

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

Desenvolvimento tecnológico de nanoemulsão contendo ácido azelaico e avaliação da inibição da tirosinase, permeação cutânea e perfil sensorial

SIMONE JACOBUS BERLITZ

PORTO ALEGRE, 2017



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

Desenvolvimento tecnológico de nanoemulsão contendo ácido azelaico e avaliação da inibição da tirosinase, permeação cutânea e perfil sensorial

Dissertação apresentada por **Simone Jacobus Berlitz** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Irene Clemes Kulkamp Guerreiro

Porto Alegre, 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28.março.2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Letícia Scherer Koester  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Simone Hickmann Flôres  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Berlitz, Simone Jacobus  
Desenvolvimento tecnológico de nanoemulsão  
contendo ácido azelaico e avaliação da inibição da  
tirosinase, permeação cutânea e perfil sensorial /  
Simone Jacobus Berlitz. -- 2017.  
93 f.

Orientadora: Irene Clemes Kulkamp-Guerreiro.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2017.

1. Nanoemulsão. 2. Ácido azelaico. 3. Melasma. I.  
Kulkamp-Guerreiro, Irene Clemes, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 307 da Faculdade de Farmácia da UFRGS, na cidade de Porto Alegre. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.



## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora e amiga, Prof. Dra. Irene Clemes Kulkamp Guerreiro, pela oportunidade, confiança, dedicação e motivação.

Ao Dâmie De Villa pelo auxílio na concepção deste trabalho e suporte na parte médica.

Às professoras Dra. Adriana Raffin Pohlmann e Dra. Silvia Guterres pela colaboração nos ensaios de permeação e por conceder aos equipamentos necessários na realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório 307 – Germano Prebianca, Luis Fernando Paim, Luiz Augusto Maschmann, Helissara Diefenthaeler, Mariana Bianchin, Mosiele Giaretta, Renata Daudt e Samuel Davies – pelo auxílio, amizade, motivação, ensinamento e momentos de descontração.

Aos colegas do laboratório 405, em especial Aline Cardoso, Andréia Härter e Franciele Bruinsmann, e também Denise Jornada, Emílio Hirata, Karina Paese, Kelly Zatta, Leidyana da Costa, Margani Fin, Renata Contri e Simara Nader pelos ensinamentos, auxílio e amizade.

Aos professores do PPGCF pelos ensinamentos concedidos.

À UFRGS, PPGCF e CAPES pela oportunidade de realização deste trabalho.

À minha família, principalmente meus pais, Angela e Felipe, que sempre me incentivaram a seguir na carreira acadêmica e não mediram esforços para me ajudar na conquista dos meus objetivos.

Ao Rafael, pelo companheirismo, incentivo, paciência e palavras de carinho.



## RESUMO

O ácido azelaico é um fármaco amplamente utilizado como tratamento em diversas doenças de pele, como acne, rosácea e melasma. A utilização de sistemas nanoestruturados para aplicação tópica se mostra interessante visto que o menor tamanho de partícula proporciona uma melhor entrega de fármacos até o seu sítio de ação. É promissor o desenvolvimento de formulações capazes de diminuir os efeitos adversos do ácido azelaico e intensificar sua eficácia no tratamento de distúrbios pigmentários da pele, aliado ao desenvolvimento de uma formulação com controle de permeação e perfil sensorial que facilite a adesão ao tratamento. O objetivo do presente trabalho é desenvolver uma nanoemulsão contendo ácido azelaico e realizar ensaios da tirosinase, permeação cutânea e análise sensorial da formulação desenvolvida. A nanoemulsão foi preparada através da técnica de homogeneização a alta velocidade. A caracterização físico-química avaliou os parâmetros de diâmetro médio de partícula e distribuição do tamanho de partícula pela técnica de difração de laser, o potencial zeta foi medido por mobilidade eletroforética, o pH por potenciometria e teor e eficiência de encapsulação por CLAE. A morfologia foi observada por microscopia eletrônica de transmissão. A nanoemulsão foi estável por 30 dias a 30°C/ 65% UR. A formulação apresentou teor de 10 mg/mL, tamanho de partícula de  $419 \pm 23$  nm, distribuição monomodal, eficiência de encapsulação de 84,65%, potencial zeta de  $-10,9 \pm 0,44$  mV e pH de  $5,01 \pm 0,01$ . Para verificar a eficácia despigmentante da formulação foi realizado o ensaio *in vitro* de inibição de tirosinase, onde a nanoemulsão se mostrou mais eficaz que o controle com o fármaco na sua forma livre. O ensaio de permeação cutânea *in vitro* em células de difusão de *Franz* foi realizado com pele de orelha de porcos durante 24 horas e ele demonstrou que a formulação nanotecnológica conseguiu atingir as camadas mais profundas da pele (epiderme viável e derme), permitindo que o fármaco alcance o seu sítio de ação, facilitando a inibição da síntese de melanina. Foi realizada análise sensorial descritiva, com 16 voluntários demonstrando que a formulação apresentou maior espalhabilidade e menor brilho que um produto já disponível no mercado. Portanto, a nanoemulsão desenvolvida se mostra promissora para utilização no tratamento de melasma, inclusive o dérmico.

**Palavras-chave:** Nanoemulsão. Ácido azelaico. Melasma.



## ABSTRACT

Technological development of an azelaic acid-loaded nanoemulsion and evaluation of its tyrosinase inhibition, skin permeation and sensory profile

Azelaic acid is a drug commonly used in the treatment of several skin diseases such as acne, rosacea and melasma. Nanostructured systems for topical application are interesting because its smaller particle size lead to a better drug delivery to its action site. Therefore, it is promising to develop formulations able to lower azelaic acid's side effects and increase its efficacy as a skin whitening agent as well as control its permeation and shows a sensory profile that helps with patient adherence. The aim of the present work is to develop an azelaic-acid loaded nanoemulsion, evaluating its tyrosinase inhibition, skin permeation and sensory profile. The nanoemulsion was prepared using high shear homogenization. Its characterization was conducted evaluating the average particle diameter through laser diffraction, the zeta potential by eletrophoretic mobility, pH by potentiometry and drug content and encapsulation efficiency by HPLC. The morphology of the nanoemulsion was observed by transmission electron microscopy. The product was stable for 30 days at 30°C/ 65 % RH. The theoretical drug content was 10 mg/mL and the particle size  $419 \pm 23$  nm with a monomodal distribution profile, encapsulation efficiency of 84,65% and the zeta potencial was  $-10,9 \pm 0,44$  mV while the pH was  $5,01 \pm 0,01$ . To evaluate the formulation's whitening efficacy, tyrosinase inhibition was calculated and the azelaic-acid loaded nanoemulsion was more effective than the control with the drug in its free form. The *in vitro* permeation study using Franz diffusion cells was conducted for 24 hours, using pig ear skin and showed that the formulation was able to permeate through the skin and reach the deeper layers (viable epidermis and dermis), allowing the drug to reach its action site, improving the melanin synthesis inhibition. To help understand the sensory profile of the nanoemulsion, a descriptive sensory evaluation was conducted with 16 volunteers. The nanoemulsion's sensory profile showed a better spreadability and lower shine comparing with a product already available in pharmacies. Hence, the azelaic acid-loaded nanoemulsion developed in this word seems to be promising as a treatment for pigmentary skin disorders as dermal melasma.

**Keywords:** Nanoemulsion. Azelaic acid. Melasma.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Paciente com melasma na área da bochecha, demonstrando a pigmentação irregular.....	27
Figura 2 –	Estrutura molecular do AzA.....	28
Figura 3 –	Diagrama ternário de fases.....	32
Figura 4 –	Rota biossintética da melanina.....	33
Figura 5 –	Sítios circulares nos antebraços.....	50
Figura 6 –	Diagrama de Fases: a área escura corresponde à área de formação de nanoemulsão.....	54
Figura 7 –	Distribuição do tamanho de partículas das nanoemulsões analisadas por difração de laser tanto por volume como por número.....	55
Figura 8 –	Distribuição do tamanho de partícula da LAZA analisada por difração de laser, por volume.....	56
Figura 9 –	Fotomicrografias obtidas por MET da nanoemulsão contendo 10 mg/mL de AzA, em diferentes aumentos.....	57
Figura 10 –	NAZA após teste de centrifugação.....	58
Figura 11 –	Quantidade de AzA no meio receptor em diferentes tempos de coleta, para a formulação LAZA, NAZA e NAZA-b.....	62
Figura 12 –	Quantidade total de AzA retido na pele (estrato córneo, epiderme e derme).....	63
Figura 13 –	Quantidade de AzA retido nas camadas da pele.....	65



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Faixa de EHL de acordo com o uso de substâncias.....	31
Tabela 2 –	Porcentagens de cada tensoativo para obter o valor de EHL selecionado.....	39
Tabela 3 –	Insumos da nanoemulsão proposta (NAzA) e suas respectivas concentrações.....	41
Tabela 4 –	Insumos da LAzA e suas respectivas concentrações.....	42
Tabela 5 –	Amostras utilizadas para determinação do EHL requerido do óleo de arroz.....	53
Tabela 6 –	Características físico-químicas da NAzA.....	55
Tabela 7 –	Avaliação da estabilidade da nanoemulsão NAzA.....	58
Tabela 8 –	Resultados do IC <sub>50</sub> calculados a partir da inibição da tirosinase.....	59
Tabela 9 –	Avaliação da exatidão do método analítico para doseamento de AzA em pele de orelha de porco no experimento de permeação cutânea <i>in vitro</i> .....	62
Tabela 10 –	Resultados da análise sensorial descritiva para NAzA e Azelan®.....	66
Tabela 11 –	Avaliação dos coeficientes de variação intra e inter-dia do método analítico para determinação de ácido azelaico em nanoemulsão....	80
Tabela 12 –	Avaliação da exatidão do método analítico para doseamento de AzA em nanoemulsão.....	80



## LISTA DE ABREVIATURAS

AH	Ácido hialurônico
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
AzA	Ácido azelaico
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
LAZA	Formulação com ácido azelaico na sua forma livre
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
NAZA	Nanoemulsão contendo ácido azelaico
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	27
3.1	MELASMA E PELE.....	27
3.2	ÁCIDO AZELAICO.....	28
3.3	SISTEMAS NANOESTRUTURADOS.....	30
3.4	ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO.....	30
3.5	ESTUDOS DE EFICÁCIA E ANÁLISE SENSORIAL DE PRODUTOS DERMATOLÓGICOS.....	32
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
4.1	MATERIAIS.....	37
<b>4.1.1</b>	<b>Matérias-primas</b> .....	37
<b>4.1.2</b>	<b>Materiais</b> .....	38
<b>4.1.3</b>	<b>Aparelhos e equipamentos</b> .....	38
4.2	MÉTODOS.....	38
<b>4.2.1</b>	<b>Desenvolvimento de nanoemulsão contendo AzA</b> .....	38
4.2.1.1	<i>Verificação do EHL requerido para o óleo de arroz</i> .....	39
4.2.1.2	<i>Construção de Diagrama Pseudo-Ternário de Fases</i> .....	40
4.2.1.3	<i>Preparação da nanoemulsão</i> .....	40
4.2.1.4	<i>Determinação do índice de refração da nanoemulsão</i> .....	43
4.2.1.5	<i>Caracterização físico-química da nanoemulsão</i> .....	43
4.2.1.6	<i>Ensaio de teor e taxa de encapsulação</i> .....	44
4.2.1.7	<i>Avaliação morfológica da nanoemulsão</i> .....	45
4.2.1.8	<i>Estudo de estabilidade das nanoemulsões</i> .....	45
4.2.1.9	<i>Ensaio in vitro de inibição da tirosinase de cogumelo</i> .....	45
4.2.1.10	<i>Ensaio de penetração e permeação cutânea in vitro</i> .....	46
4.2.1.10.1	<i>Retenção no estrato córneo (tape stripping)</i> .....	48
4.2.1.10.2	<i>Retenção na epiderme e na derme (técnica de separação por calor)</i> .....	48
4.3	ENSAIO DE ANÁLISE SENSORIAL DA NANOEMULSÃO.....	49

4.3.1	<b>Análise sensorial descritiva</b> .....	49
4.4	DESCARTE DE RESÍDUOS.....	51
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	53
5.1	DESENVOLVIMENTO DA NANOEMULSÃO CONTENDO ÁCIDO AZELAICO.....	53
5.2	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO DA NANOEMULSÃO.....	54
5.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA NANOEMULSÃO.....	55
5.4	ENSAIO DE TEOR E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO.....	56
5.5	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA NANOEMULSÃO.....	57
5.6	ESTUDO DE ESTABILIDADE DA NANOEMULSÃO (NAzA).....	58
5.7	ENSAIO <i>IN VITRO</i> DA INIBIÇÃO DE TIROSINASE DE COGUMELO.....	59
5.8	ENSAIO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i> .....	60
5.9	ANÁLISE SENSORIAL DESCRITIVA.....	66
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	69
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	71
	<b>ANEXO A – Validação da metodologia analítica de quantificação de AzA em nanoemulsão</b> .....	79
	<b>ANEXO B – Parecer consubstanciado do comitê de ética em pesquisa</b> .....	81
	<b>ANEXO C - Termo de consentimento livre e esclarecido</b> .....	87
	<b>ANEXO D – Questionário da análise sensorial descritiva</b> .....	91
	<b>ANEXO E – Ficha técnica do óleo de arroz</b> .....	93

## 1 INTRODUÇÃO

O ácido azelaico (AzA) é um ácido dicarboxílico amplamente utilizado em doenças da pele, como acne, rosácea e melasma (GUPTA, 2005; HABIF, 2012; LOWE et al., 1998; SARKAR; BHALLA; KANWAR; 2002). Apresenta propriedades queratolíticas, antibacterianas, anti-inflamatórias, antioxidantes e despigmentantes (DRAELOS; KAYNE, 2008; GUPTA, 2005). Seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado. Tem sido relatado o surgimento de efeitos adversos como queimação, coceira e ardência (REIS et al., 2013; SARKAR; BHALLA; KANWAR; 2002; THIBOUTOT; THIEROFF-EKERDT; GRAUPE, 2003).

A diminuição dos efeitos adversos, aliado ao aumento da eficácia e busca de um perfil sensorial que favoreça a adesão ao tratamento são fatores importantes a se considerar no desenvolvimento de uma formulação. Neste contexto, o uso da nanotecnologia está relacionado com uma melhora de diversos aspectos das formulações farmacêuticas. Sistemas nanoestruturados, em produtos de uso tópico podem servir de reservatório para substâncias lipídicas, prolongando e controlando a liberação cutânea de substâncias, além de melhorar a adesividade e tempo de permanência destas substâncias na pele (ALVAREZ-ROMAN et al., 2004; ALVES et al., 2007; CONTRI et al., 2011a; JAEGER et al., 2007). A nanotecnologia pode alterar o perfil sensorial de formulações e aumentar a eficácia de ativos dermatológicos (KÜLKAMP-GUERREIRO et al., 2013).

A utilização de sistemas nanoestruturados para aplicação tópica se mostra interessante visto que o menor tamanho de partícula proporciona uma maior estabilidade da nanoemulsão quando comparada à macroemulsões. Também, as nanoemulsões são mais eficientes na entrega de fármacos através da pele já que a grande área superficial e o tamanho de partícula reduzido do sistema proporciona uma maior eficiência na penetração de ativos (TADROS et al., 2004). Até o momento, as poucas publicações científicas que exploram o AzA em nanoestruturas avaliam somente sua atividade antiacne e no tratamento da rosácea, sem explorar o uso do fármaco como despigmentante. Além disto, não há relato do fármaco em nanoemulsão, somente em microemulsão, nanocápsulas poliméricas ou sistemas vesiculares contendo fosfolipídios (MA et al., 2015; REIS et al., 2013; SHAH et al., 2015).

Os tratamentos existentes contra o melasma reduzem somente a melanina presente na epiderme. Não há tratamentos disponíveis que consigam tratar o melasma dérmico, considerado de difícil resolução (BOLANCA et al., 2008). Assim, a utilização do AzA em uma nanoformulação que consiga promover uma maior penetração e permeação dérmica, atingindo as camadas mais profundas da pele se mostra bastante promissor. O trabalho de Reis e colaboradores (2013) não avaliou a permeação cutânea de suas nanopartículas, mas avaliou a atividade antiacne do AzA, que foi similar à formulação com o fármaco na sua forma livre. Já a microemulsão desenvolvida por Ma e colaboradores (2015) atingiu um aumento da permeação cutânea do AzA, porém avaliaram somente a atividade anti-rosácea. Os sistemas avaliados por Shah e colaboradores (2015) também ficaram mais retidos no estrato córneo do que nas camadas mais profundas da pele e somente os invasossomas conseguiram uma maior eficácia antiacne que o controle não-tratado.

Para o presente trabalho, foram escolhidos os tensoativos poloxamer 407 e monooleato de sorbitano (Span<sup>®</sup> 80), que, apesar de serem muito comuns na preparação de nanoemulsões, a combinação dos mesmos em uma única formulação ainda não foi descrita na literatura. Como núcleo oleoso da nanoemulsão desenvolvida neste trabalho, foi escolhido o óleo de arroz. Suas frações insaponificáveis possuem altos níveis de tocoferóis, tocotrienóis e gama-orizanol, os quais apresentam atividade antioxidante (BERNARDI et al., 2011; RIGO et al., 2014). A exposição à radiação UV pode causar peroxidação lipídica gerando radicais livres, o que poderia estimular os melanócitos a produzir melanina (BOLANCA et al., 2008). Assim, a utilização de um óleo rico em antioxidantes é interessante como coadjuvante ao tratamento de melasma.

Assim, também, é relevante citar que ambas as formulações possuem em sua composição o ácido hialurônico (AH), que é um polissacarídeo aniônico encontrado naturalmente na matriz extracelular de certos tecidos. O AH pode hidratar o estrato córneo, abrindo rotas de penetração e, com isto, facilitar o transporte transdérmico. Além disto, os receptores de AH são altamente expressados nos queratinócitos da epiderme e fibroblastos da derme (HAN et al., 2015; JUNG et al., 2014). Atrux-Tallau e colaboradores (2014) realizaram um estudo que analisou a utilização de ligantes auto-organizáveis em nanoemulsões. Foi possível verificar que a nanoemulsão contendo como ligante o AH reduziu significativamente a síntese de melanina. Já que nenhum dos sítios receptores do AH parece ter envolvimento na melanogênese,

o autor concluiu que o ligante de AH não afetou o conteúdo de melanina, mas melhorou a atividade da nanoemulsão, aumentando a interação com os melanócitos. Por isto, a utilização de AH se mostra interessante para o presente trabalho, pois pode melhorar a eficácia despigmentante do AzA através do aumento da interação com os melanócitos.

Assim, o presente trabalho visa desenvolver nanoemulsão inovadora contendo AzA, contemplando o desenvolvimento farmacotécnico e o estudo de parâmetros relacionados com a adesão, a eficácia e a segurança do tratamento. Desta forma, o presente trabalho inclui a realização da análise sensorial e o perfil de permeação cutânea de uma nanoemulsão desenvolvida com uma combinação inédita de tensoativos, capaz de estabilizar o AzA em uma nanoformulação.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanoemulsão inovadora de AzA e avaliar suas características físico-químicas, inibição da tirosinase, perfil de permeação cutânea e sensorial.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e avaliar nanoemulsão inovadora de AzA, avaliando a distribuição de tamanho de partículas, potencial zeta, pH, teor e eficiência de encapsulação;
- Avaliar a inibição *in vitro* da tirosinase da nanoemulsão de AzA em comparação ao fármaco na sua forma livre;
- Avaliar o perfil de permeação cutânea *in vitro* do AzA veiculado na formulação desenvolvida em comparação ao fármaco livre; bem como o papel da presença de AH na nanoformulação;
- Avaliar o perfil sensorial da nanoemulsão desenvolvida em comparação a um produto disponível no mercado.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 MELASMA E PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, contemplando em torno de 15% do peso total de um adulto (KANITAKIS, 2002). Ela pode ser dividida em três camadas: epiderme, derme e tecido subcutâneo (HABIF, 2012).

O estrato córneo é a camada mais externa da epiderme e é responsável pela função barreira, sendo a menos permeável das camadas da pele (HABIF, 2012; JAMES; BERGER; ELSTONS, 2016). Abaixo do estrato córneo encontra-se a chamada epiderme viável que se localizam os melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina (HABIF, 2012; NAIK; KALIA; GUY, 2000).

O melasma é uma desordem pigmentária que acomete a pele principalmente na testa, bochechas e queixo. Também chamado de cloasma, é caracterizado por máculas de coloração marrom escura (Figura 1) e acomete mais mulheres do que homens (BOLANCA et al., 2008).



**Figura 1 – Paciente com melasma na área da bochecha, demonstrando a pigmentação irregular**  
Fonte: Sheth; Pandya (2011a).

A sua fisiopatologia não está completamente elucidada, entretanto vários fatores são descritos como contribuidores para o aparecimento do melasma, como exposição à luz ultravioleta, predisposição genética, gravidez, uso de contraceptivos orais, disfunções endócrinas, tratamentos hormonais e até cosméticos ou

medicamentos que contêm agentes fototóxicos (SARKAR; BHALLA; KANWAR; 2002).

Conforme Cestari e colaboradores (2009), as manchas provocadas pelo melasma podem ser divididas em quatro grupos: epidérmicas, dérmicas, epidérmica-dérmica e tipo indeterminado. Este último acomete pacientes com tipo de pele V e VI, de acordo com a classificação de Fitzpatrick. Já o tipo epidérmico é o mais comum e mais facilmente tratável e se caracteriza por um aumento da melanina na epiderme. O tipo dérmico é menos responsivo às terapias convencionais e apresenta na derme macrófagos carregados com melanina. O tipo misto apresenta melasma tanto do tipo epidérmico quanto do dérmico.

O tratamento mais convencional e “padrão ouro” contra o melasma é o uso tópico de hidroquinona devido a sua atividade inibitória da tirosinase, entretanto outros fármacos também são amplamente utilizados, como mequinol, retinóides, corticosteroides, ácido kójico, ácido ascórbico, arbutin e AzA (BOLANCA et al., 2008; CESTARI et al., 2009; RENDON; BARKOVIC, 2016; SARKAR; BHALLA; KANWAR; 2002; SHETH; PANDYA, 2011b).

A maioria das terapias descritas na literatura reduz somente a melanina presente na epiderme. O melasma dérmico é de difícil resolução e não há tratamentos que consigam remover o pigmento presente na derme. Entretanto, a fonte do pigmento dermal é de origem epidermal então inibindo a melanogênese epidermal por longos períodos o pigmento presente na derme pode diminuir (BOLANCA et al., 2008).

### 3.2 ÁCIDO AZELAICO

Ácido azelaico (ácido 1,7-heptanedicarboxílico, AzA) é um ácido dicarboxílico utilizado no tratamento de doenças de hiperpigmentação e da acne (GUPTA, 2005; LOWE et al., 1998).

A Figura 2 mostra a estrutura molecular do AzA.

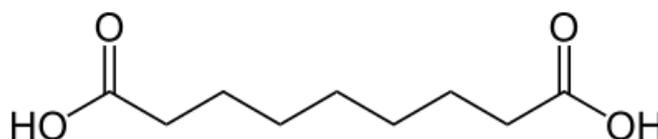


Figura 2 – Estrutura molecular do AzA

Fonte: SciFinder (2017).

O mesmo possui pKa de 4,47 à 25°C, densidade de 1,251 g/cm<sup>3</sup> e baixa solubilidade em água (logP de 1,196) (SCIFINDER, 2017).

O AzA possui propriedades queratolíticas, antibacterianas e anti-inflamatórias (HABIF, 2012) bem como propriedades antioxidantes e despigmentantes (DRAELOS; KAYNE, 2008; GUPTA, 2005). Pode ser utilizado para tratar acne, rosácea e melasma (HABIF, 2012; LOWE et al., 1998; SARKAR; BHALLA; KANWAR; 2002).

Aparentemente, apresenta poucos efeitos adversos, não severos (SARKAR; BHALLA; KANWAR; 2002). Entretanto, um estudo relacionou o aparecimento de sensação de queimação, coceira e ardência em 38% dos pacientes que utilizaram uma formulação em gel com 15% de AzA, em comparação ao veículo sem fármaco (THIBOUTOT; THIEROFF-EKERDT; GRAUPE, 2003). Assim, mesmo possuindo efeitos adversos considerados leves, os mesmos podem interferir na aderência do paciente ao tratamento (REIS et al., 2013).

Apesar de todas as propriedades já descritas, o mecanismo de ação do AzA ainda não foi completamente elucidado. Um estudo apontou que o AzA consegue modular a resposta inflamatória em queratinócitos normais de humanos (MASTROFRANCESCO et al., 2010). Além disto, sua ação despigmentante se dá por ser um inibidor da tirosinase e assim inibir a produção de melanina (DRAELOS; KAYNE, 2008; GUPTA, 2005; KADUNC et al., 2013; SHETH; PANDYA, 2011b). Outro estudo, mais recente, demonstrou que a ação terapêutica do AzA na rosácea pode incluir a inibição da catelicidina e da enzima KLK5, que possuem papéis importantes na patofisiologia da doença (CODA et al., 2013). É interessante mencionar que o AzA não possui efeito despigmentante na pele com pigmentação normal; esta especificidade pode se dar por ele ter um efeito seletivo somente nos melanócitos anormais (BANDYOPADHYAY, 2009).

Vale salientar que o AzA é pode ser utilizado durante a gravidez pois é classificado pelo Food and Drug Administration (FDA) como categoria B, ou seja, em estudos com animais o AzA não mostrou teratogenicidade, todavia, não há estudos deste tipo em humanos (CHIEN et al., 2016; FDA, 2017).

### 3.3 SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

O uso da nanoencapsulação de ativos para melhorar aspectos das formulações farmacêuticas é amplamente encontrado na literatura. Dentre esses aspectos podemos citar que a nanoencapsulação pode potencializar a ação de inúmeros fármacos, pode fornecer um controle da liberação de fármacos em sítios específicos e pode reduzir a toxicidade e degradação das substâncias (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Os tipos mais comuns de nanopartículas estudadas para aplicação tópica são as baseadas em sistemas lipídicos, como as nanopartículas lipídicas sólidas, carreadores lipídicos nanoestruturados e nanoemulsões (CONTRI et al., 2011a).

As nanoemulsões são dispersões finas óleo-em-água, com gotículas entre 100 e 600 nm (BOUCHEMAL et al., 2004). Apresentam menor tendência a sedimentação e cremeação (SOLANS et al., 2005). As nanoemulsões possuem uma maior capacidade de penetrar e/ou permear na pele quando comparadas com as nanocápsulas. Este fato, provavelmente, se deve pela sua flexibilidade e ausência de polímero, o qual possui uma afinidade pelo estrato córneo. Além disto, os sistemas nanoemulsionados são aplicados para melhorar a solubilidade de ativos lipofílicos (CONTRI et al., 2011a). As técnicas mais conhecidas para formação de nanoemulsão são a utilização de métodos de alta e baixa energia de emulsificação (TADROS et al., 2004). Geralmente nos métodos que utilizam alta energia de emulsificação, o primeiro passo é preparar uma macroemulsão O/A e então esta emulsão é convertida em nanoemulsão através do uso de equipamentos específicos, como homogeneizador a alta pressão ou de alta velocidade (GUPTA et al., 2016).

### 3.4 ESTUDOS DE PRÉ-FORMULAÇÃO

Para uma elaboração mais racional de nanoemulsão, utiliza-se alguns recursos como o cálculo de equilíbrio hidrófilo-lipófilo requerido para a emulsão e a construção de diagrama ternário de fases. O conceito de equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) foi introduzido por Griffin em 1949. Visto que emulsionantes consistem em uma molécula com grupos hidrofílicos e lipofílicos, o equilíbrio do tamanho e força destes grupos pode ser chamado de EHL. Este sistema permite selecionar o emulsionante mais eficaz para o tipo de emulsão desejado (GRIFFIN, 1949). O valor

de EHL de um tensoativo representa as proporções relativas das partes hidrofílicas e lipofílicas. Sendo assim, quando o valor de EHL é elevado, significa que a substância possui mais propriedades hidrofílicas e quando o EHL é baixo, possui mais propriedades lipofílicas (BERGENSTÅHL, 2008; BILLANY, 2008; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2010). Pode-se verificar na Tabela 1, a faixa de EHL requerido de algumas substâncias, de acordo com a sua utilização, conforme Griffin (1949).

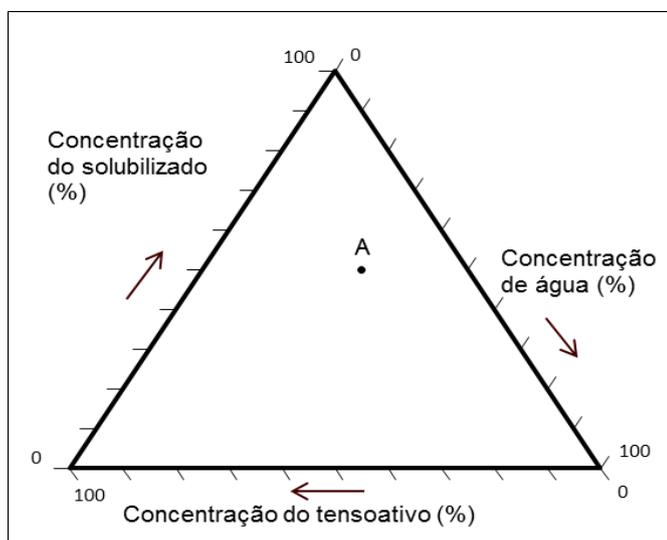
**Tabela 1 – Faixa de EHL de acordo com o uso de substâncias**

Faixa de EHL	Uso
4 – 6	Emulsionantes A/O
7 – 9	Agentes molhantes
8 – 18	Emulsificantes O/A
13 – 15	Detergentes
15 – 18	Solubilizantes

Fonte: Griffin (1949).

Outra ferramenta que auxilia no desenvolvimento de nanoemulsões é o diagrama de fases. Este consiste em um diagrama ternário que ilustra os efeitos das diferentes concentrações de solubilizado, solvente e tensoativo. Sua construção permite verificar qual é a concentração ideal de tensoativo para determinado sistema (BILLANY, 2008; BORBA; SANTANA, 2007).

O diagrama é composto por três eixos, um para cada componente, representando de 0 a 100% do mesmo. O ponto A como mostra a Figura 3 ilustra um diagrama terciário onde se tem uma formulação com 50% de solubilizado, 20% de tensoativo e 30% de água.



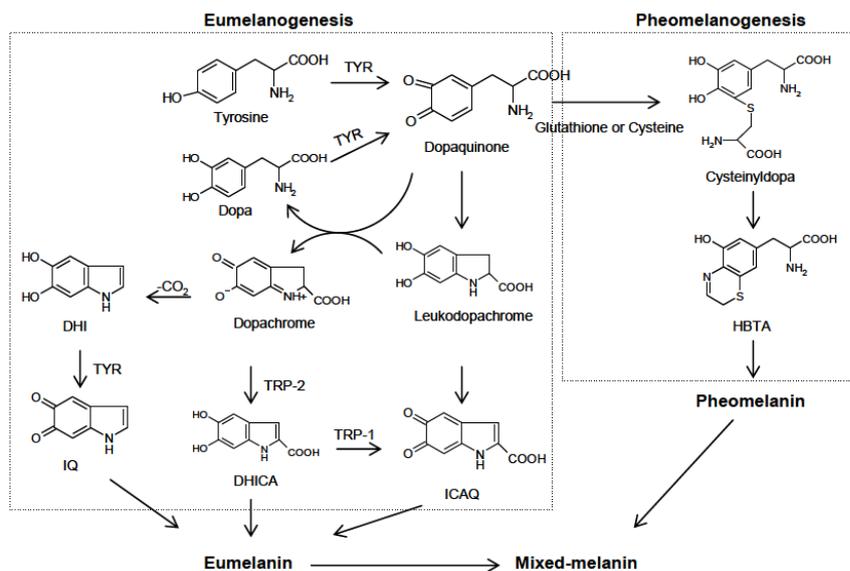
**Figura 3 – Diagrama ternário de fases**

Fonte: adaptado de Billany (2008).

Para o presente trabalho, foram escolhidos os tensoativos monooleato de sorbitano e o poloxamer 407 e. O monooleato de sorbitano (Span<sup>®</sup> 80) é um tensoativo não iônico com baixo valor de EHL (BILLANY, 2008). Outro surfactante não iônico também utilizado para estabilização de nanoemulsões é o poloxamer 407 (Pluronic<sup>®</sup> ou Lutrol<sup>®</sup> F127), que é um copolímero em tri-bloco de polioxietileno-polioxipropileno (PATEL, A. R.; PATEL, R. P.; PATEL M. M., 2009). Este tipo de polímero, com uma cadeia hidrofílica longa e um bloco hidrofóbico menor produz emulsões do tipo óleo-em-água devido ao seu alto EHL (TORCELLO-GÓMEZ et al., 2014). Até o presente momento, não há na literatura relatos da utilização concomitante destes dois tensoativos com o objetivo de formar nanoemulsão.

### 3.5 ESTUDOS DE EFICÁCIA E ANÁLISE SENSORIAL DE PRODUTOS DERMATOLÓGICOS

No presente trabalho, para avaliar a eficácia *in vitro* da nanoemulsão como agente despigmentante, foi utilizado o ensaio de inibição da tirosinase. A tirosinase é uma enzima que exerce um papel importante na síntese de melanina já em suas primeiras etapas. Esta enzima catalisa a reação de oxidação de dois substratos - L-tirosina e L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) – em dopaquinona. Este passo é limitante do processo de síntese da melanina visto que as reações subsequentes ocorrem espontaneamente em pH fisiológico. A dopaquinona é auto-oxidada em dopachrome que eventualmente é convertido em melanina (CHANG, 2009; SCHALLREUTER et al., 2008). Um esquema das reações que ocorrem durante a melanogênese pode ser verificado na Figura 4, conforme Chang (2009).



**Figura 4 – Rota biossintética da melanina**

Fonte: Chang (2009).

Assim, o ensaio de eficácia despigmentante com tirosinase de cogumelo se baseia na determinação colorimétrica da quantidade de DOPACHrome na presença e na ausência da nanoemulsão.

Um ensaio que está relacionado tanto à análise da eficácia quanto da segurança é o estudo da permeação cutânea. Apesar de alguns autores acreditarem que a absorção percutânea não contribua significativamente para a biodisponibilidade de substâncias, a determinação da absorção cutânea deve ser avaliada para prever o risco sistêmico da exposição cutânea a determinados produtos (BARTOSOVA; BAJGAR, 2012).

A técnica para avaliação de permeação cutânea através da utilização de célula de difusão de Franz é um método *in vitro* reconhecido por agências regulatórias (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA, 2015; ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD, 2004). Este método consiste em medir a difusão de substâncias através da pele até um fluido receptor. Há a possibilidade de utilização de pele não viável para medir somente a difusão ou de pele ativa para medir tanto a difusão quanto o metabolismo cutâneo. Estes modelos são bastante úteis quando utilizados como um método de comparação de *drug delivery* através da pele por diferentes formulações e, ao mesmo tempo, pode-se ter uma ideia de como seria a absorção percutânea em humanos (OECD, 2004).

Complementarmente à análise da eficácia e segurança, a avaliação da aceitabilidade é importante no desenvolvimento dos produtos. A análise sensorial é uma ciência multidisciplinar que abrange a medida, a interpretação e o entendimento das respostas humanas às propriedades de produtos percebidas através dos cinco sentidos, e tem demonstrado grande importância no desenvolvimento de produtos cosméticos que satisfaçam o consumidor (MARTENS, 1999; NORONHA et al., 2008; PENSÉ-LHÉRITIER, 2008).

A análise sensorial permite obter informações que não são detectadas por procedimentos analíticos, como, por exemplo, a aceitabilidade de um produto e a intenção de compra por consumidores (ANCONI; CAMPOS, 2007; CHORILLI et al., 2009; GONÇALVES; OLIVEIRA, 2008). Na área farmacêutica, reconhece-se a importância da análise sensorial na aceitabilidade de cosméticos, que reflete diretamente na adesão ao uso do produto (ALMEIDA; GAIO; BAHIA, 2008; GONÇALVES; OLIVEIRA, 2008; NORONHA et al., 2008; PARENTE; GÁMBARO; ARES, 2008; STEBBINS; ALEXIS; LEVITT, 2008). Assim sendo, a avaliação sensorial é indispensável na pesquisa e inovação de produtos cosméticos (PENSÉ-LHÉRITIER, 2008; ZENG; RUAN; KOEHL, 2008).

Existem três tipos de análise sensorial: descritiva, discriminativa e afetiva. O teste discriminativo é utilizado quando se deseja verificar se as amostras são iguais ou diferentes visto que avalia atributos através da discriminação simples (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999). Os testes afetivos, também chamados de testes de consumidores, são conduzidos a partir de testes de preferência ou aceitabilidade. Estes dois tipos de testes sensoriais são realizados pelos próprios consumidores e são utilizados quando se requer avaliar a aceitação e agradabilidade, porém sem dar importância às intensidades das sensações (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999). Já a análise descritiva traduz uma informação qualitativa em um dado numérico, aplicando um desenho estatístico experimental e condições de testes controladas. Trabalhar com dados numéricos tem a vantagem de que eles podem ser analisados estatisticamente com maior facilidade (OIRSCHOT; TOMLINS, 2002). Nesta técnica, os atributos são identificados e quantificados por julgadores treinados especificamente para este propósito. Deve ser utilizada quando se necessita de informações detalhadas sobre os atributos de produto, como para obter uma documentação das características sensoriais, identificação e quantificação dos atributos sensoriais para orientação de

uma pesquisa, comparação entre produtos similares e também quando se quer um padrão ou referência para controle de qualidade ou desenvolvimento de novos produtos (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999).



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Matérias-primas

- Acetato de amônio – Synth;
- Ácido acético – Synth;
- Ácido azelaico – Sigma-Aldrich;
- Ácido hialurônico – Chengehi Life Sciences;
- Água ultrapura – sistema MilliQ®;
- Álcool isopropílico – Dinâmica;
- Amido de milho – Opção Fênix;
- Butilhidroxitolueno - Embacaps;
- Dimeticona – Dow Corning;
- Dimetilsulfóxido – Synth;
- Edetato dissódico - Embacaps;
- Etanol – Merck;
- Fosfato de sódio heptaidratado - Neon;
- Fosfato de sódio monobásico – Neon;
- Lanolina – Dinâmica;
- Lauril Sulfato de Trietanolamina – Delaware;
- L-tirosina – Synth;
- Metanol Grau HPLC – Tedia;
- Monooleato de sorbitano (Span® 80) – Sigma-Aldrich;
- Óleo de arroz – Irgovel Indústria Riograndense de Óleos Vegetais;
- Óleo mineral – Dinâmica;
- Optiphen® (fenoxitanol e caprilil glicol) - Ashland;
- Petrolato – Dinâmica;
- Pigmento tímica – Basf;
- Poloxamer 407 – Basf;
- Tirosinase de cogumelo – Sigma-Aldrich;
- Trietanolamina – Sigma-Aldrich.

#### 4.1.2 Materiais

- Coluna Waters Nova Pak<sup>®</sup> C18 4 µm (3,9 x 150 mm);
- Pré-coluna SecurityGuardCartridges C18 - Phenomenex<sup>®</sup>;
- Membrana Amicon<sup>®</sup> 10.000 MW - Millipore;
- Membrana 0,45 µm – Millipore;
- Azelan<sup>®</sup> - Bayer.

#### 4.1.3 Aparelhos e equipamentos

- Balança analítica – APX-200, Denver Instrument;
- Centrífuga Eppendorf – Centrifuge 5417R;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência – Perkin Elmer Series 200;
- Potenciômetro – Ultra-Basic, Denver Instrument;
- Mastersizer<sup>®</sup> modelo 2000 – Malvern;
- Agitador do tipo vórtex - Phoenix;
- Ultra-turrax<sup>®</sup> T25 - IKA;
- Sonicador Ultracleaner 1400A – Unique;
- Refratômetro de bancada do tipo ABBE – Carl Zeiss;
- Espectrofotômetro Spectramax<sup>®</sup> M2E – Molecular Devices;
- Célula de difusão de Franz automática - Microette Plus Multi-Group<sup>®</sup>, Hanson Research Corporation, Chatsworth, PA, USA.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Desenvolvimento de nanoemulsão contendo AzA

Para o desenvolvimento da nanoemulsão, primeiramente foi realizada a verificação do EHL requerido para o óleo de arroz. A partir deste dado, se construiu um diagrama pseudo-ternário de fases com o objetivo de identificar a área de formação de nanoemulsão com o uso dos tensoativos poloxamer 407 e monooleato de sorbitano. A partir deste diagrama, foi determinada a concentração de uso dos tensoativos. Em seguida, passou-se para a fase de preparação da nanoemulsão

com todos os insumos sugeridos. Para a caracterização do tamanho e diâmetro de partícula, foi realizado o ensaio de determinação do índice de refração da nanoemulsão e posteriormente a mesma foi caracterizada através dos ensaios de tamanho de partícula e análise de distribuição do mesmo, potencial zeta e pH. Avaliou-se, também, o teor de AzA presente na nanoemulsão, a eficiência de encapsulamento e a estabilidade da formulação.

#### 4.2.1.1 Verificação do EHL requerido para o óleo de arroz

Para a determinação do EHL requerido para o óleo de arroz, produziu-se uma série de sete emulsões utilizando uma combinação de emulsionantes de valor de EHL conhecido em diferentes proporções (Tabela 2). Foram utilizados os tensoativos monooleato de sorbitano (lipofílico, EHL 4,3) e polissorbato 80 (hidrofílico, EHL 15).

Para o cálculo das quantidades de tensoativos necessários para a obtenção dos valores de EHL foi utilizada a Equação 1, considerando que a soma das quantidades dos tensoativos, corresponde a 10% do total da formulação. A concentração de óleo de arroz e de água é de 10% e 80%, respectivamente.

$$EHL = (EHL A \cdot 0,01 A) + (EHL B \cdot 0,01 B), \text{ onde } A + B = 100 \quad (1)$$

As quantidades utilizadas de tensoativo para cada valor de EHL encontram-se na Tabela 2. Para determinar a proporção dos tensoativos, foram selecionados os valores de EHL de 4,3; 6; 8; 10; 12; 14 e 15.

**Tabela 2 – Porcentagens de cada tensoativo para obter o valor de EHL selecionado**

Amostra	EHL	Monooleato de Sorbitano (A) (%)	Polissorbato 80 (B) (%)
1	4,3	100,00	0,00
2	6	84,11	15,89
3	8	68,22	31,78
4	10	46,73	53,27
5	12	28,01	71,96
6	14	9,35	90,65
7	15	0,00	100,00

As emulsões foram preparadas adicionando os tensoativos ao óleo de arroz e aquecendo as fases a  $80 \pm 3^\circ\text{C}$ . Então, a fase oleosa foi adicionada gota a gota à água sob agitação magnética. As amostras foram submetidas à avaliação macroscópica para determinação da emulsão mais estável, demonstrando o valor de EHL requerido para o óleo de arroz.

#### *4.2.1.2 Construção de Diagrama Pseudo-Ternário de Fases*

Para determinar as concentrações dos componentes para a obtenção da nanoemulsão, foi construído um diagrama pseudo-ternário de fases através do método de titulação aquosa (BALI; ALI, M.; ALI, J., 2010; SHAFIQ et al., 2007; SHARMA et al., 2010).

A construção do diagrama foi baseada na fase oleosa (óleo de arroz), surfactantes (monooleato de sorbitano e poloxamer 407), cosurfactante (etanol) e água ultrapura. A razão entre a combinação dos surfactantes com o cosurfactante (chamado de Smix) foi fixada em 9:1.

A fase oleosa foi combinada com o Smix nas proporções de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. Um volume de 1 mL de água ultrapura foi adicionado gota a gota com uma micropipeta sob agitação magnética. Após cada adição de água, os sistemas foram homogeneizados com o auxílio de bastão de vidro.

As mudanças de fases foram identificadas visualmente e classificadas como macroemulsão viscosa, macroemulsão líquida, macroemulsão cremosa, separação de fases e nanoemulsão.

#### *4.2.1.3 Preparação da nanoemulsão*

A nanoemulsão proposta neste trabalho, denominada NAzA, foi preparada através de homogeneização à alta agitação através do equipamento Ultra Turrax®.

A fase A consiste no sistema tensoativo (monooleato de sorbitano e poloxamer 407), etanol, AzA, óleo de arroz, butilhidroxitolueno e trietanolamina. O AzA foi solubilizado no etanol e ambos aquecidos a  $45^\circ\text{C}$ . Para garantir a melhor solubilização do AzA, ajustou-se o pH da solução de AzA e etanol com trietanolamina até pH 4,9. Após este ajuste de pH, adicionam-se os demais insumos da fase que já foram previamente aquecidos a  $80 \pm 3^\circ\text{C}$ .

A fase B (fase aquosa) consiste em edetato dissódico, ácido hialurônico e água ultrapura. Os insumos sólidos foram solubilizados na água sob agitação magnética de 600 rpm por 10 minutos. Foi utilizado o insumo AH pois ele pode hidratar o estrato córneo, abrindo rotas de penetração e, com isto, facilitar o transporte transdérmico. Também, os receptores de AH são altamente expressados nos queratinócitos da epiderme e fibroblastos da derme (HAN et al., 2015; JUNG et al., 2014).

A fase A quanto a fase B da nanoemulsão foram aquecidas a  $80 \pm 3^\circ\text{C}$ . Em seguida, a fase B foi vertida gota a gota sobre a fase A, sob agitação magnética. Após a formação da emulsão, a mesma foi submetida a agitação de 22.000 rpm com o auxílio do equipamento Ultra Turrax® T25 (IKA® Works Inc., NC, USA), durante 30 minutos.

A fase C foi adicionada no final do preparo da nanoemulsão, quando a mesma já se encontrava em temperatura ambiente. Manteve-se agitação do equipamento Ultra Turrax® por 5 minutos a 16.000 rpm.

A Tabela 3 demonstra os componentes da nanoemulsão e suas respectivas concentrações.

**Tabela 3 – Insumos da nanoemulsão proposta (NAzA) e suas respectivas concentrações**

<b>Fase</b>	<b>Componente</b>	<b>Concentração (%)</b>
A	Monooleato de sorbitano	6,57
	Poloxamer 407	2,43
	Etanol	1,00
	Ácido azelaico	1,00
	Óleo de arroz	10,00
	Butilhidroxitolueno	0,05
	Trietanolamina	qs pH 4,9
B	Edetato dissódico	0,05
	Ácido hialurônico	0,40
	Água ultrapura	78,00
C	Fenoxietanol e caprilil glicol	0,50

Como controle frente à nanoestrutura, utilizou-se a emulsão contendo AzA na sua forma livre e contendo todos os demais componentes que também estavam presente na nanoemulsão (denominada de LAzA), com o objetivo de descartar qualquer influência dos excipientes nos experimentos a serem realizados.

A emulsão LAZA foi preparada através de agitação magnética, sem a utilização do equipamento Ultra Turrax®.

A fase A da LAZA consiste no sistema tensoativo (monooleato de sorbitano e poloxamer 407), óleo de arroz e butilhidroxitolueno. Estes insumos foram aquecidos à  $80 \pm 3^\circ\text{C}$  e submetido à agitação magnética de 600 rpm.

A fase B (fase aquosa) consiste em edetato dissódico, ácido hialurônico e água ultrapura. Os insumos sólidos foram solubilizados na água sob agitação magnética de 600 rpm por 10 minutos e aquecidos à  $80 \pm 3^\circ\text{C}$ .

A fase B foi vertida gota a gota sobre a fase A, sob agitação magnética de 600 rpm.

O AzA foi solubilizado no etanol e ambos aquecidos a  $45^\circ\text{C}$ . Para garantir a melhor solubilização do AzA, ajustou-se o pH da solução de AzA e etanol com trietanolamina até pH 4,9 (fase C). Então, a fase C foi adicionada à emulsão já formada (fase A + fase B), mantendo a agitação magnética de 600 rpm por 5 minutos.

Então, a fase D foi adicionada à emulsão, também sob agitação magnética por 5 minutos.

A Tabela 4 demonstra os componentes da nanoemulsão e suas respectivas concentrações.

**Tabela 4 – Insumos da LAZA e suas respectivas concentrações**

<b>Fase</b>	<b>Componente</b>	<b>Concentração (%)</b>
A	Monooleato de sorbitano	6,57
	Poloxamer 407	2,43
	Óleo de arroz	10,00
	Butilhidroxitolueno	0,05
B	Edetato dissódico	0,05
	Ácido hialurônico	0,40
	Água ultrapura	78,00
C	Etanol	1,00
	Ácido azelaico	1,00
	Trietanolamina	qs pH 4,9
D	Fenoxietanol e caprilil glicol	0,50

#### 4.2.1.4 Determinação do índice de refração da nanoemulsão

O índice de refração da formulação proposta foi determinado por refratômetro. O equipamento utilizado foi um refratômetro de bancada do tipo ABBE (fabricante Carl Zeiss) e a leitura foi realizada na escala do índice de refatividade e em triplicata.

#### 4.2.1.5 Caracterização físico-química da nanoemulsão

A caracterização da nanoemulsão foi realizada através de parâmetros críticos que devem ser analisados no desenvolvimento deste tipo de estrutura.

As nanopartículas foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula por difração de laser (Malvern® 2000 Mastersizer, Malvern Instruments, Reino Unido). Os valores de diâmetro são expressos como:

- $D[4,3]$ , que corresponde ao valor médio de diâmetro da esfera equivalente (Equação 2);

$$D[4,3] = \frac{\sum d^4}{\sum d^3} \quad (2)$$

- $d(0,1)$ : tamanho que abrange 10% das partículas de menor tamanho sob a curva de distribuição;
- $d(0,5)$ : tamanho que representa a mediana da curva de distribuição de tamanhos;
- $d(0,9)$ : tamanho que abrange 90% da curva de distribuição.

A distribuição de tamanho é expressa pelo valor de Span, calculado conforme a Equação 3.

$$Span = \frac{D_{0,9} - D_{0,1}}{D_{0,5}} \quad (3)$$

Os resultados foram obtidos através da média de três determinações.

O potencial zeta da nanoemulsão foi determinado pela análise da mobilidade eletroforética em equipamento Zetasizer®. As análises foram realizadas após diluição de 500 vezes (v:v) em solução de NaCl 10 mM, previamente filtrada através de membrana 0,45 µm. Para cada medida, foram realizadas 20 varreduras.

O pH foi determinado por potenciometria em potenciômetro previamente calibrado com solução tampão padrão de pH 4,0 e pH 7,0, ambas a 25°C, diretamente na nanoemulsão. As medidas foram lidas em triplicatas.

#### 4.2.1.6 Ensaios de teor e taxa de encapsulação

O ensaio de avaliação de teor de AzA foi realizado conforme metodologia já validada por Mansour e Ibrahim (2002). Foi realizada uma validação parcial do método conforme consta no Anexo A.

A quantificação do AzA foi realizada empregando-se cromatógrafo líquido de alta eficiência Perkin Elmer, com detector UV em 220 nm. Utilizou-se coluna Waters Nova Pak C18 4 µm (3,9 x 150 mm), volume de injeção de 20 µL e tempo de análise de 8 minutos. A fase móvel isocrática foi constituída de metanol:água (40:60 v/v) com 0,077% (p/v) de acetato de amônio. O pH da fase móvel foi ajustado a  $5,0 \pm 0,1$  com ácido acético 96%. O fluxo empregado foi de 0,8 mL/min.

O método foi parcialmente validado segundo a Resolução nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) e *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use* (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION - ICH, 1996) em termos de: linearidade, especificidade, precisão e exatidão (Anexo A).

O teor do fármaco foi determinado após a diluição da nanoemulsão até a concentração de 150 µg/mL com a solução da fase móvel. Esta solução foi submetida à agitação do tipo vórtex por 3 minutos.

Para determinar a taxa de encapsulação, o AzA livre (não-associado) foi avaliado no ultrafiltrado, pela técnica de ultrafiltração-centrifugação (Amicon® 10.000 MW, Millipore) em centrífuga, a 4.000 rpm por 5 minutos. A taxa de encapsulação foi calculada pela diferença entre a concentração total do fármaco e a concentração livre (encontrada no ultrafiltrado), conforme a Equação 4.

$$\text{Taxa de encapsulação\%} = \frac{C_{\text{total}} - C_{\text{ultrafiltrado}}}{C_{\text{total}}} \times 100 \quad (4)$$

#### 4.2.1.7 Avaliação morfológica da nanoemulsão

A morfologia da nanoemulsão foi avaliada através de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para tanto, a amostra foi diluída em etanol na proporção de 1:10 (nanoemulsão:etanol) e uma gota depositada sobre *grids* de cobre (400 *mesh*) com revestimento de formvar/carbono (Electron Microscopy Sciences). Após 1 minuto, o *grid* foi seco com papel filtro e foi adicionado acetato de uranila em solução aquosa (2%) como contraste negativo. A amostra foi mantida em dessecador à vácuo até a realização da análise, que foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS em microscópio eletrônico de transmissão operando a 80 Kv.

#### 4.2.1.8 Estudo de estabilidade das nanoemulsões

O teste de estabilidade preliminar foi realizado através do uso de centrífuga. A nanoemulsão foi submetida a 30 minutos de centrifugação a 3.000 rpm.

A nanoemulsão foi monitorada através dos parâmetros pH, teor e tamanho de partícula e Span durante um período de 30 dias, em câmara climática a 30°C e 65% de umidade e em geladeira a 4°C.

#### 4.2.1.9 Ensaio *in vitro* de inibição da tirosinase de cogumelo

Para avaliar a eficácia despigmentante da nanoemulsão desenvolvida, foi realizado um teste *in vitro* para avaliar a inibição da tirosinase de cogumelo, conforme descrito por Yoshimura e colaboradores (2005).

O ensaio de eficácia despigmentante com tirosinase de cogumelo se baseia na determinação colorimétrica da quantidade de DOPAchrome na presença e na ausência da nanoemulsão. O ensaio foi realizado incubando em placas de 96 poços 50 µL de L-tirosina, 90 µL de tampão fostato (0,1 M a pH 6,8), 10 µL de dimetilsulfóxido e 40 µL da solução amostra ou solução tampão, a 37°C por 5 minutos. Após, é adicionada 50 µL de solução tampão ou solução de tirosinase a

0,125 mg/mL. A quantidade de DOPAchrome foi determinada em 405nm em espectrofotômetro (Spectramax® M2E, Molecular Devices).

O resultado é dado pela porcentagem da inibição da tirosinase através da Equação 5:

$$(\%) \text{Inibição: } \left[ \frac{(A-B)}{A} \right] \times 100 \quad (5)$$

Onde:

*A* = diferença das absorbâncias da amostra controle entre as amostras com e sem tirosinase;

*B* = diferença das absorbâncias da substância teste com e sem tirosinase.

A inibição da tirosinase pela nanoemulsão foi avaliada em três concentrações diferentes: 1 mM, 5 mM, 10 mM e 15 mM. Nestas mesmas condições, também foi avaliada uma emulsão contendo o fármaco na sua forma livre, chamada de LAZA. Utilizou-se como controle positivo a substância arbutin nas concentrações de 1 mM, 5 mM e 10 mM.

A atividade inibitória das amostras foi expressa como a concentração que inibe 50% da atividade enzimática (IC<sub>50</sub>) e calculada através do software GraphPad Prism® 7.02.

#### 4.2.1.10 Ensaio de penetração e permeação cutânea *in vitro*

O estudo de permeação *in vitro* foi realizado utilizando pele de orelha de porcos como membrana biológica, em sistema de célula vertical de Franz automática (Microette Plus Multi-Group®, Hanson Research Corporation, Chatsworth, PA, USA). As amostras de pele foram obtidas de animais recém sacrificados (Frigorífico Ouro do Sul). Após a coleta, as amostras de pele foram limpas e secas, discos foram recortados na pele e suas espessuras determinadas com um medidor de espessura. Para realização dos experimentos foram utilizadas membranas com espessura média de 1,0 a 2,0 mm. Após a determinação da espessura de cada disco, o mesmo foi embalado de maneira individual em papel alumínio e congelado à -4°C até o momento de sua utilização.

O estudo foi conduzido em células de difusão vertical de *Franz*, possuindo compartimento receptor com capacidade em torno de 7,0 mL e uma área de difusão de 1,77 cm<sup>2</sup>. As determinações foram realizadas utilizando-se 5 repetições para cada formulação testada (n=5).

Para a determinação da escolha do meio receptor, testes preliminares com meios distintos foram realizados. Soluções supersaturadas com o fármaco em cada meio testado permaneceram em repouso por 24 horas e após foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi diluído e quantificado por CLAE conforme metodologia já descrita. A concentração de saturação do AzA foi determinada para garantir que a condição *sink* do experimento seja mantida. O meio escolhido consistiu em tampão fosfato pH 7,4 com 20% de etanol.

Para a determinação do meio extrator de AzA em pele de porco também foram testados meios distintos. Em tubo Falcon, pele de porco picada e a esta foi adicionada uma quantidade conhecida de AzA e, após 30 minutos da adição, o solvente proposto foi adicionado até totalizar 5,0 mL. As amostras foram submetidas a agitação do tipo vórtex por 2 minutos seguidas por 30 minutos em banho de ultrassom. Realizou-se filtração dos meios em seringa com filtro 0,45 µm e quantificação em CLAE conforme método já descrito. A solução extratora escolhida foi água ultrapura e metanol (60:40), com 0,077% de acetato de amônio com correção de pH a 5,0 utilizando ácido acético. Esta solução corresponde à fase móvel utilizada no método de doseamento por CLAE.

Para garantir a linearidade do método de quantificação de AzA em meio receptor e meio extrator, foram realizadas 3 curvas analíticas de AzA para cada meio. No meio receptor, as curvas foram realizadas nas concentrações de 35, 50, 65, 75 e 100 µg/mL. Já para o meio extrator, concentrações utilizadas foram de 20, 50, 75, 100 e 200 µg/mL.

Para a determinação da exatidão do método de quantificação de AzA a partir de pele de orelha de porco neste experimento, adicionou-se a pedaços de pele de orelha de porco uma quantidade conhecida de AzA, obtendo-se concentrações finais iguais a: 20, 75 e 200 µg/mL (respectivamente, uma concentração baixa, média e alta da curva-padrão). As amostras foram extraídas após 2 minutos de agitação do tipo vórtex e 30 minutos no banho de ultrassom. Procedeu-se com a filtragem em filtro de 0,45 µm e quantificação por CLAE. A partir da recuperação do ativo, se determinou a exatidão do método.

Para o experimento de permeação cutânea em célula de difusão de *Franz*, a membrana foi mantida em contato com uma solução receptora de tampão fosfato pH 7,4 e etanol (80:20) e regime de doses infinitas. A solução receptora foi selecionada através da determinação da sua concentração de saturação de AzA em diferentes meios, a fim de manter a condição *sink*. O meio receptor foi mantido sob agitação magnética, em banho aquecido a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  para que a temperatura na superfície da pele permanecesse em torno de  $32^\circ\text{C}$ .

As amostras foram pesadas ( $170 \text{ mg/cm}^2$ , o que corresponde a 3 mg de AzA) e aplicadas na pele, onde foram deixadas sob contato por 24 horas. O equipamento realizou coletas do meio receptor nos tempos 2, 5, 8, 10, 12, 20 e 24 horas que foram posteriormente submetidas à análise por CLAE, de acordo com as condições operacionais já utilizadas anteriormente (Anexo A).

O excesso de formulação na superfície da membrana foi removido com o auxílio de algodão. Para separar as camadas da pele, foram utilizadas as técnicas de *tape stripping* e separação por calor, conforme descrito a seguir.

#### 4.2.1.10.1 Retenção no estrato córneo (*tape stripping*)

As camadas do estrato córneo foram retiradas da pele com o auxílio de 18 pedaços de fita adesiva Scotch 3M, medindo 25x25 mm. As fitas foram colocadas em tubos Falcon para extração com 5 mL de solução extratora. Os tubos foram submetidos à agitação do tipo vórtex por 2 minutos e levados a banho de ultrassom por 30 minutos, para garantir a extração do fármaco. As amostras foram filtradas através de membrana com porosidade de  $0,45 \mu\text{m}$  e submetidas a doseamento conforme método descrito no item 4.2.1.6 e Anexo A.

#### 4.2.1.10.2 Retenção na epiderme e na derme (técnica de separação por calor)

Após a retirada do estrato córneo, a epiderme e a derme foram separadas. Para tal, a pele foi mantida em imersão em água ultrapura a  $55^\circ\text{C}$  por 45 segundos. A epiderme foi removida com o auxílio de um bisturi e colocada em tubos Falcon com 3 mL de solução extratora. A derme foi picotada e colocada em tubos Falcon com 5 mL. Todos os tubos foram submetidos a agitação do tipo vórtex por 2 minutos e submetidos a banho de ultrassom por 30 minutos. As amostras foram filtradas

através de membrana com porosidade de 0,45 µm e submetidas à doseamento conforme método previamente descrito.

Os resultados da permeação cutânea foram analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) e teste Tukey, considerando um nível de significância de 0,05. Os testes estatísticos foram realizados no programa GraphPad Prism® 7.02.

### 4.3 ENSAIO DE ANÁLISE SENSORIAL DA NANOEMULSÃO

O estudo de análise sensorial descritiva da NAzA foi realizado de acordo com a legislação brasileira com aprovação de Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) regulamentado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). O parecer contemplando a aprovação do projeto pelo CEP encontra-se no Anexo B.

#### 4.3.1 Análise sensorial descritiva

Para este tipo de análise, a literatura indica que se utilize um painel de 10 a 30 voluntários treinados (KORAĆ; KRAJIŠNIK; MILIĆ, 2016; PENSÉ-LHÉRITIER, 2008, 2015). O presente trabalho foi realizado com 16 painelistas.

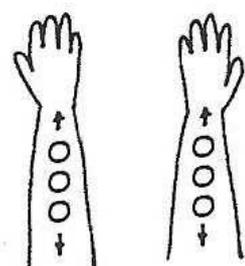
Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo C), os painelistas participaram de uma sessão de apresentação dos conceitos gerais de análise sensorial e detalhamento dos atributos sensoriais. Para cada atributo sensorial que seria avaliado foram apresentados os respectivos padrões de nenhuma intensidade e de grande intensidade. Os participantes aplicaram os padrões nos antebraços. O Quadro 1 reúne os atributos, suas definições e padrões. Os padrões foram selecionados de acordo com o guia E 1490 - 03 da *American Society of Testing and Materials* (ASTM) (2003).

Atributo	Definição	Padrão Nenhuma intensidade	Padrão Grande intensidade
Espalhabilidade	Facilidade de movimentação do produto sobre a pele	Lanolina	Dimeticona
Espessura	Quantidade de produto percebida entre o dedo e a pele	Álcool isopropílico	Petrolato
Resíduo branco	Grau de esbranquiçamento do produto enquanto é feita a aplicação	Óleo mineral	Solução de TEALS*
Brilho	Quantidade ou grau de luz refletida na pele	Amido de milho	Pigmento tímica
Pegajosidade	Intensidade com que o dedo se adere a pele	Pele sem nada	Lanolina
Oleosidade	Sensação de óleo sobre a pele	Pele sem nada	Óleo mineral

**Quadro 1 – Atributos e padrões utilizados no treinamento do painel sensorial \*solução de Lauril Sulfato de Trietanolamina a 5% (v/v)**

Fonte: adaptado de ASTM (2003).

O estudo foi realizado em uma sala climatizada, com temperatura na faixa de 22 a 25 °C, específica para realização de análise sensorial, no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da UFRGS. Os voluntários lavaram os antebraços com uma solução de lauril sulfato de sódio a 5% e após esta higienização e a secagem dos antebraços, cada voluntário recebeu 0,05 g de cada amostra para aplicar com os dedos (um dedo diferente para cada amostra) em sítios circulares de 51 mm de diâmetro. Os sítios devem estar 3 dedos distantes dos pulsos e dos cotovelos, conforme demonstra a Figura 5.



**Figura 5 – Sítios circulares nos antebraços**

Fonte: adaptado de ASTM (2011).

Cada amostra possuía códigos randomizados de três dígitos, com o objetivo de não possibilitar a identificação das mesmas. Além da formulação NAZA, também foi avaliada uma formulação com o medicamento de referência contendo o ativo livre (Azelan® creme), para fins de comparação. As amostras foram avaliadas em triplicata.

A quantidade a ser aplicada foi previamente pesada pelos pesquisadores e entregue aos voluntários em embalagens unitárias. Foi instruído que os mesmos aplicassem toda a quantidade presente na embalagem. Os produtos foram aplicados pelos próprios voluntários em rotações, durante o tempo de 1 minuto, obedecendo ao ritmo de um metrônomo na velocidade de 60 pulsos por minuto. O início e fim do tempo de aplicação foram controlados pelos pesquisadores.

Os voluntários avaliaram os atributos espalhabilidade, espessura, resíduo branco, brilho, pegajosidade e oleosidade durante e logo após a aplicação das amostras. Após 10 minutos da aplicação, foram reavaliaram os atributos residuais de brilho, pegajosidade e oleosidade.

Para avaliação das amostras foram utilizadas escalas lineares de 10 cm com referências nas extremidades para pouco/nada e muita intensidade (Anexo D). As marcações nas escalas foram medidas com régua e transcritas digitalmente. Os dados foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 95% e, assim, não há diferença estatística entre os valores quando o valor-P foi maior que 0,05.

#### 4.4 DESCARTE DE RESÍDUOS

O descarte de resíduos químicos seguiu procedimento padrão realizado pela Faculdade de Farmácia – UFRGS, no qual os resíduos gerados foram devidamente rotulados e entregues à Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho (COSAT) desta Faculdade, que é responsável pelo envio dos resíduos ao Instituto de Química da UFRGS, onde são realizados os procedimentos adequados de reciclagem e/ou descarte do material químico.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DESENVOLVIMENTO DA NANOEMULSÃO CONTENDO ÁCIDO AZELAICO

O primeiro passo para o desenvolvimento da nanoemulsão foi verificar o EHL requerido do óleo de arroz a fim de garantir a escolha correta das concentrações de uso dos tensoativos escolhidos – poloxamer 407 e monooleato de sorbitano.

O EHL requerido para o óleo de arroz foi determinado experimentalmente e os resultados encontram-se na Tabela 5. Nas amostras 1, 5, 6 e 7 foi observado o fenômeno de coalescência enquanto nas amostras 2 e 4 foi observada cremagem. Sendo assim, o valor de EHL requerido para o óleo de arroz foi de 8.

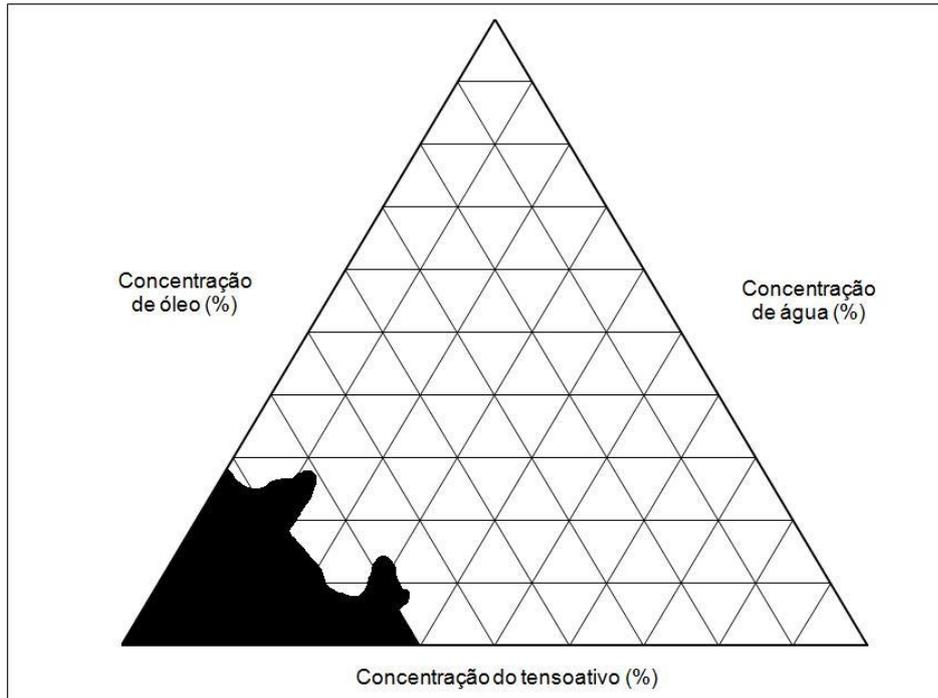
**Tabela 5 – Amostras utilizadas para determinação do EHL requerido do óleo de arroz**

<b>Amostra</b>	<b>EHL</b>	<b>Avaliação Macroscópica</b>
1	4,3	Coalescência
2	6	Cremagem
3	8	Homogêneo
4	10	Cremagem
5	12	Coalescência
6	14	Coalescência
7	15	Coalescência

A partir deste valor, consegue-se estabelecer a concentração mais adequada dos insumos do sistema tensoativo (poloxamer 407 e monooleato de sorbitano) e garantir a estabilidade da emulsão proposta.

Desta maneira, foi possível a construção de um diagrama pseudo-ternário de fases. O diagrama é uma ferramenta bastante útil para determinar os limites da região de formação da nanoemulsão e, assim, demonstrando as melhores concentrações de água, óleo e sistema tensoativo. Com isto, consegue-se prever uma formulação mais estável (PATEL; VAVIA, 2007).

Conforme a Figura 6, verifica-se a área mais propícia à formação de nanoemulsão.



**Figura 6 – Diagrama de Fases: a área escura corresponde à área de formação de nanoemulsão**

Considerando o resultado do diagrama, foi escolhido um ponto no meio da área de formação de nanoemulsão que corresponde a 10% de óleo de arroz, 10% de Smix e 80% de água. Com estes valores, foi proposta uma formulação para continuar os estudos, contendo o fármaco e demais componentes, conforme já descrito na Tabela 3.

## 5.2 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO DA NANOEMULSÃO

De acordo com a Farmacopéia Brasileira (2010), “o índice de refração ( $n$ ) de uma substância é a relação entre a velocidade da luz no vácuo e sua velocidade na substância”.

O índice de refração é um dado de extrema relevância quando o tamanho de partícula de uma nanoestrutura é analisado pela técnica de difração de laser. Ele informa aonde a intensidade da luz não chega por difração mas sim por refração. Sendo assim, é necessário saber o correto índice da amostra para ter um resultado confiável na análise de tamanho de partícula por difração de laser (KECK; MÜLLER, 2008).

A nanoemulsão contendo AzA (NAZA) foi analisada em um refratômetro de bancada do tipo ABBE, com leitura na escala do índice de refatividade e obteve um índice de refração de 1,377. A análise foi realizada em triplicata.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA NANOEMULSÃO

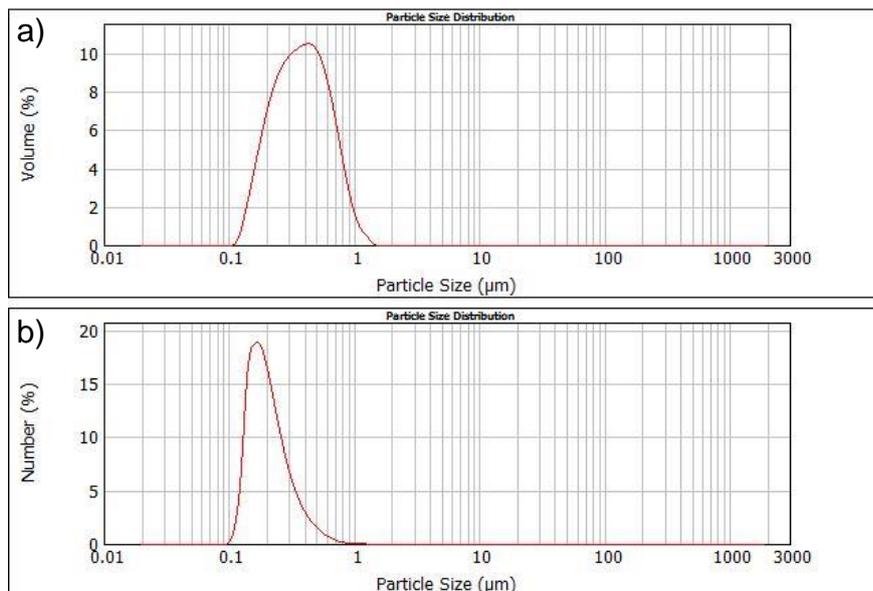
Os resultados obtidos na caracterização físico-química da NAzA se encontram na Tabela 6.

**Tabela 6 – Características físico-químicas da NAzA (n=3, média ± dp)**

Parâmetro	Resultado
Teor (%)	101,10 ± 7,37
D[4,3] por volume (nm)	419 ± 23
D[4,3] por número (nm)	417 ± 23
Span por volume	1,406 ± 0,04
Span por número	1,06 ± 0,22
Potencial Zeta (mV)	-10,9 ± 0,44
pH	5,01 ± 0,01

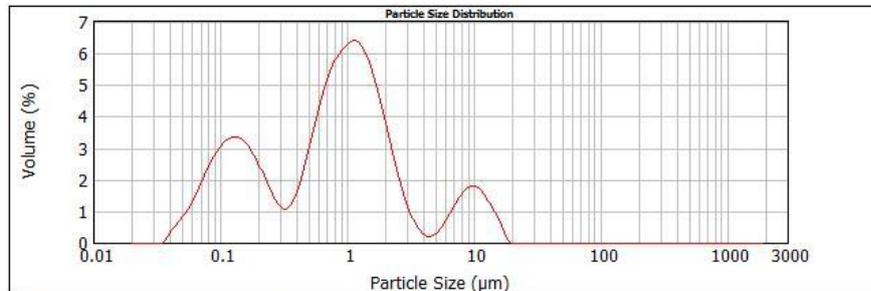
As nanoemulsões são dispersões finas óleo-em-água, com gotículas entre 100 e 600 nm (BOUCHEMAL et al., 2004). A NAzA apresentou distribuição monomodal e tamanho de partícula por volume de  $419 \pm 23$  nm e por número  $417 \pm 23$  nm.

A Figura 7 apresenta a média do resultado da análise de tamanho de partícula pela técnica de difração de laser, tanto por volume como por número.



**Figura 7 – Distribuição do tamanho de partículas das nanoemulsões analisadas por difração de laser tanto por volume (a) como por número (b)**

Para verificar que a LAZA não possui tamanho nanométrico, ela também teve seu tamanho de partícula avaliado pela técnica de difração de laser, por volume (Figura 8).



**Figura 8 – Distribuição do tamanho de partícula da LAZA analisada por difração de laser, por volume**

O potencial zeta da NAZA foi de  $-10,9 \pm 0,44$  mV. A literatura indica que quanto maior o valor em módulo do potencial zeta maior seria a estabilidade das formulações (LEGRAND et al., 1999). Entretanto, de acordo com Barradas e colaboradores (2015), tensoativos não-iônicos, como o poloxamer 407 e o monooleato de sorbitano, tendem a diminuir o valor em módulo do potencial zeta e nestes sistemas a estabilização do sistema pode se dar por estabilização estérica ao invés de estabilização eletrostática.

O pH adequado para preparações farmacêuticas de uso tópico varia de 4,5 a 7,5 (DAUDT et al., 2015), sendo assim o ajuste de pH realizado durante a fabricação da nanoemulsão NAZA permite o pH ideal de uso e concomitantemente garante a solubilização do AzA na formulação. Na maioria dos produtos comercializados, o AzA se apresenta como um sólido em suspensão e não está solubilizado (LI et al., 2010, 2012; MA et al., 2015). Li e colaboradores (2012) demonstraram que em uma formulação onde o AzA se encontra solubilizado o grau de penetração e retenção cutânea são maiores quando comparados com a forma suspensa.

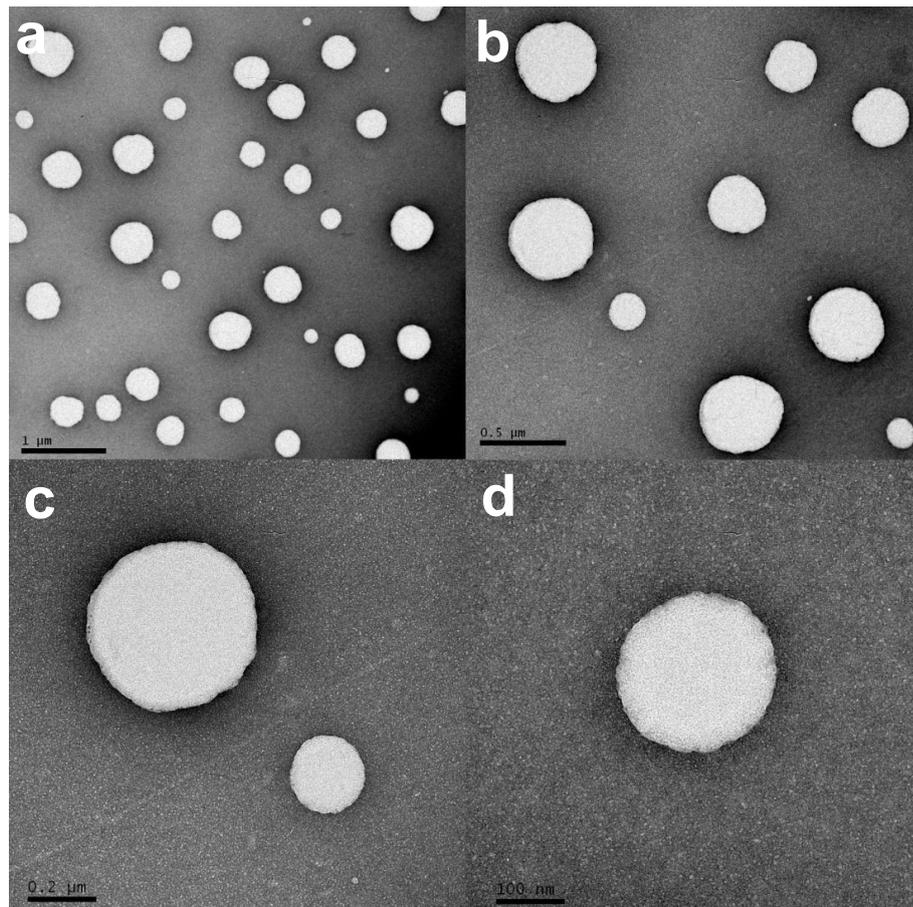
#### 5.4 ENSAIO DE TEOR E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

O teor do fármaco encontrado na formulação foi de  $101,10 \pm 7,37\%$ , demonstrando que não houve perda do fármaco durante o processo de fabricação da nanoemulsão.

A eficiência de encapsulação foi de 84,65%. Este valor é considerado satisfatório visto que a concentração teórica utilizada de AzA é bastante alta (10 mg/mL) para este tipo de sistema. Este valor foi maior do que o encontrado por Reis e colaboradores (2013) que foi de  $76,27 \pm 3,81\%$ ; entretanto o autor avaliou nanopartículas poliméricas ao invés de nanoemulsão.

### 5.5 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA NANOEMULSÃO

A Figura 9 mostra as fotomicrografias obtidas a partir da nanoemulsão contendo 10 mg/mL de AzA (NAzA). Observa-se a presença de estruturas esféricas condizentes com a aparência usual de nanoemulsões óleo-em-água, com baixa polidispersão do sistema.



**Figura 9 – Fotomicrografias obtidas por MET da nanoemulsão contendo 10 mg/mL de AzA, em diferentes aumentos (a: 25.000 X, b: 50.000 X, c: 100.000 X e d: 200.000 X)**

## 5.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE DA NANOEMULSÃO (NAZA)

A formulação NAZA se mostrou estável através do teste de centrifugação visto que não foram observadas alterações macroscópicas na formulação, conforme pode ser visualizado na Figura 10.



Figura 10 – NAZA após teste de centrifugação (3.000 rpm por 30 minutos)

A Tabela 7 compila os dados monitorados na avaliação da estabilidade da formulação NAZA.

Tabela 7 – Avaliação da estabilidade da nanoemulsão NAZA

Condição	Amostra	Teor (%)	Tamanho de partícula (nm)	Span	pH	Avaliação macroscópica
	0 dias	101,10 ± 7,37	419 ± 23	1,41 ± 0,04	5,01 ± 0,01	Nanoemulsão esbranquiçada
30°C a 65%	30 dias	92,35 ± 3,01	418 ± 23	1,26 ± 0,13	4,98 ± 0,02	Nanoemulsão esbranquiçada
4°C	30 dias	84,92 ± 1,74	1996 ± 367	8,31 ± 4,31	4,95 ± 0,01	Nanoemulsão amarelada

Verifica-se que quando armazenada a 4°C, a NAZA perde suas características nanométricas e o teor de AzA é diminuído consideravelmente. O fenômeno que mais desestabiliza nanoemulsões é o amadurecimento de Ostwald, entretanto, neste fenômeno a solubilidade da fase dispersa e a difusão aumentam em temperaturas mais altas, acelerando o amadurecimento (LERCHE; SOBISCH, 2011). Portanto, as alterações verificadas na armazenagem a 4°C provavelmente não são causadas por este fenômeno.

Uma hipótese para a ocorrência destas mudanças se baseia no fato de que, segundo o laudo do fabricante (Irgovel Indústria Rio Grandense de Óleo Vegetais

Ltda), o óleo de arroz utilizado possui em sua composição diversos ácidos graxos, sendo o ácido oleico o composto majoritário (34 a 42% - Anexo E). De acordo com dados do SciFinder (2017), o ponto de fusão do ácido oleico é de 16,3°C. Assim, este ácido graxo solidifica em temperaturas mais baixas. Como o óleo de arroz está presente no núcleo oleoso das partículas da nanoemulsão, acredita-se que após a solidificação do ácido oleico o tamanho das partículas pode ter aumentado.

## 5.7 ENSAIO *IN VITRO* DA INIBIÇÃO DE TIROSINASE DE COGUMELO

O ensaio da inibição de tirosinase é baseado na determinação colorimétrica de DOPAchrome quando em presença da enzima tirosinase e da amostra testada. Este experimento é amplamente utilizado para avaliar a eficácia despigmentante de substâncias (KOBAYASHI et al., 1995; JO et al., 2012; LEE et al., 2002; REBOLLEDA et al., 2015; YOSHIMURA et al., 2005).

Como controle frente à nanoestrutura, utilizou-se a emulsão contendo AzA na sua forma livre LAZA, a fim de descartar qualquer influência dos excipientes no experimento. Como controle positivo foi utilizado o ativo arbutin, que é conhecido por sua ação inibitória da tirosinase (DESMEDT et al., 2016).

A Tabela 8 apresenta os valores de IC<sub>50</sub> para a NAZA, para a emulsão contendo o fármaco na sua forma livre e a para o arbutin, calculados através dos dados de três experimentos utilizando o software GraphPad Prism® 7.0.

**Tabela 8 – Resultados do IC<sub>50</sub> calculados a partir da inibição da tirosinase**

<b>Amostra</b>	<b>IC<sub>50</sub> (mM)</b>
NAZA	13,97
LAZA	52,74
Arbutin	42,85

Foi verificado que a NAZA teve um IC<sub>50</sub> menor que o do produto com fármaco livre (LAZA), demonstrando ter um maior potencial de inibição da tirosinase. Além disso, a nanoemulsão se mostrou também mais eficaz que o próprio controle positivo (arbutin), evidenciando ainda mais o quanto a NAZA é promissora para uso como agente despigmentante.

Este ensaio é considerado um ensaio de eficácia preliminar, entretanto já pode ser verificado que a nanoemulsão permitiu um aumento na capacidade de

inibição da tirosinase. Mesmo assim, para poder entender o efeito do tamanho da partícula na entrega do fármaco na pele, é necessário realizar o estudo de penetração e permeação cutânea *in vitro*.

## 5.8 ENSAIO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

A impermeabilidade relativa da pele é um obstáculo para a absorção de fármacos aplicados topicamente considerando que somente uma pequena porcentagem dos mesmos chega ao seu destino após a aplicação na pele (CONTRI et al., 2011a). A absorção percutânea/dérmica pode ser definida como o termo que descreve o transporte de substâncias da parte externa da pele até a circulação sistêmica. Geralmente ela é dividida em penetração, permeação e resorção. A permeação cutânea se caracteriza pela entrada de uma substância em uma camada ou estrutura particular da pele, enquanto a permeação é o transporte de uma camada até outra, que possui estruturas e funções diferentes. A resorção é a passagem de uma substância através da pele, linfa e sistema vascular e, na maioria dos casos, resulta em uma absorção sistêmica desta substância (CONTRI et al., 2011b; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

O ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar a diferença no comportamento de penetração/permeação do AzA em sua forma livre (LAzA), na forma de nanoemulsão (NAzA) e na forma de nanoemulsão sem o insumo AH. O AH é um polissacarídeo aniônico encontrado naturalmente na matriz extracelular de certos tecidos. O AH pode hidratar o estrato córneo, abrindo rotas de penetração e, com isto, facilitar o transporte transdérmico. Além disto, os receptores de AH são altamente expressados nos queratinócitos da epiderme e fibroblastos da derme (HAN et al., 2015; JUNG et al., 2014). Atrux-Tallau e colaboradores (2014) realizaram um estudo que analisou a utilização de ligantes auto-organizáveis em nanoemulsões. Foi possível verificar que a nanoemulsão contendo como ligante o AH reduziu significativamente a síntese de melanina. Já que nenhum dos sítios receptores do AH parece ter envolvimento na melanogênese, o autor concluiu que o ligante de AH não afetou o conteúdo de melanina, mas melhorou a atividade da nanoemulsão, aumentando a interação com os melanócitos. Por isto, a utilização de AH se mostra interessante para o presente trabalho, pois pode melhorar a eficácia despigmentante do AzA através do aumento da interação com os melanócitos.

Uma das vantagens do ensaio de permeação cutânea é permitir a utilização da pele de porco como membrana biológica devido às suas similaridades com a pele humana em termos de morfologia e permeabilidade, ao contrário da pele de ratos, que possui menos camadas no estrato córneo e por isto é mais permeável que a pele humana (CONTRI et al., 2011a; GODIN; TOUITOU, 2007; LI et al., 2012; OECD, 2004). Apesar da maioria dos autores apoiarem o uso da pele de porco em estudos de permeação cutânea, alguns autores ainda levantam a hipótese de que a pele humana é menos permeável que a de porco, principalmente devido a diferenças como a orientação lipídica do estrato córneo e espessura da pele (PROW et al., 2011). Para este trabalho, optou-se por utilizar a pele da orelha de porco por ela ser considerada um resíduo, não sendo destinada ao consumo alimentar humano e, assim, geralmente é descartada pelos frigoríficos, o que gera uma grande facilidade de aquisição deste material (FERNANDEZ et al., 2000; WEISS-ANGELI, 2007). O uso deste tipo de pele é importante para ser usada como um primeiro modelo de avaliação das formulações propostas, entretanto, futuramente, seria de grande valia realizar, também, um experimento utilizando pele humana como membrana biológica.

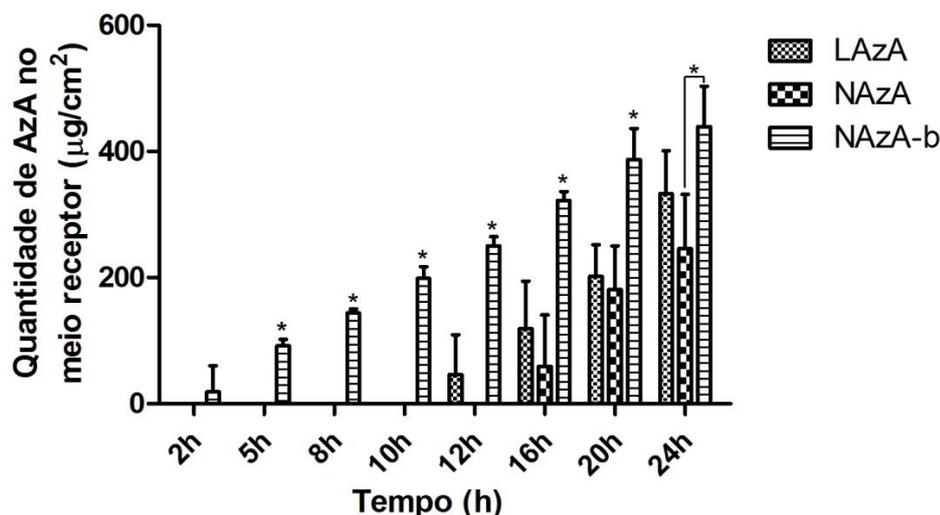
O método utilizado para extração de AzA em células de difusão de *Franz* se mostrou específico, sem picos interferentes de componentes da pele de orelha de porco na quantificação do fármaco.

A curva-padrão para o meio receptor apresentou coeficiente angular igual a 349,74, a intersecção no eixo y igual a -6578,7 e coeficiente de determinação de 0,995. A curva-padrão para o meio extrator apresentou coeficiente angular igual a 286,35, a intersecção no eixo y igual a -2291,4 e coeficiente de determinação de 0,995. A partir da recuperação do fármaco se determinou a exatidão da metodologia do método. Os valores apresentados na Tabela 9 demonstram os valores recuperados, em percentual, de AzA a partir de amostras de pele. Os resultados ficaram dentro dos intervalos permitidos (ICH, 1996).

**Tabela 9 – Avaliação da exatidão do método analítico para doseamento de AzA em pele de orelha de porco no experimento de permeação cutânea *in vitro* (n=3)**

Concentração teórica de AzA ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração experimental ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ DP	Exatidão (%)
20,00	20,85 $\pm$ 0,36	104,24
75,00	72,94 $\pm$ 5,04	97,25
200,00	199,25 $\pm$ 4,07	99,63

A Figura 11 relaciona a quantidade de AzA no meio receptor nos diferentes tempos de coleta, em  $\mu\text{g/cm}^2$ . A formulação NAZA-b apresenta uma permeação mais rápida do fármaco, já a partir de 2 h do início do experimento enquanto nas outras duas formulações o AzA foi detectado no meio receptor somente a partir de 12 horas e 16 horas (LAZA e NAZA, respectivamente). A formulação LAZA obteve quantidades de fármaco estatisticamente iguais à da NAZA-b nos pontos 2 horas e 24 horas, demonstrando que, apesar do comportamento de permeação ao longo do experimento ter sido diferente, ao final do ensaio a mesma quantidade de AzA foi detectada. Além disto, verifica-se que a formulação NAZA proporcionou uma liberação mais tardia do fármaco quando comparado com o LAZA, de 12 horas para 16 horas.



**Figura 11 – Quantidade de AzA no meio receptor em diferentes tempos de coleta, para a formulação LAZA, NAZA e NAZA-b (n=5)**

A Figura 12 demonstra a quantidade total de AzA retida na pele, em porcentagem. Verifica-se que a NAZA atingiu uma retenção cutânea de  $14,35 \pm 3,75\%$  enquanto a retenção da formulação sem ácido hialurônico (NAZA-b) foi de

8,66 ± 1,44% e a da LAZA foi de 6,77 ± 1,57%. Todos os valores são estatisticamente diferentes entre si, demonstrando que a presença do AH melhora a retenção cutânea do fármaco, corroborando o dado evidenciado por Atrux-Tallau e colaboradores (2014) de que o AH pode melhorar a interação de uma nanoemulsão com os melanócitos.

Através da mesma figura pode-se sugerir que, mesmo sem a presença do AH, a nanoemulsão consegue uma maior retenção cutânea de AzA quando comparado com o fármaco livre o que, provavelmente, se deve ao tamanho nanométrico da NAZA-b.

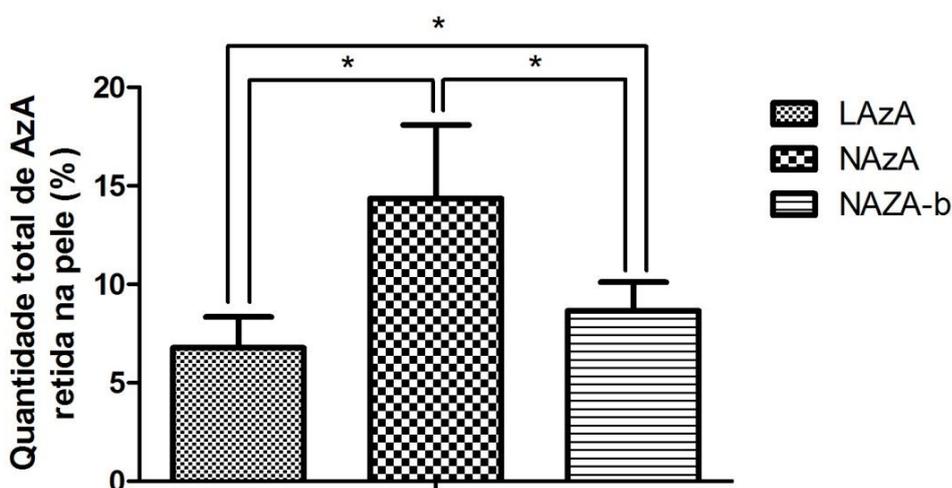


Figura 12 – Quantidade total de AzA retida na pele (estrato córneo, epiderme e derme), em porcentagem \*indica diferença estatística ( $p < 0,05$ )

Outro estudo que avaliou a permeação cutânea para o AzA, de autoria de Ma e colaboradores (2015), observou uma retenção cutânea total de AzA nas formulações testadas (creme comercial, gel contendo AzA e a microemulsão) de 3,41%, 4,47% e 11,87%, respectivamente. Li e colaboradores (2010) também avaliaram estes dados para duas formulações e obtiveram resultados de até 40% de retenção cutânea total, entretanto como membrana biológica foi utilizada pele de rato, que é mais permeável que a pele de porco (GODIN; TOUITOU, 2007). Apesar de terem utilizados parâmetros bem diferentes dos utilizados no presente trabalho (quantidade de AzA de 0,025 mg, pele humana como membrana e tempo de 6 horas), o estudo de Shah e colaboradores (2015) apresentou um maior acúmulo de

AzA no estrato córneo ao invés da epiderme viável e derme, enquanto a NAZA conseguiu atingir estas camadas mais profundas da pele.

O veículo de uma formulação de uso tópico é de extrema importância para atingir a eficácia terapêutica e, geralmente, o fármaco se torna mais biodisponível quando se encontra solubilizado na formulação do que quando em forma suspensa (LI et al., 2012). O veículo pode alterar o coeficiente de difusão de um fármaco ou a sua partição na pele. Conforme descrito no item 4.2.1.3, neste trabalho foi garantida a solubilização do AzA na nanoemulsão através do ajuste de pH. Provavelmente por causa deste fato, a retenção cutânea atingida com LAZA e NAZA foi maior do que a observada por Ma e colaboradores (2015). É importante ressaltar que a formulação com o ativo livre (LAZA) possui exatamente os mesmos excipientes que a nanoemulsão, a diferença entre elas é somente o processo de fabricação, como já descrito anteriormente.

A Figura 13 demonstra que todas as formulações conseguiram atingir as camadas mais profundas da pele e evidencia ainda mais a afinidade do AH pelos melanócitos já que é possível observar que há diferença estatística entre a NAZA e a NAZA-b na epiderme – local de síntese dos melanócitos.

Já no estrato córneo a quantidade de AzA não foi diferente estatisticamente. O “efeito nano” pode ser novamente verificado avaliando a quantidade de AzA na derme – não houve diferença entre as formulações nanométricas (NAZA e NAZA-b) porém entre NAZA e NAZA-b *versus* LAZA, a quantidade de fármaco na derme é estatisticamente menor.

Como no presente trabalho o AzA está sendo utilizado devido à sua propriedade despigmentante, este resultado se mostra significativo já que os melanócitos se encontram na camada mais profunda da epiderme viável e na sua junção com a derme (HABIF, 2012; NAIK; KALIA; GUY, 2000).

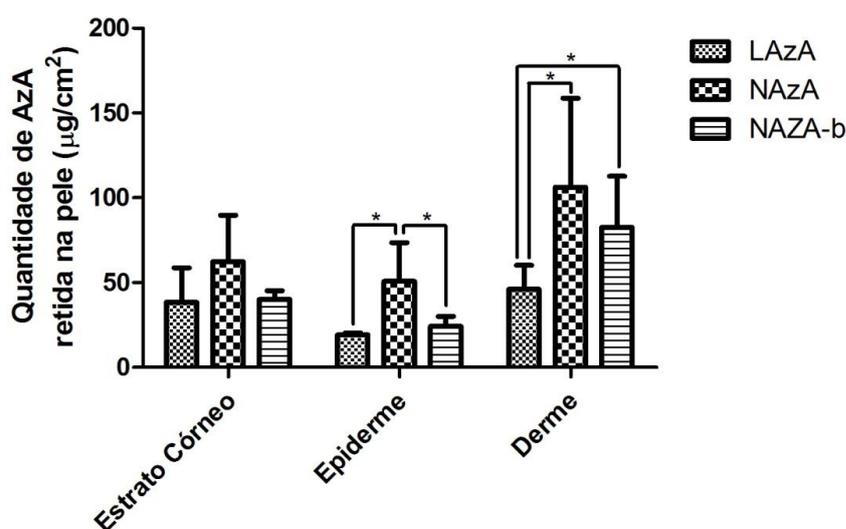


Figura 13 – Quantidade de AzA retido nas camadas da pele (n=5) \*indica diferença estatística ( $p < 0,05$ )

A melhora na retenção cutânea do fármaco nas formulações com AH pode ser explicada visto que o AH hidrata o estrato córneo, abrindo rotas de penetração e facilitando o transporte transdérmico de fármacos (JUNG et al., 2014). Além disto, o AH pode agir formando uma matriz mucoadesiva que pode reter o fármaco por mais tempo no seu sítio de ação, retardando a permeação e aumentando a interação com as células alvo (BROWN; JONES, 2005).

É sugerido pela literatura que fármacos lipofílicos possuem dificuldade em passar pela barreira cutânea e costumam ficar retidos no estrato córneo uma vez que a epiderme e a derme possuem características mais hidrofílicas (LUCCA et al., 2015). A quantidade de AzA retido na epiderme e na derme foram maiores para NAZA do que para a LAZA. É provável que este aumento de retenção cutânea nas camadas mais profundas da pele pela nanoestrutura se deva pelo fato de que nanoemulsões possuem um menor tamanho de partícula e uma alta área superficial, o que aumentaria a capacidade de penetração e/ou permeação na pele (CONTRI et al., 2011a; LUCCA et al., 2015).

Considerando o exposto, a presença do ácido hialurônico como excipiente na formulação da nanoemulsão se mostrou vantajosa visto que promoveu uma permeação mais lenta e prolongada do fármaco e conseguiu aumentar a retenção cutânea total do fármaco. Além disto, foi evidenciado que o tamanho nanométrico das formulações NAZA e NAZA-b proporcionou uma retenção cutânea mais significativa que o da amostra com o fármaco na sua forma livre (LAZA).

## 5.9 ANÁLISE SENSORIAL DESCRITIVA

Os resultados da análise sensorial descritiva podem ser verificados na Tabela 10, que descreve o valor médio de cada atributo, para a amostra NAzA e para amostra com o fármaco livre (LAZA), além da variância dos valores obtidos o valor de P calculado entre as amostras. O valor-P menor que 0,05 indica que houve diferença estatística entre os valores das amostras.

**Tabela 10 – Resultados da análise sensorial descritiva para NAzA e Azelan®**

Atributo	Amostra	Valor médio	Variância (%)	valor-P
Espalhabilidade	NAzA	8,34	2,72	2,09 x 10 <sup>-14*</sup>
	Azelan®	4,20	7,37	
Espessura	NAzA	2,61	6,77	2,83 x 10 <sup>-8*</sup>
	Azelan®	5,78	6,39	
Resíduo branco	NAzA	2,96	9,93	2,95x 10 <sup>-7*</sup>
	Azelan®	6,68	9,49	
Brilho	NAzA	3,87	9,03	0,06
	Azelan®	2,81	6,35	
Pegajosidade	NAzA	2,77	5,71	0,01*
	Azelan®	4,06	6,19	
Oleosidade	NAzA	3,30	5,87	0,052
	Azelan®	4,26	5,57	
Brilho residual	NAzA	4,26	8,74	3,06 x 10 <sup>-12*</sup>
	Azelan®	0,61	1,23	
Pegajosidade residual	NAzA	2,99	7,16	0,002*
	Azelan®	1,42	4,79	
Oleosidade residual	NAzA	3,39	9,54	5,56 x 10 <sup>-5*</sup>
	Azelan®	1,22	3,90	

\*indica diferença significativa entre as amostras

Através dos valores obtidos na Tabela 10, foi plotado um gráfico representando o perfil sensorial das amostras, conforme o Gráfico 1.



É interessante comentar que em todos os atributos considerados negativos (oleosidade, brilho, pegajosidade e os residuais), nos quais a NAZA obteve escores maiores que o Azelan<sup>®</sup>, os valores foram menores que 5. Ou seja, indicando que apesar de mesmo com escores maiores quando comparados com o Azelan<sup>®</sup>, os escores obtidos pela nanoemulsão são considerados baixos visto que não passaram da metade da escala. Entretanto, sugere-se que em uma futura reformulação da nanoemulsão, poderiam ser incluídos insumos capazes de modificar o sensorial, diminuindo a oleosidade, pegajosidade e brilho residuais.

Os dados provenientes da análise sensorial realizada podem preencher a lacuna resultante dos dados clínicos e de consumidores, podendo ser utilizados para prever ou interpretar estes últimos, podendo servir de guia no desenvolvimento de produtos (ALMEIDA; GAIO; BAHIA, 2008).

## 6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi possível desenvolver e caracterizar uma formulação nanotecnológica contendo AzA para fins terapêuticos, com maior enfoque no tratamento de distúrbios pigmentários da pele.

O desenvolvimento farmacotécnico permitiu a obtenção de uma formulação com tamanho nanométrico utilizando uma combinação de tensoativos inédita na literatura científica para a formação de nanoemulsão.

A formulação NAZA apresentou tamanho nanométrico com distribuição unimodal, teor total próximo a 100% e uma alta eficiência de encapsulamento considerando a alta carga de fármaco (10 mg/mL).

No ensaio *in vitro* de inibição da tirosinase, a formulação desenvolvida apresentou maior eficácia despigmente quando comparada à formulação com o fármaco em sua forma livre (LAZA) e até mesmo quando comparada com o controle positivo (arbutin).

O ensaio *in vitro* de permeação cutânea através de células de difusão de Franz evidenciou que a NAZA conseguiu atravessar o estrato córneo e atingir a localização do seu alvo terapêutico (melanócitos), que seriam as camadas mais profundas da pele (epiderme viável e derme), de forma mais eficaz que o fármaco na sua forma livre. Deste modo, a NAZA poderia ser utilizada até em melasma dérmico, que possui poucas opções de tratamento disponíveis no mercado. Além disto, foi demonstrado que a presença de ácido hialurônico na formulação permitiu uma maior interação com os melanócitos, aumentando a retenção cutânea do fármaco.

A análise sensorial descritiva forneceu dados sobre o perfil sensorial da NAZA, que foi comparado com um produto já disponível no mercado. A NAZA apresentou maior espalhabilidade e menor resíduo branco que o Azelan®, demonstrando que poderia ter um bom potencial de aceitação pelo mercado.

Sendo assim, sugere-se que a formulação desenvolvida possa ser utilizada como um possível tratamento despigmentante para doenças hiperpigmentárias da pele como, por exemplo, o melasma, inclusive o dérmico, uma vez que conseguiu atingir as camadas mais profundas da pele.

As perspectivas deste trabalho incluem a realização de estudo clínico em pacientes com melasma (projeto que já se encontra aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o número CAAE 57563016.0.0000.5335) e o estudo de

desenvolvimento de formulações com associação de ativos despigmentantes nanoencapsulados visando o aumento da eficácia no tratamento do melasma dérmico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 35, de 07 de agosto de 2015. Métodos alternativos de experimentação animal. **Diário oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 ago. 2015.

ALMEIDA, I. F.; GAIO, A. R.; BAHIA, M. F. Hedonic and descriptive skinfeel analysis of two oleogels: comparison with other topical formulations. **J Sens Stud**, v. 23, p. 92-113, 2008.

ALVAREZ-ROMAN, R. et al. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **J Controlled Release**, v. 99, p. 53-62, 2004.

ALVES, M. P. et al. Human skin penetration and distribution of nimeluside from hydrophilic gels containing nanocarriers. **Int J Pharm**, v. 341, p. 215-220, 2007.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard Practice for Descriptive Skinfeel Analysis of Creams and Lotions**. ASTM E 1490 - 03. Philadelphia: 2003. 16 p.

ANCONI, G. L.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Avaliação da estabilidade física e performance de formulações cosméticas contendo diferentes peptídeos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE COSMETOLOGIA, 21., 2007, São Paulo, SP.

ATRUX-TALLAU, N. et al. Quantitative analysis of ligand effects on bioefficacy of nanoemulsion encapsulating depigmenting active. **Colloids Surf B**, v. 122, p. 390-395, 2014.

AYTEKIN, M. et al. Formulation and characterization of liquid crystal systems containing azelaic acid for topical delivery. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 39, n. 2, p. 228-239, 2013.

BALI, V.; ALI, M.; ALI, J. Study of surfactant combinations and development of a novel nanoemulsion for minimizing variations in bioavailability of ezetimibe. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 76, p. 410-420, 2010.

BANDYOPADHYAY, D. Topical treatment of melasma. **Indian J Dermatol**, v. 54, p. 303-309, 2009.

BARRADAS, T. N. et al. Development and characterization of promising o/w nanoemulsions containing sweet fennel essential oil and non-ionic surfactants. **Colloids Surf A**, v. 480, p. 214-221, 2015.

BARTOSOVA, L.; BAJGAR, J. Transdermal drug delivery *in vitro* using diffusion cells. **Curr Med Chem**, v. 19, n. 27, p. 4671-4677, 2012.

BERGENSTÅHL, B. Physicochemical aspects of an emulsifier functionality. In: HASENHUETTI, G. L.; HARTEL, R. W. **Food Emulsifiers and Their Applications**. New York, NY, USA: Springer, 2008. p. 173-194.

BERNARDI, D.S. et al. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. **J Nanobiotech**, v. 9, p. 1-9, 2011.

BILLANY, M. Soluções. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. p. 318-329.

BOLANCA, I. et al. Chloasma – the mask of pregnancy. **Coll Antropol**, v. 32, p. 139-141, 2008.

BORBA, V. F. C.; SANTANA, D. P. Caracterização e uso de diagrama ternários como ferramenta de obtenção de sistemas tópicos microemulsionados. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPE, XV., 2007, Recife, PE. Disponível em: <[https://www.ufpe.br/conic/index.php?option=com\\_content&view=article&id=339&Itemid=243](https://www.ufpe.br/conic/index.php?option=com_content&view=article&id=339&Itemid=243)>. Acesso em: 20 fev. 2017.

BOUCHEMAL, K. et al. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **Int J Pharm**, v. 280, p. 241-251, 2004.

BROWN, M. B.; JONES, S. A. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 19, p. 308-318, 2005.

CESTARI, T. et al. Melasma in Latin America: options for therapy and treatment algorithm. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 23, p. 760-772, 2009.

CHANG, T. S. An updated review of tyrosinase inhibitors. **Int J Mol Sci**, v. 10, p. 2440-2475, 2009.

CHIEN, A. L. et al. Treatment of acne in pregnancy. **J Am Board Fam Med**, v. 29, n. 2, p. 254-262, 2016.

CHORILLI, M. et al. Avaliação sensorial de formulações fotoprotetoras contendo filtro solar de amplo espectro. **Lat Am J Pharm**, v. 28, n. 3, p. 383-392, 2009.

CODA, A. B. et al. Cathelicidin, kallikrein 5, and serine protease activity is inhibited during treatment of rosacea with azelaic acid 15% gel. **J Am Acad Dermatol**, v. 69, n. 4, p. 570-577, 2013.

CONTRI, R. V. et al. Transport of substances and nanoparticles across the skin and *in vitro* models to evaluate skin permeation and/or penetration. In: BECK, R.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. **Nanocosmetics and nanomedicines: new approaches for skin care**. Heidelberg: Springer verlag, 2011a. p. 3-35.

CONTRI, R. V. et al. Simultaneous control of capsaicin release from polymeric nanocapsules. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 11, p. 2398-2406, 2011b.

DAUDT, R. M. et al. Pinhão starch and coat extract as new natural cosmetic ingredients: Topical formulation stability and sensory analysis. **Carbohydr Polym**, v. 134, p. 573-580, 2015.

DESMEDT, B. et al. Overview of skin whitening agents with an insight into illegal cosmetic market in Europe. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 30, p. 943-950, 2016.

DRAELOS, Z.; KAYNE, A. Implications of azelaic acid's multiple mechanisms of action: therapeutic versatility. **J Am Acad Dermatol**, v. 58, n. 2, p. AB40, 2008.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. Brasília: Editora Fiocruz, 2010. v.1.

FDA – U.S. Food and Drug Administration. **Nanotechnology**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/Nanotechnology/default.htm>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

FERNANDEZ, C. et al. LC Analysis of benzophenone-3: II application to determination of in vitro and in vivo skin penetration from solvents, coarse and submicro emulsions. **J Pharm Biomed Anal**, v. 24, p. 155-165, 2000.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 59, p. 1152-1161, 2007.

GONÇALVES, G. M. S.; OLIVEIRA, P. L. Percepção sensorial de formulações de uso tópico contendo ou não extrato de própolis em associação com acetato de tocoferila. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE COSMETOLOGIA, 22., 2008, São Paulo, SP.

GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agents by HLB. **J Soc Cosmet Chem**, v. 1, p. 311-326, 1949.

GUPTA, A. Azelaic acid: an update. **J Am Acad Dermatol**, v. 52, n. 3, p. P14, 2005.

GUPTA, A. et al. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, v. 12, p. 2826-2841, 2016.

HABIF, T. P. **Dermatologia clínica**: guia colorido para diagnóstico e tratamento. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

HAN, H. S. et al. Bioreducible shell-cross-linked Hyaluronic Acid nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. **Biomacromolecules**, v. 16, p. 447-456, 2015.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. ICH Harmonized tripartite Guideline. **Validation of analytical Procedures**: Text and Methodology. United States of America, 1996. Disponível em: <[https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf)>. Acesso em: 20 fev. 2017.

JAEGER, A. et al. Physico-chemical characterization of nanocapsule polymeric wall using fluorescent benzazole probes. **Int J Pharm**, v. 338, p. 297-305, 2007.

JAMES, W. D.; BERGER, T.; ELSTON, D. **Andrew's Diseases of the Skin: Clinical Dermatology**. 12. ed. Philadelphia: Elsevier, 2016.

JO, Y. H. et al. Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of methanol extracts from *Magnolia denudata* and *Magnolia denudata* var. *purpurascens* flower. **Food Res Int**, v. 47, p. 197-200, 2012.

JUNG, H. S. et al. Enhancing the transdermal penetration of nanoconstructs: could hyaluronic acid be the key?. **Nanomedicine (Lond)**, v. 9, n. 6, p. 743-745, 2014.

KADUNC, B. V. et al. **Tratado de cirurgia dermatológica, cosmiatria e laser da sociedade brasileira de dermatologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **Eur J Dermatol**, v. 12, n. 4, p. 390-399, 2002.

KECK, C. M.; MÜLLER, R. H. Size analysis of submicron particles by laser diffractometry – 90% of the published measurements are false. **Int J Pharm**, v. 355, p. 150-163, 2008.

KOBAYASHI, Y. et al. Synthesis of Amino Acid Derivatives of Kojic Acid and Their Tyrosinase Inhibitory Activity. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 59, n. 9, p. 1745-1746, 1995.

KORAĆ., R., KRAJIŠNIK, D., MILIĆ, J. Sensory and instrumental characterization of fast inverting oil-in-water emulsion for cosmetic application. **Int J Cosmet Sci**, v. 38, p. 246-256, 2016.

KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C. et al. Influence of nanoencapsulation on the sensory properties of cosmetics formulations containing lipoic acid. **Int J Cosmet Sci**, v. 35, n. 1, p. 105-111, 2013.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2010. v. 1 e 2.

LEE, S. H. et al. Mulberroside F Isolated from the Leaves of *Morus alba* Inhibits Melanin Biosynthesis. **Biol Pharm Bull**, v. 25, n. 8, p. 1045-1048, 2002.

LEGRAND, P. et al. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: a review. **STP Pharma Sci**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.

LERCHE, D.; SOBISCH, T. Direct and accelerated characterization of formulation stability. **J Disper Sci**, v. 32, p. 1799-1811, 2011.

LI, N. et al. Effect of 1,4-cyclohexanediol on percutaneous absorption and penetration of azelaic acid. **Int J Pharm**, v. 387, p. 167-171, 2010.

LI, N. et al. Effect of ionization and vehicle on skin absorption and penetration of azelaic acid. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 38, n. 8, p. 985-994, 2012.

LOWE, N.J. et al. Azelaic acid 20% cream in the treatment of facial hyperpigmentation in darker-skinned patients. **Clin Ther**, v. 20, n. 5, p. 945-959, 1998.

LUCCA, L. G. et al. Determination of  $\beta$ -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. **J Pharm Biomed Anal**, v. 104, p. 144-148, 2015.

MA, H. et al. Improved percutaneous delivery of azelaic acid employing microemulsion as nanocarrier: formulation optimization, in vitro and in vivo evaluation. **RSC Adv**, v. 5, p. 28985-28995, 2015.

MANSOUR, A. M.; IBRAHIEM, M. M. Simultaneous determination of azelaic acid and benzoic acid in topical preparations by liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 55, n. 7, p. 435-437, 2002.

MARTENS, M. A philosophy for sensory science. **Food Qual Prefer**, v.10, p. 233-244, 1999.

MASTROFRANCESCO, A. et al. Azelaic acid modulates the inflammatory response in normal human keratinocytes through PPAR $\gamma$  activation. **Exp Dermatol**, v. 19, n. 9, p. 813-820, 2010.

MEILGAARD, M. C.; CIVILLE, G. V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press LCC, 1999. 387 p.

MORA-HUERTAS; C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **Int J Pharmac**, v. 385, p. 113-142, 2010.

NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. **Pharm Sci Technol Today**, v. 3, n. 9, p. 318-326, 2000.

NORONHA, R. L. F. et al. Perfil sensorial de emulsões para tratamento de pele: avaliação de protótipos e produtos de mercado. **Cosmetic & Toiletries**, v. 20, p. 115, 2008.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Skin absorption: *in vitro* method. **OECD Guideline for the testing of Chemicals**, n. 428, 2004.

OIRSCHOT, Q. E. A. V.; TOMLINS, K. I. Applying analytical sensory evaluation techniques, which translate qualitative perceptions to numerical data to research on development issues. In: CONFERENCE ON COMBINING QUALITATIVE AND QUANTITATIVE METHODS IN DEVELOPMENT RESEARCH, 1-2., 2002, Swansea. **Paper Centre for Development Studies**. Swansea: University of Wales, Centre for Development Studies, 2002. p. 1-30.

- PATEL, A. R.; VAVIA, P. R. Preparation and in vivo evaluation of SMEDDS (self-microemulsifying drug delivery system) containing fenofibrate. **AAPS J**, v. 9, n. 3, p. E344-E352, 2007.
- PATEL, H. R.; PATEL, R. P.; PATEL, M. M. Poloxamers: A pharmaceutical excipientes with therapeutic behaviors. **Int J Pharm Tech Res**, v. 1, n.2, p. 299-303, 2009.
- PARENTE, M. E.; GÁMBARO, A.; ARES, G. Sensory characterization of emollients. **J Sens Stud**, v. 23, p. 149-161, 2008.
- PENSÉ-LHÉRITIER, A. M. L'analyse sensorielle et l'univers cosmétique. **Actual Chim**, v. 323-324, p. 81-83, 2008.
- PENSÉ-LHÉRITIER, A. M. Recent developments in sensorial assessment of cosmetic products: a review. **Int J Cosmet Sci**, v. 37, p. 465-473, 2015.
- PROW, T. W. et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 63, p. 470-491, 2011.
- REBOLLEDA, S. et al. Formulation and characterisation of wheat bran oil-in-water nanoemulsions. **Food Chem**, v. 167, p. 16-23, 2015.
- REIS, C. P. et al. Development and evaluation of a novel topical treatment for acne with azelaic acid-loaded nanoparticles. **Microsc Microanal**, v. 19, p. 1141-1150, 2013.
- RENDON, M. I.; BARKOVIC, S. Clinical evaluation of a 4% Hydroquinone + 1% Retinol treatment regimen for improving melasma and photodamage in Fitzpatrick skin types III-VI. **J Drugs Dermatol**, v. 15, n. 11, p. 1435-1441, 2016.
- RIGO, L. A. et al. Influence of the type of vegetable oil on the drug release profile from lipid-core nanocapsules and *in vivo* genotoxicity study. **Pharm Dev Technol**, v. 19, n. 7, p. 789-798, 2014.
- SARKAR, R.; BHALLA, M.; KANWAR, A. J. A comparative study of 20% azelaic acid cream monotherapy versus a sequential therapy in the treatment of melasma in dark-skinned patients. **Dermatology**, v. 205, n. 3, p. 249-254, 2002.
- SCHALLREUTER, K. U. et al. Regulation of melanogenesis – controversies and new concepts. **Exp Dermatol**, v. 17, n. 5, p. 395-404, 2008.
- SCIFINDER. **Chemical Abstracts Services**. Disponível em: <<http://scifinder.cas.org>>. Acesso em: 18 fev. 2017.
- SHAFIQ, S. et al. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 66, p. 227-243, 2007.
- SHAH, S. M. et al. LeciPlex, invasomes, and liposomes: A skin penetration study. **Int J Pharm**, v. 490, p. 391-403, 2015.

SHARMA, G. et al. Microemulsions for oral delivery of insulin: Design, development and evaluation in streptozotocin induced diabetic rats. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 76, p. 159-169, 2010.

SHETH, V. M.; PANDYA, A. G. Melasma: A comprehensive update – part I. **J Am Acad Dermatol**, v. 65, n. 4, p. 689-697, 2011a.

SHETH, V. M.; PANDYA, A. G. Melasma: A comprehensive update – part II. **J Am Acad Dermatol**, v. 65, n. 4, p. 699-714, 2011b.

SOLANS, C. et al. Nano-emulsions. **Curr Opin Colloid Interface Sci**, v. 10, p. 102-110, 2005.

STEBBINS, W.; ALEXIS, A.; LEVITT, J. Cosmetic Acceptability of Six 40-50% Urea Preparations: A Single-Blind, Pilot Study. **Am J Clin Dermatol**, v. 9, n. 5, p. 319-322, 2008.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Adv Colloid Interface Sci**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.

THIBOUTOT, D.; THIEROFF-EKERDT, R.; GRAUPE, K. Efficacy and safety of azelaic acid (15%) gel as a new treatment for papulopustular rosacea: results from two vehicle-controlled, randomized phase III studies. **J Am Acad Dermatol**, v. 48, n. 6, p. 836-845, 2003.

TORCELLO-GÓMEZ, A. et al. Block copolymers at interfaces: Interactions with physiological media. **Adv Colloid Interface Sci**, v. 206, p. 414-427, 2014.

WEISS-ANGELI, V. **Desenvolvimento e caracterização de formulações fotoprotetoras contendo nanocápsulas**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Environmental Health Criteria 235: Dermal Absorption**, 2006. Disponível em:  
<<http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc235.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2017.

YOSHIMURA, M. et al. Inhibitory effect of an ellagic acid-rich pomegranate extract on tyrosinase activity and ultraviolet-induced pigmentation. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 69, n. 12, p. 2368-2373, 2005.

ZENG, X.; RUAN, D.; KOEHL, L. Intelligent sensory evaluation: Concepts, implementations and applications. **Math Comput Simulat**, v. 77, p. 443-452, 2008.



## **ANEXO A – Validação da metodologia analítica de quantificação de AzA em nanoemulsão**

A validação de um método analítico é realizada a fim de demonstrar que o método desenvolvido é apropriado para a determinação quantitativa de um fármaco. A validação parcial é definida como uma modificação no método bioanalítico validado sem a necessidade de uma revalidação total (ANVISA, 2003). Os ensaios de validação parcial vão desde uma pequena determinação, como, por exemplo, a exatidão e precisão do método.

O método utilizado para quantificação do AzA a partir da nanoemulsão foi desenvolvido e validado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detecção no UV. O método foi adaptado de Mansour e Ibrahiem (2002) e o único parâmetro alterado foi o fluxo (de 1,0 mL/min para 0,8 mL/min). Este mesmo método também foi utilizado por outros autores (AYTEKIN et al., 2013; LI et al., 2010, 2012; REIS et al., 2013, SHAH et al., 2015).

O cromatógrafo utilizado foi um Perkin Elmer, com detector UV em 220 nm. Utilizou-se coluna Waters Nova Pak C18 4 µm (3,9 x 150 mm), volume de injeção de 20 µL e tempo de análise de 8 minutos. A fase móvel isocrática foi constituída de metanol:água (40:60 v/v) com 0,077% (p/v) de acetato de amônio. O pH da fase móvel foi ajustado a  $5,0 \pm 0,1$  com ácido acético 96%. O fluxo empregado foi de 0,8 mL/min.

Foi preparada uma solução estoque contendo 1 mg/mL de AzA, a partir da qual foram tomadas alíquotas e diluídas na faixa de 50 a 310 µg/mL para a curva padrão.

A média do coeficiente de correlação ( $r^2$ ) referente às três curvas-padrão foi de 0,995, superior a 0,99, que é o valor preconizado pelos compêndios oficiais (ANVISA, 2003; ICH, 1996). A média do coeficiente angular foi de 407,2267 e da intersecção no eixo y foi igual a -6312,9.

O método se mostrou específico, sem picos interferentes de outros componentes da formulação na quantificação do fármaco.

A avaliação da precisão do método foi realizada através do coeficiente de variação intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (precisão intermediária). Para isto, 6 soluções-amostras diferentes de 150 µg/mL foram obtidas a partir da nanoemulsão de AzA e injetadas durante três dias. Foram determinados os coeficientes de

variação (CV) intra e inter-dia. Tanto na avaliação da precisão intra-dia quanto da inter-dia verifica-se uma variação na análise das amostras (Tabela 11), entretanto os valores estão dentro do limite preconizado pelos códigos oficiais, que é de 5% (ANVISA, 2003; ICH, 1996).

**Tabela 11 1– Avaliação dos coeficientes de variação (CV %) intra e inter-dia do método analítico para determinação de AzA em nanoemulsão (n=6)**

<b>Solução-amostra</b>	<b>Precisão intra-dia 1 (%)</b>	<b>Precisão intra-dia 2 (%)</b>	<b>Precisão intra-dia 3 (%)</b>	<b>Precisão inter-dia (%)</b>
Nanoemulsão contendo AzA 150 µg/mL	2,92	2,67	1,04	2,54

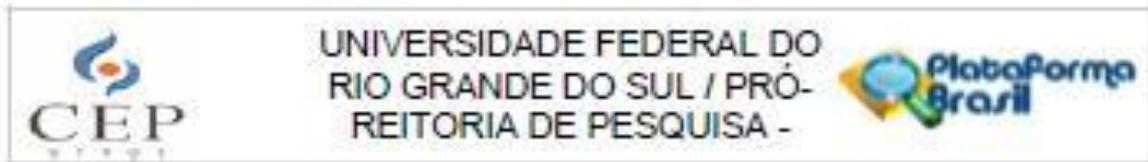
Para determinação da exatidão do método, uma quantidade conhecida de nanoemulsão foi adicionada a soluções de AzA nas concentrações de 85, 160 e 260 µg/mL (concentração baixa, média e alta da curva padrão, respectivamente). As amostras foram analisadas por CLAE e a partir das concentrações experimentais e das concentrações teóricas determinou-se a exatidão (Tabela 12).

**Tabela 12 – Avaliação da exatidão do método analítico para doseamento de AzA em nanoemulsão (n=3)**

<b>Concentração teórica de AzA (µg/mL)</b>	<b>Concentração experimental (µg/mL) ± DP</b>	<b>Exatidão (%)</b>
85,00	83,74 ± 0,77	98,52
160,00	160,37 ± 1,26	100,23
260,00	257,06 ± 1,52	98,86

Sendo assim, o método analítico de detecção de AzA em nanoemulsão por CLAE utilizado se mostrou específico, linear, preciso e exato, sendo adequado para as análises realizadas neste trabalho.

## ANEXO B – Parecer consubstanciado do comitê de ética em pesquisa



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação Sensorial de Nanoemulsão contendo Ácido Azelaico

**Pesquisador:** Irene Clèmes Kilkamp-Guerreiro

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 60706916.0.0000.5347

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.802.756

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se do projeto de pesquisa que tem como pesquisador responsável Irene C. Kilkamp Guerreiro, intitulado "AVALIAÇÃO SENSORIAL DE NANOEMULSÃO CONTENDO ÁCIDO AZELAICO" a ser executado de 11/2016 a 12/2016 e que pretende avaliar o sensorial de nanoemulsão contendo ácido azelaico em comparação com formulações contendo o fármaco na sua forma livre, utilizando análise sensorial descritiva, discriminativa e afetiva.

Como justificativa, os pesquisadores informam que "é de grande relevância analisar o sensorial das formulações e verificar a influência da nanoencapsulação no sensorial de formulações contendo ácido azelaico."

Foi apresentada uma fundamentação teórica bem estruturada, considerando aspectos relativos à análise sensorial e nanopartículas.

#### Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da pesquisa é avaliar o sensorial de nanoemulsão contendo ácido azelaico em comparação com formulações contendo o fármaco na sua forma livre, utilizando análise sensorial descritiva, discriminativa e afetiva.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
 Bairro: Farrowupilha CEP: 90.040-060  
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-  
REITORIA DE PESQUISA -



Continuação do Parecer: 1.802.758

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Como riscos, os pesquisadores informam que "os riscos para as análises são mínimos, se considerados os critérios de inclusão e exclusão. O tempo de contato dos produtos com a pele é de no máximo 60 minutos, e os produtos serão removidos da pele após os ensaios, minimizando ainda mais a ocorrência de reações adversas. As matérias-primas utilizadas nos produtos são aprovadas para uso pela ANVISA, o que comprova a segurança das mesmas. Podem ocorrer reações de uso tópico, como alergia e/ou sensibilização. Caso ocorra qualquer tipo de reação adversa durante o estudo, os voluntários serão instruídos a avisarem imediatamente aos pesquisadores e remover o produto com sabonete neutro. Caso seja necessário, o voluntário será assistido por um médico dermatologista, sob a responsabilidade dos pesquisadores, sem custo para os voluntários.

Como benefícios, os pesquisadores relatam que "os voluntários não irão receber nenhum tipo de benefício por participarem da pesquisa, como brindes, lanches, entre outros. Ainda, eles terão a possibilidade de utilizar produtos inovadores, formulados com insumos e tecnologia de ponta, e estará ajudando no desenvolvimento e aperfeiçoamento da ciência cosmética brasileira."

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

No que se refere ao tamanho amostral, os pesquisadores informam que serão selecionados 68 voluntários para o estudo de análise sensorial discriminativa e afetiva, considerando uma margem de erro de 10% e nível de confiança de 90%, conforme calculadora de Santos (2015) e, também, perto número amostral sugerido por Moskowitz (1997). Para análise sensorial descritiva serão selecionados 30 painelistas conforme sugerido na literatura (Pense-Lheritier, 2008).

Foram incluídos no projeto de pesquisa os critérios de inclusão e exclusão dos indivíduos.

Foi apresentado cartaz de recrutamento dos voluntários, com identificação do projeto, objetivos e forma de contato.

Para a análise sensorial será pedido o preenchimento de um questionário conforme explicado pelos pesquisadores no momento do convite. Para a análise sensorial descritiva, os painelistas receberão um treinamento com o objetivo de apresentá-los aos conceitos gerais sobre atributos sensoriais. Para cada atributo sensorial que será avaliado serão apresentados os respectivos

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
Bairro: Ferropilha CEP: 91.040-060  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4086 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-  
REITORIA DE PESQUISA -



Continuação do Parecer: 1.802.758

padrões.

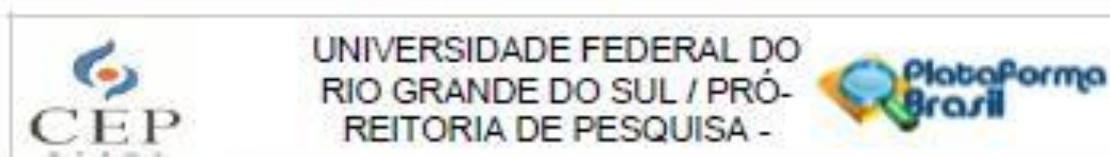
Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em uma sala climatizada, com temperatura na faixa de 22 a 25 °C, os voluntários lavam os antebraços com uma solução de lauril sulfato de sódio a 5%. Após a higienização e secagem dos antebraços, cada voluntário recebe 0,05 gramas de amostra para aplicar. Além da nanoemulsão de ácido azelaico, também será avaliada uma formulação com o ativo livre.

Na nova versão do projeto os pesquisadores esclarecem que cada voluntário irá avaliar os dois produtos, com fármaco nanoencapsulado e com o fármaco na sua forma livre. Ainda, que a formulação com o fármaco na sua forma livre que será avaliada é o produto Azelan® 200 mg/g, na apresentação creme, fabricado pela empresa Bayer S.A. A formulação da nanoemulsão será manipulada na Faculdade de Farmácia da UFRGS. A nanoemulsão possui em sua composição 1,00% de ácido azelaico, 1,00% de etanol, 10,00% de óleo de amoz, 6,57% de monooleato de sorbitano, 2,43% de poloxamer 407, 0,05% de butilhidroxitolueno, 0,05% de edetato dissódico, 0,40% de ácido hialurônico, 0,50% de fenoxietanol e caprill glicol, 78% de água ultrapura e o pH é ajustado com trietanolamina. Todos os insumos utilizados na formulação são devidamente aprovados para uso pela ANVISA. Ressalta-se, também, que a quantidade de fármaco utilizado na nanoemulsão é de 10 mg/g (1% p/p) e no Azelan® é de 200mg/g (20% p/p), ou seja, uma concentração 20 vezes menor do que este último. Neste caso, a possibilidade de ocorrência de reações adversas é ainda menor. Por se tratar ainda de aplicação única, com enxágue subsequente, considera-se que os riscos sejam ainda menores. Mesmo assim, os voluntários receberão atendimento médico caso ocorra alguma sensibilização individual, conforme descrito no projeto e no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Conforme solicitado, a formulação das amostras a serem testadas foram adicionadas à metodologia do projeto. (PENDÊNCIA ATENDIDA)

Na nova versão, foram apresentados instrumentos de coleta de dados que será utilizado em campo. (PENDÊNCIA ATENDIDA)

Embora os pesquisadores informam que todas as matérias-primas são aprovadas pela ANVISA, há possibilidade de efeitos adversos, inclusive previstos no TCLE ("caso haja algum incômodo, coceira e/ou irritação na pele durante as análises, o voluntário deverá parar imediatamente e lavar a região com água abundante e sabão neutro até remoção do produto por completo. Os responsáveis

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
Bairro: Farrowpilha CEP: 90.040-060  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4088 E-mail: elica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 1.802.758

acompanharão o voluntário e as medidas necessárias serão providenciadas. Caso seja necessário, o voluntário será ressarcido de possíveis gastos com tratamento médico em função de reações causadas comprovadamente pelo produto da pesquisa\*). Na nova versão, foi acrescentado Formulário de Evento Adverso. (PENDÊNCIA ATENDIDA)

Na segunda versão do projeto foi incluído o pesquisador Danié De Villa. (PENDÊNCIA ATENDIDA)

O cronograma está apresentado e já previsto para ser executado após aprovação pelo Sistema CEP/CONEP)

No que se refere ao orçamento e fonte de financiamento, o projeto informa em sua segunda versão que "todos os custos do projeto serão financiados pela pesquisadora responsável." (PENDÊNCIA ATENDIDA).

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram anexados Folha de Rosto, TCLE, o parecer da Comissão de Pesquisa e Projeto de Pesquisa Detalhado.

**Em relação ao TCLE (PENDÊNCIA ATENDIDA):**

-foi identificado nome do projeto específico

**Recomendações:**

Sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto de pesquisa encontra-se em condições de aprovação, de acordo com os aspectos éticos (CNS Resolução 466/12).

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_779956.pdf	26/10/2016 17:48:37		Aceito
Outros	cartaresposta.docx	26/10/2016	Simone Jacobus	Aceito

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
 Bairro: Ferrousilha CEP: 90.040-060  
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-  
REITORIA DE PESQUISA -



Continuação do Parecer: 1.902.758

Outros	cartaresposta.docx	17:48:15	Berlitz	Acelto
Outros	Ficha_discriminativaafetiva.docx	26/10/2016 17:47:43	Simone Jacobus Berlitz	Acelto
Outros	Ficha_descritiva.doc	26/10/2016 17:47:19	Simone Jacobus Berlitz	Acelto
Outros	Formulario_EA.docx	26/10/2016 17:46:47	Simone Jacobus Berlitz	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Sensorial_acazeiaico_UFRGS_v261020 11.docx	26/10/2016 17:46:11	Simone Jacobus Berlitz	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_sensorial_UFRGS.docx	26/10/2016 17:45:09	Simone Jacobus Berlitz	Acelto
Outros	IMG_8646.JPG	04/10/2016 14:51:33	Simone Jacobus Berlitz	Acelto
Outros	cartarecrutamento.docx	03/10/2016 10:44:18	Simone Jacobus Berlitz	Acelto
Folha de Rosto	FolhaRosto.pdf	15/09/2016 16:30:50	Simone Jacobus Berlitz	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 03 de Novembro de 2016

Assinado por:  
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA  
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 de Retoria - Campus Centro  
Bairro: Ferropolis CEP: 90.040-060  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



## ANEXO C - Termo de consentimento livre e esclarecido



### AVALIAÇÃO SENSORIAL DE NANOEMULSÃO CONTENDO ÁCIDO AZELÁICO

**Justificativa:** A análise sensorial se faz necessária para comprovação das propriedades da nova formulação proposta e é importante para avaliação de potencialidade de futuros consumidores, preferência e aceitação do produto.

**Objetivo:** Analisar o sensorial de duas formulações, uma com e outra sem um fármaco nanotecnológico, perceber se há diferença entre tais formulações e citar qual julga mais agradável.

**Para participar da pesquisa preciso (critérios de inclusão):** ser maior de 18 anos, ser consumidor de produtos farmacêuticos de uso tópico e conhecer o objetivo da pesquisa.

**Não posso participar da pesquisa caso (critérios de exclusão):** minha idade não esteja dentro da faixa estabelecida, já apresentei alergia a algum dos componentes da formulação, seja fumante e/ou gestante.

**Quanto tempo que terei de ficar disponível e quantas sessões serão necessárias:** A análise sensorial terá uma sessão de 60 minutos aproximados. Será necessária apenas uma sessão.

**Detalhes sobre todos os procedimentos:** Inicialmente os pesquisadores do projeto irão abordá-lo apresentando o projeto, os objetivos e procedimentos, conforme convite prévio. Se você aceitar participar da pesquisa e atender os critérios de inclusão, assinará este documento e em seguida participará da análise. Todos participantes analisarão amostras contendo o ativo, não havendo amostras placebo e todos analisarão a amostra controle, que é considerada a amostra com o ativo na sua forma livre.

**Local onde será realizado:** O local de avaliação dos produtos será na Faculdade de Farmácia da UFRGS ou no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS. A fim de minimizar as interferências dos distintos locais nas avaliações, será respeitado que o grupo de avaliação de cada produto utilize o mesmo local. O ressarcimento dos custos de deslocamento não será necessário pois o grupo de voluntários será composto da população local e/ou transeuntes.

**Equipamentos ou instrumentos que serão utilizados:** Durante a realização da análise sensorial, serão utilizados como ferramenta metrônomo para controlar a velocidade de aplicação dos produtos e um carimbo para delimitar a área de aplicação dos produtos.

**É preciso vestir alguma roupa ou sapato apropriado:** Não há necessidade de vestimenta específica, os braços devem estar à mostra no momento do teste e serem lavados antes do teste.

**Quais as medidas a serem obtidas?** As variáveis avaliadas serão: espalhabilidade, espessura, resíduo branco, brilho, pegajosidade, oleosidade, percepção do produto na pele e preferência.

**Quais os riscos e desconfortos que podem ocorrer?** Os riscos são mínimos, se considerados os critérios de inclusão e exclusão. As matérias-primas utilizadas nos produtos são aprovadas para uso pela ANVISA, o que comprova a segurança das mesmas. Podem ocorrer reações de uso tópico, como alergia e/ou sensibilização. Caso ocorra qualquer tipo de reação adversa durante o estudo, você deve avisar imediatamente aos pesquisadores e proceder com a limpeza do local com sabonete neutro. Caso seja necessário, você será assistido por um médico, sob a responsabilidade dos pesquisadores, sem custo para você.

**Quais os meus benefícios e vantagens em fazer parte deste estudo?** A participação é voluntária, você não irá receber nenhum tipo de benefício por participar da pesquisa, como brindes, lanches, entre outros. Você terá a possibilidade de utilizar produtos inovadores, formulados com insumos e tecnologia de ponta, e estará ajudando no desenvolvimento e aperfeiçoamento da ciência cosmética brasileira.

**Quais as pessoas responsáveis e que estarão me acompanhando durante os procedimentos práticos deste estudo?** Uma das pesquisadoras envolvidas no projeto (Simone Jacobus Berlitz) irá acompanhar durante todo o procedimento estando à disposição para quaisquer esclarecimentos e/ou ajuda antes, durante e após as análises.

**Existe algum questionário que preciso preencher? Sou obrigado a responder a todas as perguntas?** Para a análise sensorial será pedido o preenchimento de um questionário, conforme explicado pelos pesquisadores no momento do convite. Não há obrigatoriedade de resposta. Você pode se retirar da pesquisa sem nenhum prejuízo ou constrangimento.

**Como minha privacidade será assegurada?** Os nomes dos voluntários não serão divulgados na pesquisa e os dados são sigilosos, assegurados pela Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. O interesse da pesquisa é o número total de opiniões e não a opinião individual.

**Se eu tiver alguma reação à aplicação dos produtos, como devo proceder?** Caso haja algum incômodo, coceira e/ou irritação na pele durante as análises, o voluntário deverá parar imediatamente e lavar a região com água abundante e sabão neutro até remoção do produto por completo. Os responsáveis acompanharão o voluntário e as medidas necessárias serão providenciadas. Caso seja necessário, o voluntário será ressarcido de possíveis gastos com tratamento médico em função de reações causadas comprovadamente pelo produto da pesquisa.

A coleta de dados em Porto Alegre será realizada por alunos da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Os dados da pesquisa ficarão guardados sob a responsabilidade da Prof. Dra. Irene Guerreiro, na Faculdade de Farmácia da UFRGS, por um período de 5 anos. Após este prazo os mesmos serão destruídos. As informações coletadas serão para uso exclusivo no presente projeto de pesquisa. No caso de dúvidas ou para mais informações o (a) Sr. (a) poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Professora Dra. Irene Clemes Kulkamp Guerreiro, pelo telefone (51) 3308 5416 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (51) 3308 3738.

Uma via deste Termo é destinada ao participante e outra aos pesquisadores, após as respectivas assinaturas.

---

Assinatura do Participante

---

Assinatura do Pesquisador(a)

**Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2016.**



## ANEXO D – Questionário da análise sensorial descritiva

Avaliador nº: \_\_\_\_\_

Amostra nº: \_\_\_\_\_

### AVALIAÇÃO SENSORIAL DESCRITIVA

Siga as instruções para realizar a avaliação, qualquer dúvida chame o líder do painel.

#### *Avaliação de Aplicação*

Aplique TODA a quantidade determinada no círculo desenhado no antebraço e com o dedo limpo faça rotações de acordo com o ritmo do metrônomo. Após 1 minuto (60 rotações), avalie os seguintes atributos, marcando na reta a intensidade do mesmo:

1. Espalhabilidade - facilidade de movimentação do produto sobre a pele  
 difícil de espalhar \_\_\_\_\_ fácil de espalhar
2. Espessura - quantidade de produto percebido entre o dedo e a pele  
 fina \_\_\_\_\_ espessa
3. Resíduo branco - grau de esbranquiçamento do produto enquanto é feita a aplicação.  
 nenhum \_\_\_\_\_ grande quantidade
4. Brilho - quantidade ou grau de luz refletida na pele  
 fraco brilho \_\_\_\_\_ brilhante
5. Pegajosidade - intensidade com que o dedo se adere a pele  
 não pegajoso \_\_\_\_\_ muito pegajoso
6. Oleosidade - sensação de óleo sobre a pele  
 não oleoso \_\_\_\_\_ muito oleoso

#### *Avaliação de atributos residuais*

Espre 10 minutos e avalie os atributos novamente (avaliação pós-aplicação residual).

1. Brilho residual  
 fraco brilho \_\_\_\_\_ brilhante
2. Pegajosidade residual  
 não pegajoso \_\_\_\_\_ muito pegajoso
3. Oleosidade residual  
 não oleoso \_\_\_\_\_ muito oleoso



## ANEXO E – Ficha técnica do óleo de arroz



## Óleo de Arroz Refinado

## Ficha Técnica do Produto

**Descrição do Produto:** o Óleo de Arroz Refinado é adequado para utilização em cosméticos, alimentos ou aplicações industriais que exijam um óleo totalmente processado (neutralizado, descerado, clarificado e desodorizado), ou seja, é um óleo vegetal de grau alimentício.

**Composição:** 100% Óleo de Arroz Refinado.

Análises Laboratoriais	
Ácido livre expressa em ácido oleico (%) (AOCS C1-44)	Máx. 0,3
Aparência visual (25°C)	Líquido amarelo
Cor (5 N * Lovibond, vermelho) (AOCS C1-91)	Máx. 5,0
Índice de Iodo (g <sub>2</sub> /100g) (AOCS C1-44)	99 – 108
Índice de peróxido (meq/kg KOH) (AOCS C1-41-91)	Máx. 2,0
Índice de saponificação (mgKOH/g) (AOCS C1-41-91)	181 – 189
Odor e Sabor	Característico
Sabões (ppm) (AOCS C1-16)	0
Umidade e voláteis (%) (AOCS C1-14)	Máx. 0,05
Análises de Garantia	
Densidade a 25°C (g/cm <sup>3</sup> )	0,916 – 0,921
Composição de Ácidos graxos (%) (AOCS C1-41-91)	
Palmítico (16:0)	16 – 19
Estéarico (18:0)	1,5 – 2,0
Óleico (18:1)	34 – 42
Linoléico (18:2)	30 – 35
Linolênico (18:3)	1 – 2
Araquídico (20:0)	0 – 0,8
Beênico (22:0)	0 – 0,5

**Embalagem:** em tambores de 200 L (180 kg) ou a granel em caminhão tanque e em embalagem de 900 mL.

**Armazenamento e Validade:** armazenar em embalagens originais, à temperatura ambiente. Validade de 01 ano a partir da data de fabricação.

**Certificação:** o Óleo de Arroz Refinado é produzido sob Certificação Kosher pela BDK, São Paulo - Brasil e Certificação Halal pela Fambras/Ciba, São Paulo - Brasil.

**Regulamentação:** segundo normas e padrões estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA.

**Ingredientes:** ésteres de ácidos graxos superiores e glicerol (não OGM).

**Alérgicos:** este produto é livre de leite, ovos, peixes, crustáceos, nozes, amendoim, trigo, soja e é livre de glúten.