, v.9, p. 1141-1150, 2013.

OLIVEIRA-MARTÍNEZ, B. I.; CÁZARES-DELGADILLO, J.; CALDERILLA-FAJARDO, S.B.; VILLALOBOS-GARCÍA, R.; GANEM-QUINTANAR , A.; QUINTANAR-GUERRERO, D. Preparation of polymeric nanocapsules containing octyl methoxycinnamate by the emulsification–diffusion technique: penetration across the stratum corneum. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 94, p.1152- 1559, 2005.

ORSI, D.D.; GIANNINI, G.; GAGLIARDI, L. ; _PORRÀ, R.; SERRI, S.; BOLASCO, A.; CARPANI, L.; TONELLI, D. Simple Extraction and HPLC Determination of UV-A and UV-B Filters in Sunscreen Products. *Chromatographia*, v. 64, p.509-515, 2006.

PAESE, K. *Desenvolvimento tecnológico, estudo da fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea in vitro da benzofenona-3 a partir de nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos. Dissertação.* (Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, 2008.

PATRAVALE, V.B; MANDAWGADE, S.D. Novel cosmetic delivery systems: an application update. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 30, p. 19–33, 2008.

PATTANAARGSON, S.; MUNHAPOL, T.; HIRUNSUPACHOT, P.; LUANGTHONGARAM, P. Photoisomerization of octyl methoxycinnamate. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v 161, p. 269–274, 2004.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. *Introduction to spectroscopy*. 4thed. Thomson Learning: Washington, p.13, 2001.

PCAST. *President's Council of Advisors on Science and Technology*. The National Nanotechnology Initiative at 5 years. Washington, DC: President's Council of Advisors on Science and Technology, Executive Office of the President, 2005.

PERSSON, A.E.; EDSTRÖM, D.W.; BÄCKVALL, H.; LUNDEBERG, J.; PONTÉN, F.; ROS, A.M.; WILIAMS, C. The mutagenic effect of ultraviolet-A1 on human skin demonstrated by sequencing the p53 gene in single keratinocytes. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, v.18, p. 287-293, 2002.

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

PETERSEN, M.J.; HANSEN, C.; CRAIG, S. Ultraviolet A irradiation stimulates collagenase production in cultured human fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*, v. p. 440–444, 1992.

POHLMANN, A. R.; MEZZALIRA, G.; VENTURINI, C.G.; CRUZ, L.; BERNARDI, A.; JÄGER, E.; BATTASTINI, A.M.; DA SILVEIRA, N.P.; GUTERRES, S.S. Determining the simultaneous presence of drug nanocrystals in drug-loaded polymeric nanocapsule aqueous suspensions: A relation between light scattering and drug content. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 359, p. 288–293, 2008.

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

PRAUSNITZ, M.R.; ELIAS, P.M.; FRANZ, T.J.; SCHMUTH, M.; TSAI, J-C.; MENON, G.K.; HOLLERAN, W.M.; FEINGOLD, K.R. *Skin Barrier and Transdermal Drug Delivery*. In: J. BOLOGNIA, J. JORIZZO, J. SCHAFFER. *Dermatology*. 3ed: Elsevier Health Sciences, 2012.

PRUIM, B.; WRIGHT, L.; GREEN, A. Do people who apply sunscreens, re-apply them? *Australasian Journal of Dermatology*, v.40, p.79-82, 1999.

PUGLIA, C.; BONINA, F.; RIZZA, L.; BLASI, P; SCHOUBBEN, A. PERROTTA, R.; TARICO, M.S.; DAMIANI, E. Lipid Nanoparticles as Carrier for Octyl-Methoxycinnamate: In Vitro Percutaneous Absorption and Photostability Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.101, p. 301-311, 2012.

PUGLIA, C.; DAMIANI, E.; OFFERTA, A.; RIZZA, L.; TIRENDI, G.G.; TARICO, M.S.; CURRERI, S.; BONINA, F.; PERROTTA, R.E. Evaluation of nanostructured lipid carriers (NLC) and nanoemulsions as carriers for UV-filters: Characterization, in vitro penetration and photostability studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 51, p. 211-217, 2014.

RIBEIRO, C. In: __.Fotoproteção. *Cosmetologia aplicada à dermoestética*. 2ªed. Pharmabooks: São Paulo, p.100-129, 2010.

RODRÍGUEZ, R.A.; LAHOZ, I.R.; FAZA, O.N.; CID, M.M.; LOPEZ C.S. Theoretical and experimental exploration of the photochemistry of resveratrol: beyond the simple double bond isomerization. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v.10, p.9175-9182, 2012.

ROSEN, M.R (Ed.). *Delivery system handbook for personal care and cosmetic products*. William Andrew: New York, p.87, 2005.

ROTTIER, P. B.; VAN DER LEUN, J.C. Hyperaemia of the deeper cutaneous vessels after irradiation of human skin with large doses of ultra-violet and visible light. *British Journal of Dermatology*, v. 72, p. 256–260, 1960.

ROWE, A. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E (Ed). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6. ed. London: Pharmaceutical Press,p.532, 2009.

RUIZ. TINOSORB[®] S Bis- EthylhexyloxyphenoL Methoxyphenol Triazine (BEM T) Next Generation UV Filter for Sun Protection Information Package Submitted with Citizen's Petition, 2000. Disponível em <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dailys/00/Sep00/090600/cp00001_attachment_02.pdf>. Acesso em 13 de agosto de 2014.

SALVADOR, A.; CHISVERT, A. *Analysis of cosmetic products*. Elsevier: Amsterdam, p. 122-126, 2008.

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; FREITAS, L. de L.; GUTERRES, S.S.Characterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, v 21, p.99-102, 2002.

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; MEZZALIRA,G.; GUTERRES, S.S. Development of nanocapsule suspensions and nanocapsule spray-dried powders containing melatonin. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 17, n.3, p. 562-569, 2006.

SCHAFFAZICK, S. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Nanocapsules, nanoemulsion and nanodispersion containing melatonin: preparation, characterization and stability evaluation. *Die Pharmazie*, v.62, p. 354-360, 2007.

SCHARFFETTER, K.; WLASCHEK, M.; HOGG, A.; BOLSEN, K.; SCHOTHORST, A.; GOERZ, G.; KRIEG, T.; PLEWIG, G. UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo. *Archives of Dermatological Research*, v. 283, p. 506–511, 1991.

SCHIEKE, S.M.; STEGE, H.; KÜRTEEN, V.; GREETHER-BECK, S.; SIES, H.; KRUTMANN, J. Infrared-A Radiation-Induced Matrix Metalloproteinase 1 Expression is Mediated Through Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 Activation in Human Dermal Fibroblasts. *The Journal of Investigative Dermatology*, v.119, n.6, p.1323-1329, 2002.

SHAATH, N.A (Ed.). *Sunscreens. Regulations and Commercial Development*. 3^aed. Taylor and Francis: New York, p. 19-25, 30, 217-238, 324, 359-361, 2005.

SHAATH, N.A. Ultraviolet filters. *Photochemical and Photobiological sciences*, v.9, 464-469,2010.

SHAI, A.; MAIBACH, H.R.;BARAN, R (Ed.). *Handbook of cosmetic skin care*. Informa HealthCare: New York, p.4-13, 47-53, 2009.

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM NETO, P.J. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 30, p. 129-135,2009.

SIQUEIRA, N.M.; CONTRI, R.V.; PAESE, K.; BECK, R.C.R.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Innovative sunscreen formulation based on benzophenone-3-loaded chitosan-coated polymeric nanocapsules. *Skin Pharmacology and Physiology*, v. 24, p.166-174, 2011.

SOUZA, V.M.; JUNIOR, D.A. *Ativos dermatológicos. Dermocosméticos e Nutracêuticos*. São Paulo: Pharmabooks, 2013, p. 237, 241.

SWEETMAN, S.C (Ed). MARTINDALE *Complete drug reference*. 36^aed. Pharmaceutical Press: Grayslake, p.1608, 2009.

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

TAKIWAKI, H., SHIRAI,S.; KOHNO H.; SOH, H.; ARASE, S. The Degrees of UVB-Induced Erythema and Pigmentation Correlate Linearly and Are Reduced in a Parallel Manner by Topical Anti-Inflammatory Agents. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 103, p, 642–646, 1994.

TEWA-TAGNE, P.; BRIANÇON, S.; FESSI, H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: Development and characterization. *European journal of pharmaceutical sciences*, v.30, p. 124–135, 2007.

TREFFEL, P.; GABARD, B. Skin penetration and sun protection factor of ultra-violet filters from two vehicles. *Pharmaceutical Research*, v.13, p.770-774, 1996.

TSUTSUMI, M.; DENDA, M. Paradoxical effects of beta-estradiol on epidermal permeability barrier homeostasis. *British Journal of Dermatology*, v. 157, p. 776–779, 2007.

TURBISCAN LAB USER GUIDE. *Formulation*, França, 2005.

URBACH, F. Ultraviolet radiation and skin cancer of humans. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v.40, p.3-7,1997.

VARVARESOU, A. Percutaneous absorption of organic sunscreens. *Journal of cosmetic dermatology*, v. 5, p.53-57, 2006.

VENTURINI, C.G.; JÄGER, E.; OLIVEIRA, C.P.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A.M.O.; GUTERRES, S.S.; POHLMANNA, A.R. Formulation of lipid core nanocapsules. *Colloids an Surfaces A: Physicochemical and Engineeing Aspects*, v. 375, p.200-208, 2011.

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

VERMA, R.K.; SINGH, R. B.; BARABDE, U. V.; AMRAVATI, M. Controlled release lamotrigine formulations. *European Patent*. EP 2 564 836 A1, 2013.

VETTOR, M.; BOURGEOIS, S.; FESSI , H.; PELLETIER, J.; PERUGINI, P.; PAVANETTO, F.; BOLZINGER, M.A. Skin absorption studies of octyl-methoxycinnamate loaded poly(D,L-lactide) nanoparticles: Estimation of the UV filter distribution and release behaviour in skin layers. *Journal of Microencapsulation*, v.27, n.3, p.253-262, 2010.

WALTERS, K.A. *Dermatological and Transdermal Formulations*. Marcel Decker: Nova Iorque, p.100,106, 2002.

WEISS-ANGELI, V.; POLETTO, F.S.; ZANCAN, L.R.; BALDASSO, F.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Nanocapsules of Octyl Methoxycinnamate Containing Quercetin Delayed the Photodegradation of Both Components Under Ultraviolet A Radiation. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v..4, p. 1–10, 2008.

WEISS-ANGELI, V.; BOURGEOIS, S.; PELLETIER, J.; GUTERRES, S.S.; FESSI, H.; BOLZINGER, M.A. Development of an original method to study drug release from polymeric nanocapsules in the skin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 62, p. 35-45, 2010.

WISSING, S.A.; MÜLLER, R.H. The influence of the crystallinity of lipid nanoparticles on their occlusive properties. *International Journal of Pharmaceutics*, v.242, p.377-379,2002a.

WISSING, S.A; MÜLLER, R.H. The development of an improved carrier system for sunscreen formulation based on crystalline lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, v.24, p.373-375, 2002b.

YASUI, H.; SAKURAI, H. Age-dependent generation of reactive oxygen species in the skin of live hairless rats exposed to UVA light. *Experimental Dermatology*, v.12, p.655-661, 2003.

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

YOON, J. H.; LEE, C.S.; O'CONNOR, T.R.; YASUI, A.; PFEIFER, G.P. The DNA Damage Spectrum Produced by Simulated Sunlight. *Journal of Molecular Biology*, v.299, p.681-693, 2000.

ZIEGLER, A.; LEFFEL,DJ.; KUNALA, S.; SHARMA, H.W.; GAILANI, M.; SIMON, J.A.; HALPERIN, A.J.; BADEM, H.P.; SHAPIRO, P.E; BALE, A.E. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 90, p.41216-4220, 1993.

ANEXO I- Validação de metodologia analítica para quantificação do metoxicinamato de octila das formulações NC₀ e NC₁

Para doseamento das formulações, foi validado um método analítico utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV), partindo-se do método previamente validado por Jiménez e colaboradores (2004). Para tanto, utilizou-se uma fase móvel composta de acetonitrila:água (85:15), com fluxo de 1,0 mL/min, tempo de corrida de 10 minutos, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 310 nm. A coluna cromatográfica (C18) foi termostatizada à temperatura de 30°C.

Para a linearidade, foram construídas três curvas analíticas a partir de soluções mães com concentrações de exatamente 100 µg/mL. A partir de cada uma dessas soluções foram preparados os pontos da curva padrão nas concentrações de 1; 5; 10; 15 e 20 µg/mL. Três curvas analíticas foram construídas através do software Excel e obtidos os coeficientes de correlação linear, angular e coeficiente de correlação.

A análise estatística (ANOVA) do método demonstrou regressão linear significativa ($p < 0,05$), pois o valor de F calculado obtido foi maior que o F tabelado. O desvio da linearidade foi não significativo, pois o valor de F calculado foi menor que o F tabelado ($p > 0,05$) (Tabela 26).

Tabela 26. Análise de variância (ANOVA) da linearidade do método para quantificar o OMC a partir das nanocápsulas e nanocápsulas secas.

Fonte de Variação ¹	GL	SQ	Variância	F Calculado	F Tabelado
Entre	6	1,50966E+13	2,51611E+12	13,6200	3,48
Regressão linear	1	1,36074E+13	1,36074E+13	73,6581	4,96
Desvio de linearidade	5	1,49E+12	2,97856E+11	1,6123	3,71
Resíduo	14	2,58632E+12	1,84737E+11		
Total	20	1,7683E+13			

* significativo para $p < 0,05$

¹GL, graus de liberdade; SQ, soma dos quadrados

A curva analítica padrão foi obtida através da média dos coeficientes angulares e lineares de cada uma das retas. O coeficiente de correlação obtido foi de 0,99, o que está de acordo com o recomendado pela ANVISA (BRASIL, 2003) e ICH (Harmonised

Tripartite Guideline, 2005). O método obteve limite de detecção de 0,084 µg/mL e limite de quantificação de 0,282 µg/mL.

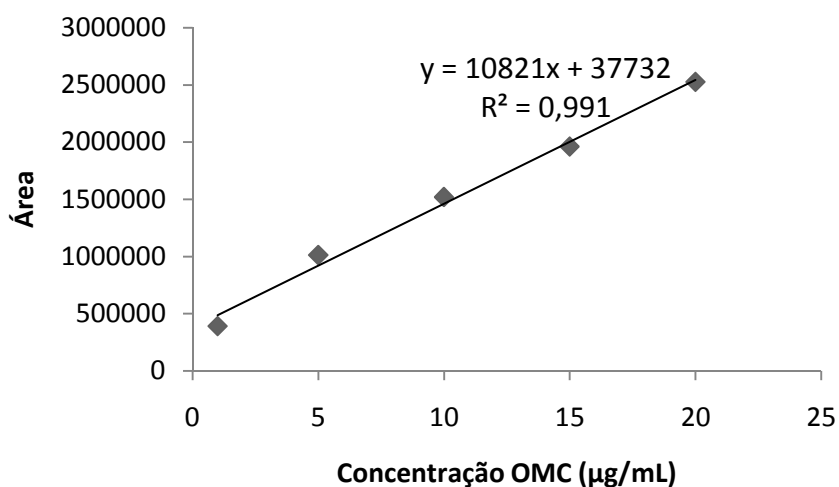


Figura 55. Curva analítica padrão, preparada em triplicata, para quantificação do OMC a partir de nanocápsulas e nanocápsulas secas.

A especificidade do método consiste em verificar se o método é específico para analisar a substância de interesse. Tanto para a suspensão de nanocápsulas contendo triglicerídeos de cadeia média quanto para a suspensão de nanocápsulas contendo metoxicinamato de octila, foi retirada uma alíquota de 30 µL ou 50 µL da formulação e diluída em 10 mL de acetonitrila. Conforme observado na Figura 56, há especificidade do método.

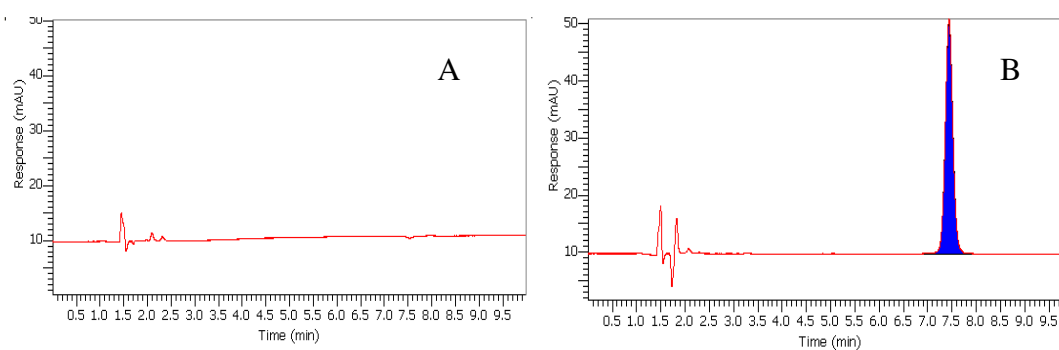


Figura 56. Cromatogramas de CLAE em coluna C18 (5µ) 4,6 mm x 150 mm, fase móvel acetonitrila: água (85:15) da suspensão de nanocápsulas contendo triglicerídeos de cadeia média (A) e suspensão de nanocápsulas contendo metoxicinamato de octila em concentração (B).

A precisão consiste em determinar a proximidade dos resultados obtidos após amostragens da mesma amostra. Esta análise foi realizada em dois dias diferentes, obtendo-se coeficientes de variação inferiores as 5% (ANVISA, 2003), indicando a precisão da extração do OMC das formulações (Tabelas 27, 28, 29 e 30). Para a quantificação dos filtros solares provenientes das nanocápsulas e nanocápsulas secas, foi retirada uma alíquota de cada formulação, a qual foi diluída em 10 mL acetonitrila. Para $NC_{0\ 4,8}$ e $NC_{0\ 1,0}$ foi retirado uma alíquota de 50 μ L (concentração de 5 μ g/mL) e para NC_1 foi retirada uma alíquota de 30 μ L (concentração de 3 μ g/mL). Para as nanocápsulas secas foi pesada uma quantidade de 10 mg de pó (concentração de 7,89 μ g/mL para $NC_{0\ s}$ e 7,24 μ g/mL para $NC_{1\ s}$).

Tabela 27. Precisão inter-dia, intra-dia (CV) e recuperação do OMC das suspensões de nanocápsulas e recuperação das suspensões de nanocápsulas contendo 1mg/mL ($NC_{0\ 1,0}$).

Precisão	CV (%)	Recuperação (%)
Intra-dia	0,47	103,03±0,66
Intra-dia	1,34	98,57±1,79
Inter-dia	0,46	100,06±2,70

Tabela 28. Precisão inter-dia, intra-dia (CV) e recuperação do OMC das suspensões de nanocápsulas contendo 4,8 mg/mL ($NC_{0\ 4,8}$).

Precisão	CV (%)	Recuperação (%)
Intra-dia	1,86	107,99±2,66
Intra-dia	0,27	108,23±0,39
Inter-dia	1,48	108,07± 2,12

Tabela 29. Precisão inter-dia, intra-dia (CV) e recuperação do OMC das nanocápsulas secas ($NC_{0\ s}$ e $NC_{1\ s}$).

Precisão	CV (%)	Recuperação (%)
Intra-dia	1,14	94,82±1,59
Intra-dia	1,72	94,46± 2,38
Inter-dia	1,48	94,58± 2,05

Tabela 30. Precisão inter-dia, intra-dia (CV) e recuperação do OMC das suspensões de nanocápsulas contendo 1mg/mL (NC₁).

Precisão	CV (%)	Recuperação (%)
Intra-dia	2,05	105,53±2,36
Intra-dia	2,39	107,96±2,31
Inter-dia	2,59	107,78±2,78

A análise da exatidão consiste na avaliação da proximidade dos resultados experimentais obtidos com o valor verdadeiro. Uma vez que o método mostrou-se específico e preciso, inferiu-se a exatidão (ICH, 2005).

ANEXO II- Validação de método para estudo de penetração cutânea do OMC a partir dos géis g OMC, g NC0, g NC1, g NC0s, g NC1s e g OMCs.

Para o estudo de penetração cutânea, três novas curvas analíticas foram construídas, a partir de soluções mães com 100 µg/mL de OMC cada. A partir de cada uma dessas soluções foram preparados pontos de curva com concentrações de 0,1; 0,25; 0,75; 1 e 3 µg/mL. As condições cromatográficas foram: fase móvel acetonitrila: água (85:15), fluxo de 1,0 mL/min, tempo de corrida de 10 minutos, volume de injeção de 100 µL e análise em comprimento de onda de 310 nm. A coluna cromatográfica também foi termostatzada à temperatura de 30°C.

O método apresentou limite de detecção de 0,088 µg/mL e limite de quantificação de 0,18 µg/mL. A análise de variância (ANOVA) mostrou que há regressão linear significativa ($p < 0,05$) e desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$) (Tabela 31). A especificidade do método também foi realizada (Figuras 60 e 61), mostrando que não há interferência da pele ou fita adesiva, na eluição do OMC.

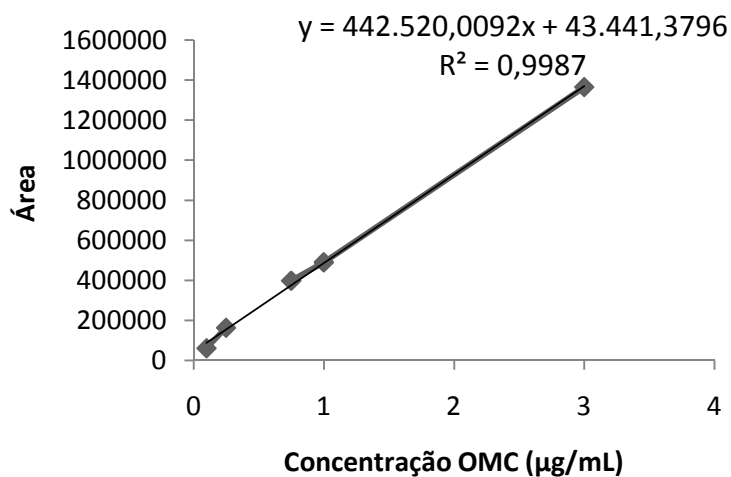


Figura 57. Curva analítica, preparada em triplicata, para quantificação do OMC nas camadas da pele.

Tabela 31. Análise de variância (ANOVA) da linearidade do método analítico para quantificar o OMC nas camadas da pele.

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	SQ	VARIÂNCIA	F calculado	F tabelado
Entre	6	4,24511E+12	7,07518E+11	2,3320	3,48
Regressão linear	1	4,23469E+12	4,23469E+12	13,9576	4,96
Desvio de linearidade	5	10415452541	2083090508	0,0069	3,71
Resíduo	14	4,24756E+12	3,03397E+11		
Total	20	2451794845			

* significativo para $p < 0,05$

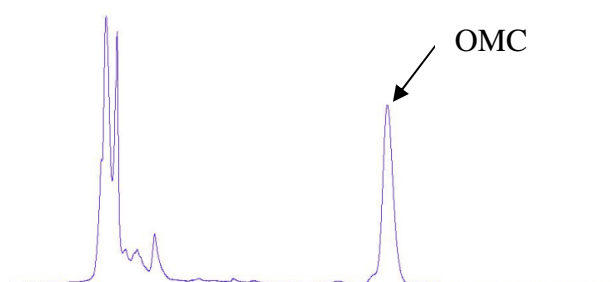


Figura 58. Cromatograma de CLAE em coluna C18 (5 μ) 150 mm x 4,6 mm, fase móvel acetonitrila: água (85:15), mostrando a eluição de OMC na presença de fita adesiva Scott®.

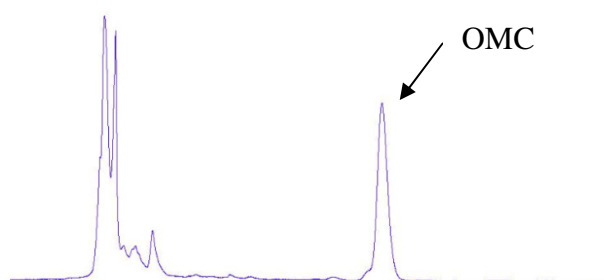


Figura 59. Cromatograma obtido por CLAE em coluna C18 (5 μ) 150 mm x 4,6 mm, fase móvel acetonitrila: água (85:15), mostrando a eluição de OMC na presença de pele suína.

A exatidão da extração do ativo na pele e nas fitas (Scott[®]) foi realizada para três concentrações diferentes de OMC: 0,1 µg/mL; 0,75 µg/mL e 1 µg/mL, obtidas a partir de solução-mãe. A extração nas fitas foi realizada em triplicata e a extração na pele em sextuplicatas (Tabelas 32, 33 e 34).

Tabela 32. Exatidão da extração do OMC da pele suína e fita adesiva Scott[®] na concentração de 0,1µg/mL.

Extração	Recuperação	CV
Pele suína	94,86%	2,91%
Fita Adesiva Scott [®]	91,41%	1,98%

Tabela 33. Exatidão da extração do OMC da pele suína e fita adesiva Scott[®] na concentração de 0,75 µg/mL.

Extração	Recuperação	CV
Pele suína	112,91%	5,49%
Fita Adesiva Scott [®]	111,98%	1,12%

Tabela 34. Exatidão da extração do OMC da pele suína e fita adesiva Scott[®] na concentração de 1 µg/mL.

Extração	Recuperação	CV
Pele suína	98,49%	4,5%
Fita Adesiva Scott [®]	112,23%	1,24%

O meio receptor utilizado foi constituído de 4% polissorbato 80 em água. A concentração de saturação do metoxicinamato de octila obtida foi de 202,03 mg/mL. Curvas analíticas no meio receptor também foram preparadas, a partir de soluções-mãe de 100 µg/mL. A partir de cada uma dessas soluções foram obtidas concentrações de 0,1; 0,5; 0,75; 1 e 3 µg/mL do OMC no meio receptor. As condições cromatográficas

utilizadas foram as mesmas que as descritas anteriormente. O método obteve limite de detecção de 0,02 µg/mL e limite de quantificação de 0,08 µg/mL.

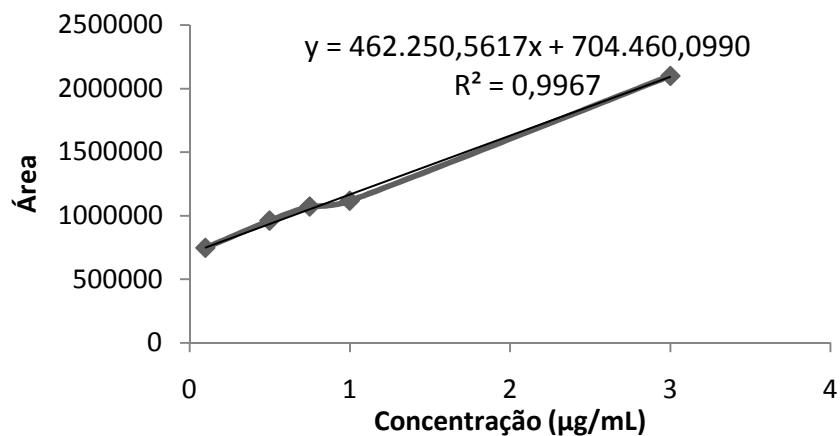


Figura 60. Curva analítica do OMC, preparada em triplicata, no meio receptor.

Este método mostrou regressão linear significativa ($p < 0,05$) e desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$) (Tabela 35).

Tabela 35. Análise de variância (ANOVA) da linearidade do método para quantificação do OMC no meio receptor.

FONTE DE VARIAÇÃO	gl	SQ	VARIÂNCIA	F calculado	F tabelado
Entre	6	6.11061E+12	1.01843E+12	3.8205	3.48
Regressão linear	1	3.89168E+12	3.89168E+12	14.5989	4.96
Desvio de linearidade	5	2.22E+12	4.43785E+11	1.6648	3.71
Resíduo	14	3.73204E+12	2.66574E+11		
Total	20	9.84265E+12			

* significativo para $p < 0,05$

¹gl, graus de liberdade; SQ, soma dos quadrados

ANEXO III- Validação de metodologia analítica para quantificação dos filtros metoxicinamato de octila, octiltriazona e bemotrizinol das formulações NC₂, NC₃ e NC₄.

Para doseamento dos filtros solares contidos nas formulações, foi validado um método analítico utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV), partindo-se do método previamente validado por Orsi e colaboradores (2006). Para tanto, utilizou-se uma fase móvel composta de acetonitrila: metanol (1:1), com fluxo de 1,0 mL/min, tempo de corrida de 28 minutos, volume de injeção de 100 µL e comprimento de onda de 310 nm. A coluna cromatográfica (C18) foi termostaticada à temperatura de 35°C.

Três curvas analíticas foram preparadas a partir de soluções mães com concentrações de 1000 µg/mL de metoxicinamato de octila, 1000 µg/mL de octiltriazona e 500 µg/mL de bemotrizinol. A partir de cada uma destas soluções foram preparados os pontos da curva padrão nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 e 10 µg/mL. Três curvas analíticas foram construídas através do software Excel (Figuras 61, 62 e 63) e obtidos os coeficientes de correlação linear, angular e coeficiente de correlação.

A análise estatística (ANOVA) do método demonstrou regressão linear significativa ($p < 0,05$) para todos os filtros solares, pois o valor de F calculado obtido foi maior que o F tabelado. O desvio da linearidade foi não significativo, pois o valor de F calculado foi menor que o F tabelado ($p > 0,05$) (Tabelas 36, 37 e 38). Os limites de quantificação e detecção obtidos para o OMC foram de 0,04 µg/mL e 0,099 µg/mL respectivamente. Os limites de detecção e quantificação obtidos para o OCT foram de 0,056 µg/mL e 0,16 µg/mL respectivamente. Os limites de detecção e quantificação obtidos para o BMT foram de 0,05 µg/mL e 0,1 µg/mL respectivamente.

Tabela 36. Análise de variância (ANOVA) da linearidade do método para quantificação do OMC.

FONTE DE VARIAÇÃO	gl	SQ	VARIÂNCIA	F	
				calculado	tabelado
Entre	6	6.00244E+13	1.00041E+13	176.0116	3.48
Regressão linear	1	6.00235E+13	6.00235E+13	1056.0552	4.96
Desvio de linearidade	5	8.36E+08	167150438.6	0.0029	3.71
Resíduo	14	7.95725E+11	56837504300		
Total	20	6.08201E+13			

* significativo para $p < 0,05$

Tabela 37. Análise de variância (ANOVA) da linearidade do método para quantificação da OCT.

FONTE DE VARIAÇÃO	gl	SQ	VARIÂNCIA	F	
				calculado	tabelado
Entre	6	1.90203E+14	3.17004E+13	123.8133	3.48
Regressão linear	1	1.89726E+14	1.89726E+14	741.0180	4.96
Desvio de linearidade	5	4.77E+11	95349757226	0.3724	3.71
Resíduo	14	3.58448E+12	2.56034E+11		
Total	20	1.93787E+14			

* significativo para $p < 0,05$

Tabela 38. Análise de variância (ANOVA) da linearidade do método para quantificação do BMT.

FONTE DE VARIAÇÃO	gl	SQ	VARIÂNCIA	F	
				F calculado	tabelado
Entre	6	1.49701E+13	2.49502E+12	163.1909	3.48
Regressão linear	1	1.49284E+13	1.49284E+13	976.4178	4.96
Desvio de linearidade	5	4.17E+10	8340624752	0.5455	3.71
Resíduo	14	2.14046E+11	15288989016		
Total	20	1.51842E+13			

* significativo para $p < 0,05$

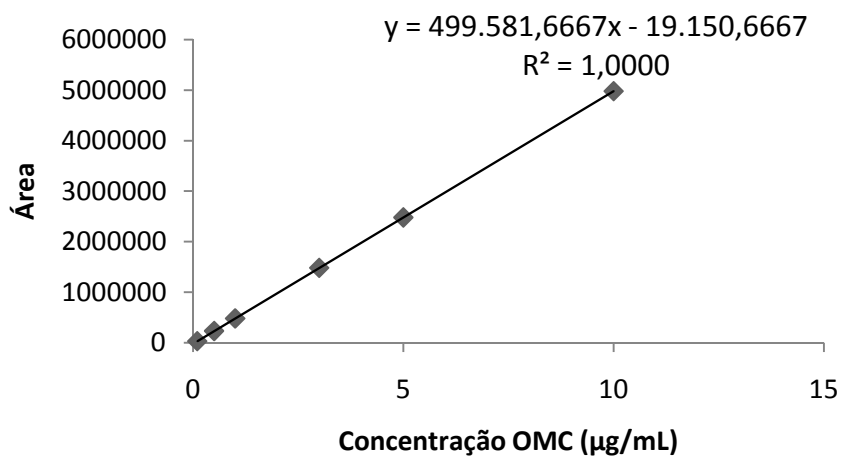


Figura 61. Curva analítica, preparada em triplicata, para quantificação do OMC das formulações NC₂, NC₃ e NC₄.

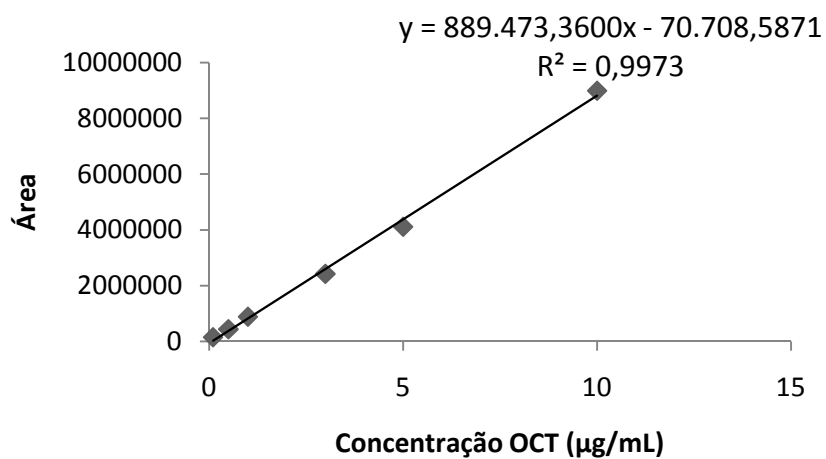


Figura 62. Curva analítica, preparada em triplicata para quantificação da OCT das formulações NC₂, NC₃ e NC₄.

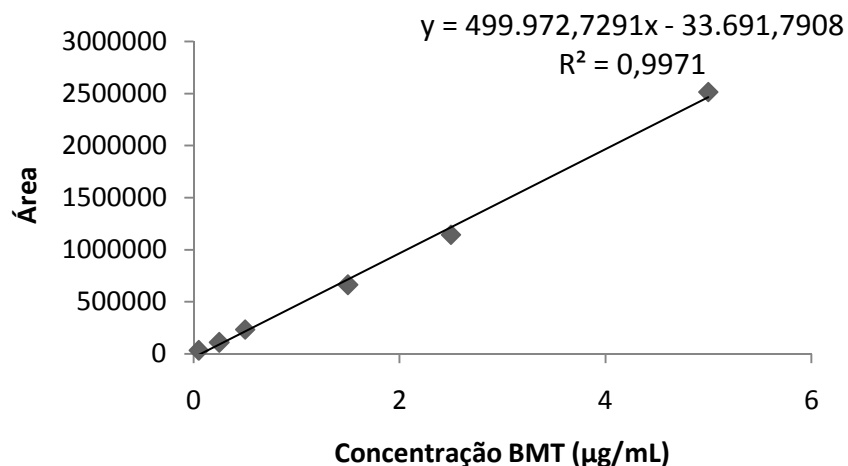


Figura 63. Curva analítica, preparada em triplicata, para quantificação do BMT das formulações NC₂, NC₃ e NC₄.

A Figura 64 demonstra a eluição dos filtros solares OMC, OCT e BMT a partir da suspensão de nanocápsulas NC₄ (concentração de 1mg/mL para cada filtro solar). Para isto, 30 µL da suspensão de nanocápsulas, foi diluída em 10 mL de acetonitrila.

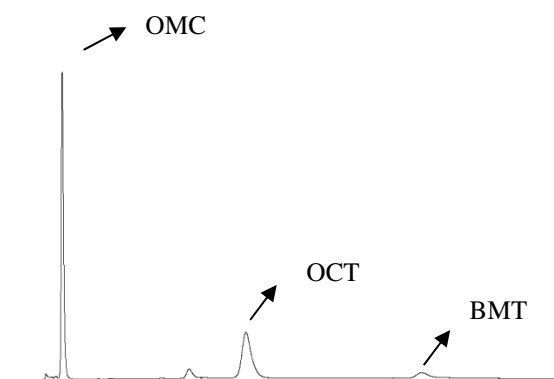


Figura 64. Cromatogramas de CLAE em coluna C18 (5µ) 4,6 mm x 150 mm, fase móvel acetonitrila: metanol (1:1) da suspensão de nanocápsulas NC₄ contendo metoxicinamato de octila, octiltriazona e bemotrizinol.

A precisão foi realizada para amostra NC₄, em dois dias diferentes. As Tabelas 39, 40 e 41 mostram que o coeficiente de variação obtido foi menor que 5%, indicando a precisão da extração dos filtros solares das formulações.

Tabela 39. Precisão inter-dia, intra-dia (CV) e recuperação do OMC das suspensões de nanocápsulas NC₄.

Precisão	CV (%)	Recuperação (%)
Intra-dia	1,76	103,03±0,66
Intra-dia	1,26	98,57±1,79
Inter-dia	2,19	100,06±2,70

Tabela 40. Precisão inter-dia, intra-dia (CV) e recuperação da OCT das suspensões de nanocápsulas NC₄.

Precisão	CV (%)	Recuperação (%)
Intra-dia	1,70	89,79±1,67
Intra-dia	1,37	90,64±1,24
Inter-dia	1,63	90,02±1,47

Tabela 41. Precisão inter-dia, intra-dia (CV) e recuperação do BMT das suspensões de nanocápsulas NC₄.

Precisão	CV (%)	Recuperação (%)
Intra-dia	1,72	97,42±1,83
Intra-dia	1,77	98,19 ±1,74
Inter-dia	1,78	97,73±1,74

ANEXO IV- Validação de método para estudo de penetração cutânea do metoxicinamato de octila, octiltriazona e bemotrizinol das formulações g OMC-OCT-BMT e g NC4.

Para o estudo de penetração cutânea, foi utilizado o mesmo método analítico descrito no anexo III.

As Figuras 65 e 66 demonstram a ausência da interferência da pele suína ou fita adesiva na eluição dos filtros solares.

A exatidão da extração dos filtros solares na presença das fitas adesivas (Scott®) e na pele foi realizada, em três concentrações diferentes, a partir de solução-mãe. Para o OMC e OCT, a exatidão foi avaliada nas concentrações de 1 µg/mL; 3 µg/mL e 5 µg/mL. Para o BMT, a exatidão foi avaliada nas concentrações 0,5 µg/mL; 1,5 µg/mL e 2,5 µg/mL. A extração nas fitas foi realizada em triplicata e a extração na pele em sextuplicatas (Tabelas 42, 43, 44, 45, 46 e 47). A exatidão da extração nas fitas adesivas ficou abaixo de 5%, estando de acordo com o estabelecido pela ANVISA. A exatidão da extração na pele obteve valores de coeficiente de variação maiores. No entanto, todos os valores obtidos estão abaixo de 15%, recomendado pela ANVISA para amostras biológicas.

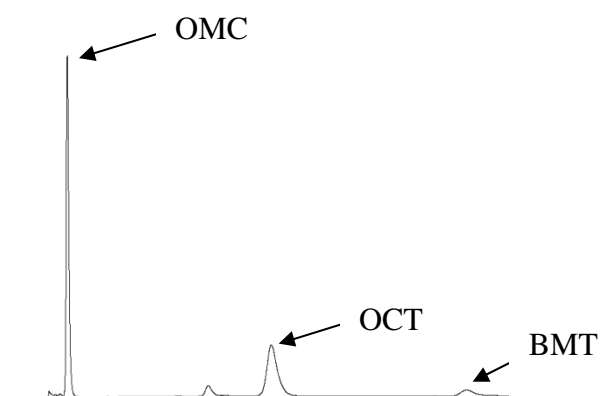


Figura 65. Cromatograma de CLAE em coluna C18 (5µ) 150 mm x 4,6 mm, fase móvel acetonitrila:metanol (85:15), mostrando a eluição dos filtros solares na presença de fita adesiva Scott®.

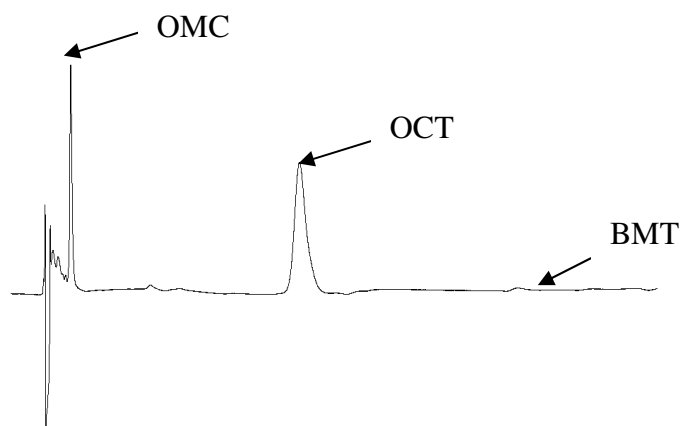


Figura 66 Cromatograma de CLAE em coluna C18 (5 μ) 150 mm x 4,6 mm, fase móvel acetoneitrila:metanol (85:15), mostrando a eluição dos filtros solares na presença de pele suína..

Tabela 42. Exatidão da extração do OMC e OCT da pele suína e fita adesiva Scott[®] na concentração de 1 μ g/mL (CV) e recuperação (média \pm dp).

Extração	Recuperação (%)	CV (%)
Fita adesiva + OMC	104,39 \pm 1,20	1,15
Fita adesiva+ OCT	106,14 \pm 3,51	3,31
Pele suína + OMC	104,03 \pm 5,98	5,74
Pele suína+ OCT	102,74 \pm 15,28	4,87

Tabela 43. Exatidão da extração do BMT da pele suína e fita adesiva Scott[®] na concentração de 0,5 μ g/mL (CV) e recuperação (média \pm dp).

Extração	Recuperação (%)	CV (%)
Fita adesiva + BMT	97,62 \pm 2,63	2,70
Pele suína+ BMT	97,67 \pm 14,21	4,55

Tabela 44. Exatidão da extração do OMC e OCT da pele suína e fita adesiva Scott® na concentração de 3 µg/mL (CV) e recuperação (média±dp).

Extração	Recuperação (%)	CV (%)
Fita adesiva + OMC	96,97 ± 1,85	1,91
Fita adesiva+ OCT	93,09 ± 2,28	2,45
Pele suína + OMC	108,12 ± 2,83	2,62
Pele suína+ OCT	101,39 ± 6,90	6,81

Tabela 45. Exatidão da extração do BMT da pele suína e fita adesiva Scott® na concentração de 1,5 µg/mL (CV) e recuperação (média±dp).

Extração	Recuperação (%)	CV (%)
Fita adesiva + BMT	97,81 ± 2,27	2,34
Pele suína+ BMT	98,75 ± 9,34	9,46

Tabela 46. Exatidão da extração do OMC e OCT da pele suína e fita adesiva Scott® na concentração de 5 µg/mL (CV) e recuperação (média±dp).

Extração	Recuperação (%)	CV (%)
Fita adesiva + OMC	94,97 ± 0,10	0,11
Fita adesiva+ OCT	94,63 ± 0,39	0,41
Pele suína + OMC	84,78 ± 4,15	4,89
Pele suína+ OCT	92,34 ± 5,45	5,90

Tabela 47. Exatidão da extração do BMT da pele suína e fita adesiva Scott® na concentração de 2,5 µg/mL (CV) e recuperação (média±dp).

Extração	Recuperação (%)	CV (%)
Fita adesiva + BMT	109, 51 ± 1,72	1,57
Pele suína+ BMT	97,49± 8,41	8,63

Curvas analíticas para o meio receptor também foram realizadas, a partir de soluções-mãe contendo 1000 µg/mL (do OMC e OCT) e 500 µg/mL (do BMT). Inicialmente, foi determinado o meio receptor mais adequados para os filtros solares, o qual foi constituído de 4 % polissorbato 80 em água. A concentração de saturação do metoxicinamato de octila obtida foi de 202,03 mg/mL, 100,24 mg/mL da octiltriazone e 80,02 mg/mL do bemotrizinol . As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas que as descritas anteriormente no anexo III. As Figuras 67, 68 e 69 mostram as curvas analíticas médias dos filtros solares OMC, OCT e BMT no meio receptor. Para o OMC obteve-se limite de detecção de 0,08 µg/mL e limite de quantificação de 0,12 µg/mL. Para a OCT obteve-se limite de detecção de 0,01 µg/mL e limite de quantificação de 0,13 µg/mL. Para o BMT obteve-se limite de detecção de 0,16 µg/mL e limite de quantificação de 0,22 µg/mL.

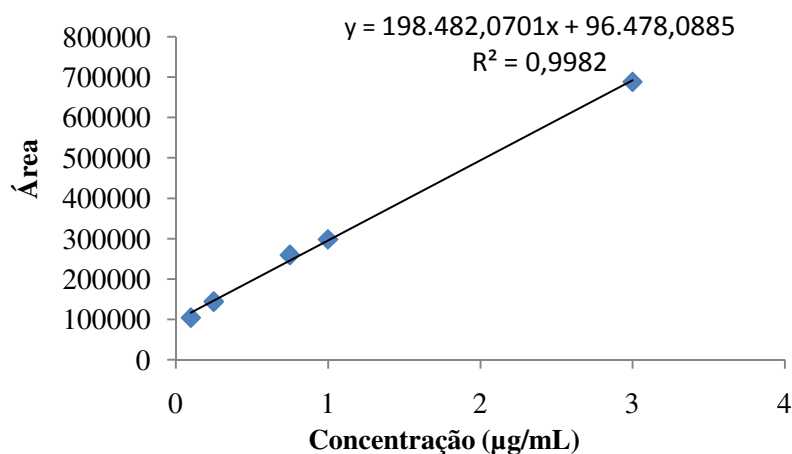


Figura 67. Curva analítica do OMC, preparada em triplicata, no meio receptor.

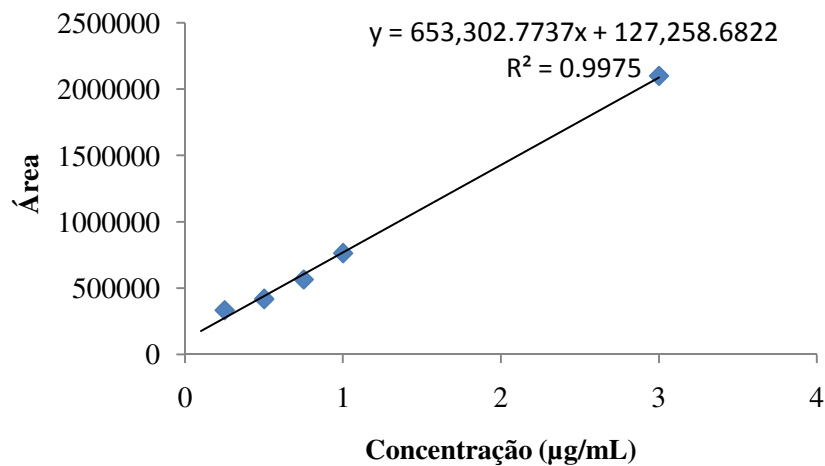


Figura 68. Curva analítica média do OCT, preparada em triplicata, no meio receptor.

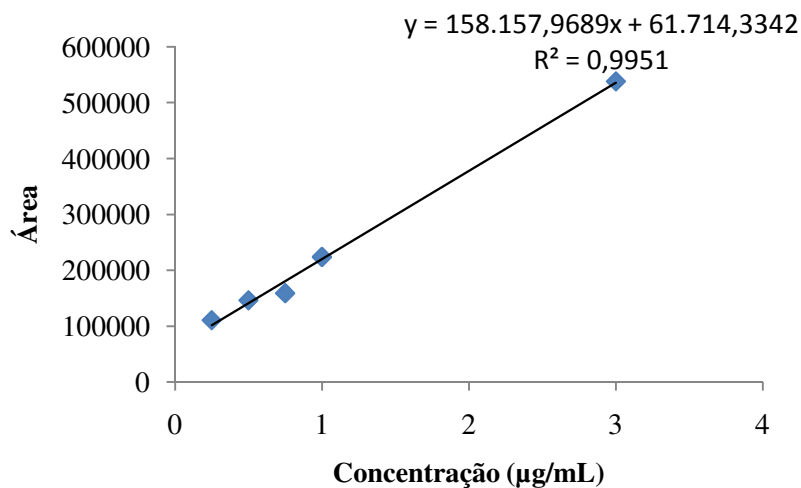


Figura 69. Curva analítica média do BMT, preparada em triplicata, no meio receptor.

As Tabelas 48, 49 e 50 mostram os resultados de análise de variância do método analítico para quantificação de cada um dos filtros solares no meio receptor. Para todos obteve-se regressão linear significativa ($p < 0,05$) e desvio da linearidade não significativa ($p < 0,05$).

Tabela 48. Análise de variância (ANOVA) da linearidade do método para quantificação do OMC no meio receptor em fase móvel contendo acetonitrila: metanol (1:1).

FONTE DE VARIACÃO	gl	SQ	VARIÂNCIA	F calculado	F tabelado
Entre	6	1.02621E+12	1.71035E+11	2.2752	3.48
Regressão linear	1	9.93746E+11	9.93746E+11	13.2196	4.96
Desvio de linearidade	5	32466002677	6493200535	0.0864	3.71
Resíduo	14	1.05241E+12	75172113500		
Total	20	26197765067			

* significativo para $p < 0,05$

Tabela 49. Análise de variância (ANOVA) da linearidade do método para quantificação do OCT no meio receptor em fase móvel contendo acetonitrila: metanol (1:1).

FONTE DE VARIACÃO	gl	SQ	VARIÂNCIA	F calculado	F tabelado
Entre	6	1.01183E+13	1.68638E+12	2.2043	3.48
Regressão linear	1	1.01004E+13	1.01004E+13	13.2021	4.96
Desvio de linearidade	5	17870421635	3574084327	0.0047	3.71
Resíduo	14	1.07108E+13	7.65057E+11		
Total	20	5.92532E+11			

* significativo para $p < 0,05$

Tabela 50. Análise de variância (ANOVA) da linearidade do método para quantificação do BMT no meio receptor em fase móvel contendo acetonitrila: metanol (1:1).

FONTE DE VARIACÃO	gl	SQ	VARIÂNCIA	F calculado	F tabelado
Entre	6	2.98963E+11	49827166957	1.1915	3.48
Regressão linear	1	2.92943E+11	2.92943E+11	7.0052	4.96
Desvio de linearidade	5	6019515070	1203903014	0.0288	3.71
Resíduo	14	5.85451E+11	41817958190		
Total	20	2.86488E+11			

* significativo para $p < 0,05$

ANEXO V- Relatório de patente

Relatório de Invenção

Título Proposto para a Invenção

Composição nanotecnológica e seu uso na prevenção da perda de coloração capilar após processo de tingimento.

Resumo:

Esta invenção apresenta como vantagem o emprego de sistemas nanocarreadores como agentes fixadores de coloração capilar. Para demonstrar esse potencial foi utilizada como exemplo uma tintura capilar temporária, a qual apresenta um poder de fixação inferior às tinturas permanentes, porém com menos risco de desenvolvimento de alergias e demais afecções cutâneas para o usuário. A aplicação da composição nanotecnológica imediatamente após o tingimento propiciou um tempo de coloração mais duradouro em relação à aplicação de uma composição não-nanotecnológica, o que se reflete em uma menor frequência de reaplicações da tintura.

Inventores

Silvia Stanisquaski Guterres
Adriana Raffin Pohlmann
Ruy Carlos Ruver Beck
Denise Soledade Jornada
Júlia Scherer Santos

Palavras-chave relacionadas ao invento

- | | |
|----|--------------------------|
| 1. | Tintura temporária |
| 2. | Nanocápsulas |
| 3. | Metoxicinamato de octila |
| 4. | Colorimetria |

Palavras-chave em Inglês

1.	Temporary dye
2.	Nanocapsules
3.	Ethylhexyl methoxycinnamate
4.	Colorimetry

Descrição DETALHADA do invento

As tinturas capilares são cosméticos muito utilizados com objetivos estéticos. Podem ser utilizadas com intuito de mascarar alterações fisiológicas, como cabelos grisalhos, ou simplesmente para seguir padrões de moda. As tinturas de cabelo são classificadas em permanentes (ou oxidativas), semi-permanentes e temporárias. As últimas não têm poder de penetração no córtex capilar, se depositando apenas na cutícula. Já, as tinturas permanentes e semi-permanentes tem maior poder de penetração devido ao seu tamanho de partícula diminuto (ROBBINS, 2012), sendo as permanentes as mais usadas (LEWIS et al., 2013). Contudo, o uso do intermediário para-fenildiamina (PPD) em tinturas oxidativas está relacionado ao desenvolvimento de reações alérgicas por parte dos consumidores (SOSTED et al., 2002; SOSTED et al., 2004; PATEL et al., 2007). Além disso, tinturas permanentes e semi-permanentes contém aminas aromáticas que estão relacionadas com o aparecimento de câncer de bexiga (KINLEN et al., 1977; HUNCHAREK, 2005), e também de mama (DOMINGUEZ et al., 2003). Dessa forma, muitos consumidores, em especial as gestantes, optam pelo uso de tinturas temporárias; mesmo que essas necessitem uma reaplicação mais frequente.

A avaliação da cor, determinada através da colorimetria, permite quantificar através de modelos matemáticos a percepção de cor pelo homem. Através de método espectrofotométrico de refletância, a luz refletida é captada por matrizes duplas de fotodiodos de silício de 40 elementos e expressa através de valores numéricos. Os valores determinados estão de acordo com o modelo matemático proposto pela Commission Internationale de l'Eclairage (CIELAB or CIE L*a*b*). No sistema

CIELAB, a cor é determinada em três eixos: a^* , L^* e b^* , os quais representam a mistura das cores primárias que formam as cores visíveis. As cores primárias são vermelho, verde e azul, e as demais cores surgem por sobreposição dessas. O eixo L^* mede a intensidade de cor em uma escala de branco ($L=100$) a preto ($L=0$). O eixo a^* fornece valores se estendem do vermelho ao verde, sendo que valores positivos indicam uma predominância de vermelho e os negativos indicam uma predominância de verde. O eixo b^* fornece valores que se estendem da cor azul ao amarelo. Valores negativos indicam uma predominância de azul e positivos indicam uma predominância de amarelo (BERNS, 2000; OTHA; ROBERSON, 2005).

O filtro solar metoxicinamato de octila (OMC) pode ser aplicado em produtos de uso capilar para a prevenção do desbotamento ou perda de coloração provocado pela radiação ultravioleta, permitindo a manutenção da coloração, especialmente para cabelos descoloridos (ROBBINS, 2012) e tingidos artificialmente (LOCKE; JACHOWICZ, 2005). A nanoencapsulação desse filtro solar evita a sua fotodegradação, permitindo a obtenção de um produto fixador mais eficiente na absorção da radiação (HUONG et al., 2007) do que os produtos convencionais. Logo, a presente invenção descreve o desenvolvimento de nanocápsulas contendo OMC, demonstrando um aumento na estabilidade do OMC, bem como uma manutenção na coloração de cabelos tingidos, os mantendo coloridos por um tempo superior àquele que não recebeu nenhum tratamento ou um tratamento com o filtro solar na sua forma convencional, não nanoencapsulada.

METODOLOGIA

Matérias-primas, Equipamentos e Materiais

Água MiliQ (Milipore), Acetona, Eudragit S100[®] (Degussa), Metoxicinamato de octila (Deg), Monoestearato de sorbitano 60 (Sigma-Aldrich), Polissorbato 80 (Vetec), Triglicerídeos de ácido cáprico e caprílico (Cosmetrade), Evaporador rotatório (Buchi), Lâmpada UVB (Orion), Kit descolorante contendo persulfato de amônio e peróxido de hidrogênio (Blondor, Wella), mechas de cabelo, Tintura temporária vermelha (Sebastian Cellophanes[™]), Zetasizer Nano ZEN3600 (Malvern Instruments Limited).

Preparação das composições

Para fins de comparação e avaliação da eficácia da composição nanotecnológica, duas composições foram desenvolvidas: uma suspensão contendo OMC livre (L), sem aplicação da nanotecnologia, e uma suspensão aquosa de nanocápsulas contendo OMC (N). A composição L foi preparada mediante a pesagem de 0,1% (m/v) de OMC, seguida da sua dispersão em polissorbato 80 e adição em água (Tabela 51).

Tabela 51. Composição da suspensão de OMC não-nanotecnológica (L).

Matérias-primas	Quantidade
Metoxicinamato de octila	0,10%
Polissorbato 80	0,77%
Água	100 mL

A composição N foi preparada de acordo com as quantidades descritas na Tabela 52. A fase orgânica foi submetida à agitação e aquecimento à temperatura de 35 °C. Após a solubilização dos componentes, a fase orgânica foi injetada sobre a fase aquosa, e ambas foram mantidas sob agitação magnética por mais 10 minutos aproximadamente. A seguir, foi realizada a evaporação em evaporador rotatório até obtenção de volume final de 10 mL.

Tabela 52. Composição de suspensão de nanocápsulas (N).

Matérias-primas	Quantidade
Fase orgânica	
Eudragit S100 [®]	1,00%
Monoesterato de sorbitano 60	0,38%
Metoxicinamato de octila	0,10%
Triglicerídeos de ácido cáprico/caprílico	1,60%
Acetona	26 mL
Fase aquosa	
Polissorbato 80	0,77%
Água	50 mL

Determinação do tamanho de partícula da composição nanotecnológica

Logo após o preparo, foi analisado o tamanho de partícula da composição nanotecnológica através da técnica de espectroscopia de correlação de fótons (Zetasizer Nano ZEN3600). Para a análise, foi realizada diluição 1:500 (vv) da amostra em água MilliQ[®]. Foi determinado também o valor do índice de polidispersão (PDI), o qual indica a homogeneidade da composição.

Preparação das mechas de cabelo

As mechas de cabelo foram inicialmente submetidas a um processo de descoloração através do uso do kit descolorante até obtenção de mechas de tom louro. Em seguida, às mesmas aplicou-se a tintura temporária de cor vermelha, acondicionadas em papel alumínio e submetidas à calor seco por aproximadamente 40 minutos. A secagem das mechas foi então realizada com auxílio de secador de cabelos.

Imersão das mechas nas formulações

Após as mechas estarem completamente secas, foram imersas na suspensão de OMC (L) ou suspensão de nanocápsulas (N), por um período de 1 hora. A seguir foram novamente secas e então expostas à radiação UVB ($1,5 \cdot 10^{-4} \text{ W cm}^{-2}$) durante 15 horas. Para fins de controle (controle negativo, C), foi realizada a avaliação de uma mecha submetida à descoloração e tingimento, da mesma forma como nas demais mechas, porém sem nenhum tratamento posterior para fixação de coloração.

Avaliação das mechas após exposição à radiação

Inicialmente procedeu-se uma avaliação visual das mechas com intuito de verificar o grau de eficácia das diferentes formulações na manutenção da cor vermelha conferida pelo tingimento.

A seguir, foi determinado o grau de manutenção de cor através de medidas realizadas em espectrofotômetro (Minolta- 3600 d), sendo esta análise realizada pelo Instituto de Pesquisa Clínica e Integrada (IPCLin, São Paulo, Brasil). Inicialmente, foram determinadas medidas basais de cada uma das mechas, com 10 pontos de leitura ao longo da extensão de cada mecha. As mechas foram a seguir lavadas com xampu padrão de acordo com o seguinte protocolo: aplicação de 0,5 mL de xampu por grama de mecha de cabelo, massagem por 1 minuto e enxágüe em água por 1 minuto (vazão de 0,5 L/min). As mechas foram então secas em secador à quente até a secagem total. Esse procedimento foi repetido por cinco e quinze vezes, obtendo-se então mechas submetidas a cinco e quinze lavagens sucessivas, respectivamente. A medida da cor após essas lavagens foi então realizada através de dez repetições, após o resfriamento das mechas à temperatura ambiente por cinco minutos. Os resultados demonstraram a variação de cor a partir do sistema CIELAB. Os dados obtidos foram comparados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey, com índice de confiança de 95%.

RESULTADOS

Nesse trabalho foi avaliada a eficácia de uma composição nanotecnológica para evitar a perda de coloração artificial de mechas submetidas à descoloração seguida de tingimento com tintura temporária e sucessiva exposição à radiação ultravioleta e lavagens. A tintura temporária vermelha foi utilizada por ser aquela mais suscetível à perda de cor frente às lavagens e exposição à radiação ultravioleta. Para a avaliação foram realizadas lavagens sucessivas das mechas tingidas além de simulações de exposição à radiação solar (através de exposição à radiação de lâmpadas UV).

A análise da composição nanotecnológica através da técnica de espectroscopia de correlação de fótons (Tabela 53) demonstra a presença de nanopartículas. O baixo índice de polidispersão, abaixo de 0,3 (VERMA et al., 2003), indica a homogeneidade da distribuição de partículas e qualidade nanotecnológica.

Tabela 53. Tamanho de partícula e índice de polidispersão da composição nanotecnológica ($\pm dp$) obtidos por espectroscopia de correlação de fótons.

Tamanho de partícula	Índice de polidispersão
158,73 \pm 3,96	0,12 \pm 0,01

A Figura 70 apresenta os valores médios iniciais de a^* para todas as mechas, medida a qual representa a intensidade de cor vermelha. Esses valores foram obtidos após a descoloração, tingimento, exposição à radiação UV (por 15 horas), porém antes de serem executadas as lavagens com xampu. As mechas controle negativo (C) e a mecha tratada com composição não-nanotecnológica (L), demonstraram menor capacidade de proteção à perda de cor ($p < 0,05$). O controle negativo, conforme esperado, por não ser submetido a nenhum tratamento posterior à coloração, não possibilitou a manutenção da cor após a exposição à radiação. Esse resultado demonstra que a exposição à radiação ultravioleta de mechas descoloridas e posteriormente tingidas com coloração vermelha provoca perda de cor. Por sua vez, na mecha tratada com composição não-nanotecnológica (L), o filtro solar está na forma não-

nanoencapsulada, ficando suscetível à fotodegradação rápida e conseqüentemente conferindo baixo tempo de proteção, o que culmina em reduzida efetividade de absorção da radiação ultravioleta (PATTANAARGSON et al., 2004). Como conseqüência, sua capacidade de evitar a perda de cor fica reduzida. Por outro lado, a mecha tratada com a composição nanotecnológica (N) mostrou-se com coloração mais intensa após as 15 horas de exposição à radiação, demonstrando efetividade na manutenção da cor vermelha por parte da combinação da nanotecnologia com o filtro solar. Esse resultado pode ser explicado pela melhor estabilização do filtro solar nas nanocápsulas (PERUGINI et al., 2004; WEISS-ANGELI et 2008), o qual prolonga a ação do mesmo, além da propriedade de formação de filme conferida por essas (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2001), o que resulta em uma distribuição mais homogênea do filtro ao longo dos fios.

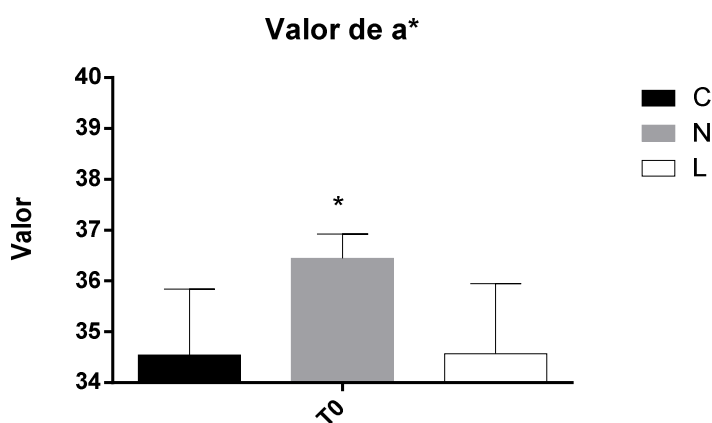


Figura 70. Valores médios de a* inicial (T0) para as mechas controle negativo (C), mecha tratada com composição nanotecnológica (N) e mecha tratada com composição não-nanotecnológica (L). $p < 0,05$.

Assim, o resultado aponta para uma maior eficácia das nanocápsulas em evitar a perda de coloração após descoloração e tingimento seguidos de exposição à radiação UV. Os resultados fotográficos obtidos após a realização desses procedimentos comprovam visualmente o melhor desempenho das nanocápsulas na proteção à perda de cor (Figura 71).



Figura 71. Fotografias das mechas descoloridas e tingidas após exposição à radiação UV. Mecha controle negativo (A), mecha tratada com suspensão do OMC não nanotecnológica (B), mecha tratada com nanocápsulas (C).

A Figura 72 apresenta os valores de a^* para as mechas após as 15 lavagens sucessivas com xampu. Da mesma forma como anteriormente observado na Figura 1, as mechas C (controle negativo) e L (composição não-nanotecnológica) não apresentaram diferenças entre si ($p > 0,05$), com comportamento inferior às nanocápsulas. A mecha tratada com a composição nanotecnológica (N) apresentou um melhor resultado. Esse dado pode novamente ser explicado pelas propriedades adesivas das nanocápsulas (ALVAREZ-ROMAN et al., 2001) e também pelo reduzido tamanho de partícula da composição nanotecnológica ($158,73 \pm 3,96$ nm). Enquanto a propriedade adesiva das nanocápsulas possibilita a cobertura eficiente (ALVAREZ-ROMÁN et al., 2001) do cabelo, o tamanho de partícula reduzido permite a penetração dessa composição na cutícula do cabelo (SAMPAIO; MAIA; GOMES, 2010), local onde também estão depositados os pigmentos da tintura (BOLDUC; SHAPIRO, 2001). Assim, as nanocápsulas podem atuar evitando o arraste dos pigmentos pela lavagem.

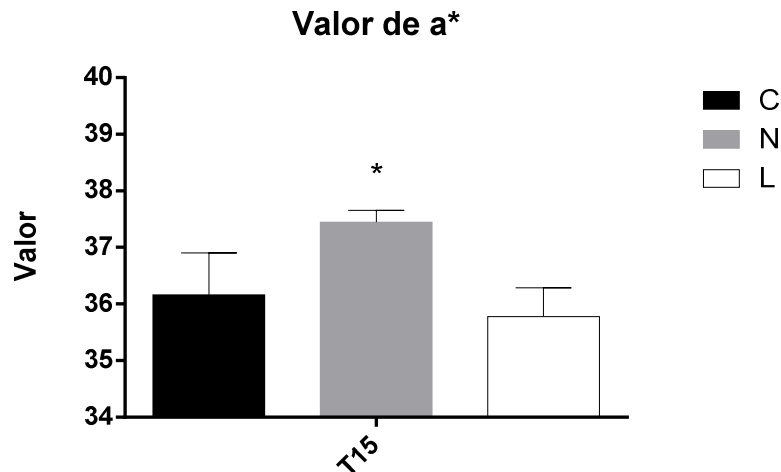


Figura 72. Valores médios de a* após 15 lavagens sucessivas das mechas controle negativo(C), mecha tratada com composição nanotecnológica (N) e mecha tratada com composição não-nanotecnológica (L). $p < 0,001$.

Os dados encontrados demonstram a eficácia do tratamento com nanocápsulas para a manutenção da cor, em relação ao controle negativo (nenhum tratamento) e a mecha tratada com a composição sem nanotecnologia (L). Esse tratamento mostrou-se eficaz em evitar a perda de cor após exposição à radiação e as lavagens sucessivas. A composição nanotecnológica, portanto, propicia manutenção de cor, sobretudo por período prolongado, possibilitando reaplicações menos frequentes da tintura.

De forma geral, qual é o principal PROBLEMA resolvido pelo invento?

Entre as práticas estéticas está a coloração capilar. Dependendo do tipo de coloração e do tipo de cabelo, a cor aplicada pode ter uma duração muito curta ou não. Outros fatores também podem influenciar a perda da coloração aplicada aos fios, como a exposição à radiação UV.

A descoloração capilar, por exemplo, consiste no processo de clareamento de cabelos através de agentes oxidantes, o que ocasiona um clareamento da cor natural dos cabelos. Esse processo é comumente utilizado para a aplicação de uma nova coloração aos cabelos, geralmente cores mais claras ou com tonalidades de vermelho. Contudo, cabelos descoloridos são mais frágeis e suscetíveis à radiação solar. Dessa forma, cabelos que são descoloridos e posteriormente recoloridos, quando expostos à radiação,

podem ter uma tendência maior à perda da sua nova coloração. Como resultado, a reaplicação da coloração artificial necessita ser mais frequente, tornando essa prática mais onerosa e mais agressiva para o couro cabeludo e cabelos. Sendo assim, no presente invento foi desenvolvida uma composição nanotecnológica contendo filtro solar capaz de aumentar a resistência da coloração artificial nos fios frente a uma exposição à radiação UV, bem como após sucessivas lavagens. O uso dessa composição possibilita reaplicações menos frequentes da tintura, com manutenção de cor por período prolongado.

Quais as principais VANTAGENS do invento?*

(Exemplo: Eficiência, Produtividade, Qualidade do produto, Redução de resíduos, etc)

Aumento na durabilidade de tinturas.

Qual a principal APLICAÇÃO da tecnologia? (uso presente e futuro da tecnologia)

Há outros possíveis usos, mais amplos que o verificado na presente invenção? Por favor, liste-os.

O metoxicinamato de octila é um filtro solar orgânico amplamente aplicado em fotoprotetores com intuito de absorver a radiação UVB. A sua aplicação em nanocápsulas tem sido descrita, sobretudo em formulações cosméticas destinadas à aplicação cutânea.

A exposição à radiação UV após descoloração e tingimento é um dos fatores relacionados com a perda de cor. Assim, a aplicação da composição nanotecnológica contendo metoxicinamato de octila pode auxiliar na manutenção de cor proporcionada pela tintura capilar.

Qual o DIFERENCIAL da tecnologia em relação ao existente?

Diante da descrição técnica detalhada do invento aponte a essência da invenção.

A composição de nanocápsulas contendo metoxicinamato de octila demonstrou resultado superior na manutenção de cor após 15 horas de exposição à radiação UVB somada a 15 lavagens, em relação à composição contendo o filtro solar, sem nanotecnologia aplicada.

Compare a tecnologia com patentes existentes

As patentes descrevem metodologias para reduzir perda de cor/desbotamento de mechas de cabelo tingidas.

CASTAING e demais inventores (1999) patentearam método de tratamento capilar contendo agente catiônico condicionante e podendo conter filtro solar. Após esse tratamento os autores propõem a lavagem capilar com um tensoativo aniônico, catiônico, não-iônico ou anfotérico. Ainda, os inventores sugerem um tratamento adicional, com um agente condicionante, que também contém filtro solar.

O trabalho de CANNELL & NGUYEN (2000) descreve uma composição capilar contendo proteína hidrolisada com abundância de aminoácidos aniônicos, especialmente sulfurados, agente divalente catiônico e vitaminas. O agente divalente catiônico se liga ao cabelo através da formação de pontes eletrostáticas facilitando a ligação da proteína, que atua protegendo contra os danos ambientais e químicos.

PWONG & MEMISHA (2004) desenvolveram uma composição contendo pelo menos um polidialquilsilicone, com pelo menos uma substituição alquila. Já, KING e colaboradores (2004), descrevem o emprego de um derivado halogenado associado a um antioxidante e um silicone polimérico, em cabelo já tingido.

Na patente de CHUN & CHUN (2006) foi demonstrado que uma composição contendo melanina solúvel, filtro solar Tinogard S[®], tensoativo catiônico, agente formador de filme e antioxidante, evitou a perda de cor de cabelos naturais e artificialmente tingidos após exposição à radiação ultravioleta.

Outro método descrito envolve a utilização de um xampu contendo tensoativo aniônico e catiônico, os quais em combinação formam cristais líquidos liotrópicos (BROWN & HUTCHINS, 2009). Já composição *leave-in* ou *rinse-off* contendo polímero de amônio quaternário modificado, polímero modificado associado a tensoativo catiônico, polímero contendo 2-dimetil(amino)etil metacrilamida (DMAEMA), dimetilaminopropil metacrilamida (DMAPMA), dietilaminoetil metacrilamida (DEAEMA) ou mistura desses polímeros, também já foi descrita (DONNA et al., 2009).

NGUYEN e outros inventores (2010) desenvolveram composição contendo pelo menos uma poliamina contendo dois grupos amino (polietilenamina, quitosana e

polivinilamina), silicone, polímero formador de filme e opcionalmente um tensoativo catiônico. Por outro lado, CARBALLADA e demais inventores (2010), propuseram a utilização de composição contendo pelo menos um monômero etilênico do grupo: sulfopropilacrilato, alquilacetamidoacrilato e misturas de ambos.

Além disso, também há uma patente que descreve a aplicação de pelo menos dois polímeros catiônicos e um silicone solúvel em água. O polímero se deposita na superfície das fibras capilares através de interação eletrostática, facilitando a adsorção dos silicones, que conferem maior maciez ao cabelo (GODDINGER et al., 2010). Essa composição é destinada a aplicação prévia ao tratamento oxidativo com descolorante, proporcionando maior estabilidade da cor.

Um material particulado hidrofóbico composto de oxido de etileno com superfície modificada associado a um silicone hidrofóbico formador de filme e um veículo cosmético foi proposto por LAMBERTY e colaboradores em 2013.

As patentes existentes aplicando nanopartículas a composições capilares envolvem nanopartículas de sericina (VELASQUEZ et al., 2012), um produto nanoscópico (SOANE; LINFORD, 2004) e um processo de obtenção de nanopartículas orgânicas (BROUNS et al., 2013).

No trabalho descrito por VELASQUEZ e demais inventores (2012), as nanopartículas de sericina, proteína produzida pelo bicho-da-seda, foram obtidas através de reticulação com goma guar quaternizada. Essa composição pode ser incorporadas a tinturas capilares, xampu, condicionador e creme *leave-in* ou *rinse-off*. A sua aplicação em tinturas, proporciona manutenção de cor e redução do volume capilar dos cabelos tingidos.

O produto nanoscópico é constituído de um agente ligado fisicamente a uma nanoestrutura polimérica. O agente inclui substâncias como fragrâncias, tinturas capilares, fármacos, pigmentos. Essas nanopartículas são formadas mediante contato do agente com polímeros, oligômeros ou monômeros que se organizam ao redor desse e se polimerizam. Em função da estrutura polimérica conter grupos funcionais reativos, possibilita a sua imobilização no cabelo, aumentando a retenção do agente na fibra capilar (SOANE; LINFORD, 2004).

O processo de obtenção de nanopartículas orgânicas envolve o preparo de uma solução contendo um poliéster e/ou resina de éster vinílico e um monômero

hidrofóbico; dispersão dessa solução em água para obtenção de uma emulsão e, o emprego de um inibidor solúvel em água para obtenção de uma dispersão de nanopartículas. O emprego desse processo também se estende à micropartículas orgânicas, mediante a secagem, coagulação ou floculação das nanopartículas previamente obtidas (BROUNS et al., 2013).

A composição a ser patenteada diferencia-se das demais por possibilitar o emprego de baixa concentração de filtro solar, evitando possíveis efeitos irritantes ocasionados pelo uso de concentrações mais altas desse. Além disso, as nanocápsulas desenvolvidas na presente invenção atuam como filtros solares físicos, proporcionando um efeito adicional na proteção contra a perda de cor provocada pela radiação. Adicionalmente, essa nova composição aumenta o tempo de permanência da cor inclusive de tintura temporária, a qual facilmente degrada ou é removida por lavagem e, por isso, tem sido pouco empregada, apesar das suas vantagens com relação à segurança e facilidade de aplicação.

Existe algum tipo de divulgação?

() Sim (X) Não

Se sim, QUANDO foi divulgado e qual o tipo da divulgação?*

Teses, dissertações, artigos, congressos, palestras, apresentações, livros, anais...

*Anexar cópia do documento que foi divulgado

Desvantagens e/ou Limitações Do Invento

Pelo fato da suspensão de nanocápsulas apresentar baixa viscosidade é necessário a sua veiculação prévia em um semissólido, como um creme/gel para possibilitar a sua aplicação capilar.

O emprego da nanotecnologia poderá acarretar a elevação do preço no produto em que estará contido.

Transferência de Tecnologia

COMENTE A POTENCIALIDADE DE COMERCIALIZAÇÃO DA PRESENTE INVENÇÃO. (Especifique áreas de aplicação e/ou produtos que imaginas que possam utilizar esta nova tecnologia)

A composição desenvolvida apresenta aplicação como um adjuvante na manutenção de cor após a aplicação da tintura capilar. Assim, a composição poderia ser associada a um creme de hidratação/tratamento a ser utilizado posteriormente à aplicação de tinturas capilares.

CITE MERCADOS OU EMPRESAS QUE PODERIAM TER INTERESSE EM CONHECER ESTA NOVA TECNOLOGIA (setores industriais / farmacêuticos / médicos / agronegócios)

Indústrias de bens de consumo: Indústria cosmética, têxtil, química.

REFERÊNCIAS

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

BERNS, R.S.; BILLMEYER AND SALTZMAN *Principles of color technology*. New York: John Wiley & Sons, 2000.

BOLDUC, C.; SHAPIRO, J. Hair care products: waving, straightening, conditioning, and coloring. *Clinics in dermatology*, v.19, p.431-436, 2001.

BROUNS, M.J.G.; FRIEDERICHS, J.P.; JANSEN, J.F.G.A.; DRIESSEN;M.M.M.Organic nano-particles and process for their preparation. United States Patent Application. US US 2013/0045393 A1. 23 out. 2012, 21 fev. 2013.

BROWN, M.A.; HUTCHINS, T.A. Method for preventing color loss in oxidatively dyed hair. World Intellectual Property Organization. WO 2009024938 A2, 20 ago.2008, 26 fev. 2009.

CANNEL, D.; NGUYEN, M. Composition for treating hair against chemical and photo damage. United States Patent. US 6013250, 16 mai.1997, 11 jan.2000.

CARBALLADA, J.A.; NIJAKOWSKI, T.R.; MURPHY, B.P.; HUYGHUES-DESPOINTES, A.M.J.A.; KABFLEISCH, A. *Method and composition for maintaining hair dye color*. World Intellectual Property Organization. WO 2010014763 A2. 30 jul. 2010, 4 fev. 2010.

CASTAING, B.; DIAS, L.C.; HUGHES, B.G.; LANGSCH, D.H.J.; MACGILP, N.A.; MONICH, M.S.; SAMI, M.C.H.K. *Cosmetic method for treating coloured hair to reduce colour fade*. World Intellectual Property Organization. WO 1999055295 A1, 7 ago.1998, 4 nov. 1999.

CHUN, H.M.; CHU, M. *Composition and method for protecting both natural and artificial hair color from ultraviolet light damage*. United States Patent. US 7074396 B2, 22 out. 2003,11 jul. 2006.

DONNA, L.N.; FOLTIS, L.C.; MOORE, D.J.; RAYMOND, R.; YAN, Z. Method of protecting dyed hair color from fading or wash-out. World Intellectual Property Organization. WO 2009085838 A1, 17 dez. 2008, 9 jul. 2009.

GAGO-DOMINGUEZ, M. J.; CASTELAO, E.; YUAN, J.M. ; YU, M.C.; and ROSS, R.K. Use of permanent hair dyes and bladder- cancer risk. *International Journal of Cancer*, v. 91, p. 575-579, 2001.

GODDINGER, D.; NORDENDE, K.; FERNANDEZ, N.Z.; BATTERMANN, M.; SCHROEDER, T. Hair conditioning agents containing selected cationic polymers and water. United States Patent. US 2010/0047202 A1, 22 jun. 2009, 25 fev. 2010.

HUNCHAREK, M.; KUPELNICK, B. Personal Use of Hair Dyes and the Risk of Bladder Cancer: Results of a Meta-Analysis. *Public health reports*, v.120, p.31-38, 2005.

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

INLEN, L.J.; HARRIS, R.; GARROD, A.; RODRIGUEZ, K. Use of hair dyes by patients with breast cancer: a case-control study. *British Medical Journal*, v.6, p.366-368.

KIUNG, G.; LUO, X.; KALAFSKY, R.E.; FRANCO, P. Compositions and methods for decreasing color loss from died hair. United States Patent. US 2004/0040095 A1, 22 dez. 2000, 4 mar. 2004.

LAMBERTY, L.; KALAFSKY, R.E.; DUGGAN, C. *Method for improving color retention in artificially colored hair*. World Intellectual Property Organization. WO 2012061025 A1, 20 out. 2011, 11 set. 2013.

LEWIS, D.; MAMA, J.; HAWKES, J. Review of Aspects of Oxidative Hair Dye Chemistry with Special Reference to N-Nitrosamine Formation. *Materials* , v. 6, p. 517-534, 2013.

LOCKE, B.; JACHOWICZ, J. Fading of artificial hair color and its prevention by photofilters. *Journal of cosmetic science*, v. 56, p. 407-425, 2005.

NGUYEN, N.V.; CANNEL, D.W.; ESPINO, C.C.; HASHIMOTO, S. Process for styling dyed hair and inhibiting its color loss during shampooing. United States Patent. US 727288 B2, 16 nov. 2005, 1 jun.2010.

OTHA, N.; ROBERTSON, A.R. Colorimetry. *Fundamentals and Applications*. Chichester: John Wiley & Sons, 2005.

PATTANAARGSON, S.; MUNHAPOL, T.; HIRUNSUPACHOT, P.; LUANGTHONGARAM, P. Photoisomerization of octyl methoxycinnamate. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v 161, p. 269–274, 2004.

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

ROBBINS, C.R. *Chemical and Physical Behaviour of Human hair*. Springer: Nova Iorque. 5^aed, 2012.

SAMPAIO, S.; MAIA, F.; GOMES, J.R. Diffusion of coloured silica nanoparticles into human hair. *Coloration Technology*, v.127, p.55-61, 2010.

SHEENA PATEL, S.; BASKETTER, D.A.; JEFFERIES, D.; WHITE, I.R.; RYCROFT, R.J.G.; MCFADDEN, J.P.; HO, S. Patch test frequency to *p*-phenylenediamine: follow up over the last 6 years. *Contact Dermatitis*, v, 56, p.35–37, 2007.

SOANE, D.S.; LINFORD, M.R. Nanoscopic hair care products. United States Patent. US 2004/0253196, 16 julho 2004, 16 dez. 2004.

SOSTED, H.; RASTOGI, S.C.; ANDERSEN, K.E.; JOHANSEN, J.D.; MENNÉ, T. Hair dye contact allergy: quantitative exposure assessment of selected products and clinical cases. *Contact dermatitis*, v. 50, p. 344-348, 2004.

SOSTED, H.; AGNER, T.; ANDERSEN, K.E.; MENNÉR, T. 55 cases of allergic reactions to hair dye: a descriptive, consumer complaint-based study. *Contact Dermatitis*, v. 47, p.299-303, 2002.

WEISS-ANGELI, V.; POLETTO, F.S.; ZANCAN, L.R.; BALDASSO, F.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Nanocapsules of Octyl Methoxycinnamate Containing Quercetin Delayed the Photodegradation of Both Components Under Ultraviolet A Radiation. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v.4, p. 1–10, 2008.

WONG, M.; MEMISHA, R. Hair care compositions which reduce color loss in hair and methods of using the compositions. United States Patent US. 6805856, 17 abr. 2002, 19 out. 2004.