

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

ALINE DE CARVALHO VARJÃO MOTA

ESTUDO DE CEDÊNCIA DE FILTROS SOLARES INCLUSOS EM
SISTEMAS DE LIBERAÇÃO

RIO DE JANEIRO

2005

ALINE DE CARVALHO VARJÃO MOTA

**ESTUDO DE CEDÊNCIA DE FILTROS SOLARES INCLUSOS EM SISTEMAS
DE LIBERAÇÃO**

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

Orientador: Prof. Adjunto Dra. Elisabete Pereira dos Santos

RIO DE JANEIRO

2005

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aline de Carvalho Varjão Mota

ESTUDO DE CEDÊNCIA E PERMEAÇÃO DE FILTROS SOLARES INCLUSOS EM
SISTEMAS DE LIBERAÇÃO

Dissertação submetida ao corpo docente do curso de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovada por:

Prof. _____ - Elisabete Pereira dos Santos - UFRJ

(Adjunto)

Prof. _____ - Nádia Maria Volpato - UFRJ

(Adjunto)

Prof. _____ - Sheila Garcia - UFRJ

(Adjunto)

Prof. _____ -

(Adjunto)

RIO DE JANEIRO

2005

RESUMO

O mercado hoje em dia demanda preparações antisolares cada vez mais modernas. Além de um amplo espectro de proteção contra a radiação ultravioleta, as formulações devem ser estáveis, resistentes à água e ter efeito prolongado. A inclusão de filtros solares em sistemas de liberação é capaz de aumentar a fotoestabilidade, o FPS in vivo e o tempo de permanência do filtro solar na pele.

O objetivo deste trabalho foi comparar a capacidade de cedência de três formulações na forma de gel a primeira contendo o filtro solar *p*-metoxicinamato de octila (MCO) livre, a segunda contendo o complexo de inclusão β -ciclodextrina/*p*-metoxicinamato de octila (β -CD/MCO) e a terceira contendo este filtro solar incluso em lipossoma (lipossoma/MCO). Foi determinado para o complexo de inclusão β -CD/MCO um método de purificação que retirasse o excesso de filtro solar não complexado sem alterar o incluso obtido. Três soluções aquosas foram testadas (metanol a 50%, metanol a 70% e etanol a 50%) com o objetivo de verificar qual a solução mais adequada na purificação do β -CD/MCO. Utilizamos a Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) para a caracterização dos complexos formados. Todos os espectros mostraram diferenças nos deslocamentos químicos ($\Delta\delta$) dos hidrogênios do anel aromático e do sistema *trans* da dupla ligação entre os complexos formados e o MCO puro. Mas dentre eles o melhor complexo de inclusão obtido foi aquele purificado com metanol a 50%. Este complexo de inclusão também foi o que mostrou o maior rendimento de inclusão determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

O estudo de cedência foi realizado em células de difusão do tipo Franz com membrana artificial de acetato de celulose. A análise das amostras foi realizada por CLAE. No estudo de cedência em células de difusão do tipo Franz verificamos que a inclusão do MCO em sistemas de liberação diminuiu a capacidade da formulação em ceder o MCO para o meio acceptor já que ambos os sistemas de liberação cederam quantidades menores de filtro quando comparadas à formulação com MCO livre. Esta formulação foi a que liberou o MCO mais rapidamente e em maior quantidade para o fluido receptor. Dentre os sistemas de liberação contendo lipossoma e ciclodextrina o que cedeu menores quantidades de MCO foi o lipossoma mostrando os melhores resultados. A inclusão de filtros solares em sistemas de liberação possivelmente contribui para a obtenção de formulações fotoprotetoras mais seguras e eficazes.

ABSTRACT

There's an increasing market demand for more modern sunscreen products. Besides a wide protection against ultraviolet radiation, formulations must be stable, water resistant and long action. Inclusion of sunscreen compounds into delivery systems increase photostability, in vivo SPF, and the remaining on the skin.

The aim of this work was to compare in vitro release of three gel formulations containing the UV filter octyl methoxycinnamate (OMC). The first formulation was a carbopol gel containing free OMC, the second one contain a β -cyclodextrin/Octyl methoxycinnamate (β -CD/OMC) inclusion complex, and the third was a formulation containing OMC included in liposome. The release studies were carried out in Franz diffusion cells using a cellulose acetate membrane. The samples were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC).

The (β -CD/OMC) inclusion complex was established but no purification method to remove not complexed OMC was defined. So, three water solutions (50% methanol, 70% methanol and 50% ethanol) were tested in order to verify which is the most suitable for complex purification. NMR ^1H spectrometry was utilized to characterize the complexes. All the spectra showed differences in the chemical shifts ($\Delta\delta$) of the protons of aromatic ring and *trans* systems between the complexes and the pure OMC. But among them, the best complex was the one purified with the 50% methanol solution. This complex also showed the best inclusion yielding determined by HPLC.

The Franz cell releasing studies showed that the OMC inclusion in delivery systems reduced the formulation ability to release the UV filter to the acceptor medium since both delivery systems had released smaller amounts of filter when compared to the free OMC formulation. This formulation was the one that released higher amounts of filter to the receptor fluid. Between cyclodextrin and liposome delivery systems, liposomes released lower amounts of OMC showing the best results.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Henrique e Rosa, por me proporcionarem condições de crescer e me tornar a pessoa que eu sou hoje. Ao meu marido, Alberto, pelo incentivo e dedicação durante a realização deste trabalho. E à minha filha Lívia.

Quem sabe concentrar-se numa coisa e insistir nela como único objetivo, obtém, ao cabo, a capacidade de fazer qualquer coisa.

MAHATMA GHANDI

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha orientadora professora Bete, pela amizade, por estar sempre disponível a ajudar e por esses dois anos de dedicação a este trabalho.

Agradeço à minha família: meus pais Rosa e Henrique, meu irmão Henrique, meu marido Alberto, minha sogra Ana Maria; pelo apoio, incentivo, carinho e dedicação dispensados por mim, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

Aos meus amigos da Farmácia Universitária pelo apoio, pelos bons momentos e pela convivência agradável durante estes dois anos.

Aos meus amigos da UFRJ pelos bons momentos e pela amizade.

Em especial, agradeço à amiga Zaida que contribuiu enormemente nesta realização me ajudando com as células de Franz e o cromatógrafo líquido; e com o seu companheirismo e amizade.

À professora Nádia pelas boas idéias e auxílio com a interpretação dos resultados.

À professora Sheila pelo auxílio no preparo dos lipossomas e orientações que ajudaram muito no aprimoramento deste trabalho.

Ao professor Lúcio pela ajuda no preparo da inclusão do filtro solar em ciclodextrina.

À Adriane Todeschini pela grande ajuda com os espectros de RMN.

À Cláudia pela ajuda e carinho dispensado em momentos difíceis.

Ao professor Luís Maurício pela ajuda com os espectros de infravermelho.

Ao pessoal do LABCQ pela ajuda, pelo carinho e pelos bons momentos que passamos juntos.

Ao professor Venício pela ajuda com as fotos de microscopia óptica.

À professora Carla pelos ensinamentos e bons momentos durante a minha tutoria em Farmacotécnica.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRJ pelos ensinamentos.

À Capes pela bolsa concedida.

E, principalmente a Deus, pois sem sua permissão este trabalho não se realizaria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula Estrutural do <i>p</i> -metoxicinamato de octila.....	24
Figura 2 - Estrutura da Pele.....	27
Figura 3 - α , β e γ - Ciclodextrinas.....	34
Figura 4 – Esquema de um Lipossoma, sua bicamada (apolar) e o compartimento interno (aquoso).....	39
Figura 5 - Célula de Difusão do Tipo Franz utilizada nos estudos de liberação in vitro.....	63
Figura 6 - Espectros de RMN 1H do filtro solar MCO livre e dos inclusos em β - CD purificados com solventes diferentes.....	68
Figura 7 - Espectros de infravermelho.....	71
Figura 8 – Fotomicroscopia de Suspensão Contendo Lipossomas com Aumento de Vezes.....	74
Figura 9 - Cromatogramas dos Pontos da Curva Padrão.....	77
Figura 10 - Cromatogramas da Formulação Contendo Lipossomas (célula B).....	82

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva Padrão área x concentração do MCO obtida por CLAE.....	67
Gráfico 2 - Curva Padrão de Fósforo.....	73
Gráfico 3 - Curva Padrão Obtida nos diversos dias de trabalho para estudo de cedência das formulações.....	76
Gráfico 4 - Estudo de Cedência do MCO em gel de carbopol.....	78
Gráfico 5 - Estudo de Cedência do MCO incluído em β - ciclodextrina.....	80
Gráfico 6 - Estudo de Cedência do MCO incluído em lipossoma.....	81
Gráfico 7 - Estudo de cedência das três formulações.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes para o preparo de MCO incluso em lipossoma.....	57
Tabela 2 - Formulação gel de carbopol com MCO a 4%.....	58
Tabela 3 - Formulação gel de carbopol com MCO incluso em β -ciclodextrina.....	59
Tabela 4 - Formulação gel de natrosol com MCO incluso em lipossoma.....	59
Tabela 5 - Composição da solução salina tamponada pH 7,4.....	64
Tabela 6 - Alterações nos deslocamentos químicos do p-metoxicinamato de octila quando os complexos de inclusão são lavados com diferentes soluções.....	69
Tabela 7 - Rendimento de Inclusão dos componentes lavados com diferentes soluções.....	72
Tabela 8 - Concentrações das formulações obtidas por CLAE.....	74
Tabela 9 - FPS <i>in vitro</i> das formulações.....	75
Tabela 10 - Estudo de solubilidade do MCO em solução receptora.....	75
Tabela 11 - Médias das concentrações e das áreas de MCO obtidos por CLAE nos diversos dias de trabalho.....	76
Tabela 12 - Médias das quantidades cedidas por área de MCO das seis células contendo o gel de carbopol com o filtro livre.....	77
Tabela 13 - Médias das quantidades cedidas por área de MCO das seis células contendo o gel de carbopol com o filtro incluso em β -CD.....	79
Tabela 14 - Médias das quantidades cedidas por área de MCO das seis células contendo o gel de natrosol com o filtro incluso em lipossoma.....	81
Tabela 15 – Comparação da quantidade cedida por área das três formulações.....	81

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

β -CD - β -Ciclodextrina

BM-DBM – Butilmetoxi Dibenzoilmetano

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DME – Dose Mínima de Eritema

DP – Desvio Padrão

EPM – Erro Padrão da Média

FDA - Food and Drug Administration

FPS - Fator de Proteção Solar

HP- β -CD – Hidroxipropil- β -Ciclodextrina

IV- Infravermelho

LUV - Large Unilamellar Vesicle (vesícula grande unilamelar)

MCO - *p*-metoxicinamato de octila

MLV- Multilamellar Large Vesicle (vesícula grande multilamelar)

PABA – Ácido *p*-aminobenzóico

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

rpm – rotações por minuto

SLN - Nanopartícula de Lipídio Sólido

SUV - Small Unilamellar Vesicle (vesícula pequena unilamelar)

TRIS - Tris(hidroximetil)aminometano

UV - Ultravioleta

UVA - Ultravioleta A

UVB - Ultravioleta B

UVC - Ultravioleta C

LISTA DE SÍMBOLOS

Abs - Absorbância

λ - Comprimento de Onda

μg - Micrograma

μL - Microlitro

cm^2 - Centímetro Quadrado

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mm – Milímetro

nm - Nanômetro

P - Fósforo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1. O ESPECTRO SOLAR.....	21
2.2. DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE FILTROS SOLARES.....	22
2.2.1. <i>p</i> -Metoxicinamato de Octila.....	24
2.3. ESTRUTURA DA PELE.....	25
2.4. EFEITOS DA RADIAÇÃO SOLAR SOBRE A PELE HUMANA.....	29
2.4.1. Efeitos da Exposição Solar Aguda.....	29
2.4.2. Efeitos da Exposição Solar Prolongada.....	30
2.4.2.1. Fotossensibilidade.....	30
2.4.2.2. Fotoimunologia.....	31
2.4.2.3. Fotoenvelhecimento.....	32
2.4.2.4. Fotocarcinogênese.....	32
2.5. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO.....	34
2.5.1. Ciclodextrinas.....	34
2.5.2. Lipossomas.....	38
2.5.3. Carreadores Particulados.....	43
2.6. CEDÊNCIA / LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.....	47
3. OBJETIVOS.....	49
4. MATERIAIS.....	50
4.1. MATÉRIAS-PRIMAS.....	50
4.2. REAGENTES.....	50
4.3. PADRÃO DE <i>p</i> -METOXCINAMATO DE OCTILA.....	51
4.4. EQUIPAMENTOS.....	52

5. METODOLOGIA.....	54
5.1. PREPARO DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO.....	54
5.1.1. Complexo de Inclusão β -Ciclodextrina/ <i>p</i> -Metoxicinamato de Octila (β -CD/MCO).....	54
5.1.1.1. Inclusão do <i>p</i> -Metoxicinamato de Octila em β -ciclodextrina.....	54
5.1.1.2. Purificação do Complexo β -CD/MCO.....	55
5.1.1.3. Confirmação da Formação do Complexo de Inclusão por.....	55
a) Espectrometria de Ressonância Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H).....	55
b) Espectrometria de Infravermelho.....	56
5.1.1.4. Determinação do Rendimento de Inclusão por CLAE.....	56
5.1.2. Lipossoma com <i>p</i> -metoxicinamato de octila.....	57
5.1.2.1. Preparo dos Lipossomas Contendo MCO.....	57
5.1.2.2. Verificação da Formação dos Lipossomas por Microscopia.....	58
5.2. PREPARO DAS FORMULAÇÕES.....	58
5.2.1. Gel de Carbopol com <i>P</i> -Metoxicinamato de Octila Livre.....	58
5.2.2. Gel de Carbopol com <i>P</i> -Metoxicinamato de Octila Incluso em β -Ciclodextrina.....	59
5.2.3. Gel de Natrosol com <i>P</i> -Metoxicinamato de Octila Incluso em Lipossoma.....	59
5.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE MCO E DAS CONCENTRAÇÕES DESTE FILTRO SOLAR NAS FORMULAÇÕES POR CLAE.....	60
5.4. DETERMINAÇÃO DO FPS IN VITRO.....	60
5.5. ANÁLISE DO TEOR DE FÓSFORO.....	61
5.6. ESTUDO DE CEDÊNCIA EM CÉLULAS DE FRANZ.....	62
5.6.1. Dispositivo.....	62
5.6.2. Solução Receptora.....	64
5.6.3. Preenchimento da Célula de Franz.....	65

5.7. ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR CLAE.....	66
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
6.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DO FILTRO SOLAR <i>p</i> -METOXICINAMATO DE OCTILA.....	67
6.2. CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO β -CD/MCO.....	68
6.2.1. Por Espectrometria de RMN ^1H	68
6.2.2. Por Espectrometria de IV.....	70
6.3. RENDIMENTO DE INCLUSÃO DO COMPLEXO β -CD/MCO.....	72
6.4. ANÁLISE DE FÓSFORO DO PHOSPHOLIPON 90 [®] , DO LIPOSSOMA E DO GEL COM LIPOSSOMA.....	72
6.5. CARACTERIZAÇÃO DO LIPOSSOMA POR MICROSCOPIA ÓPTICA.....	74
6.6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS FORMULAÇÕES POR CLAE.....	74
6.7. FPS IN VITRO DAS FORMULAÇÕES.....	75
6.8. ESTUDO DE CEDÊNCIA EM CÉLULAS DE FRANZ.....	75
6.8.1. Escolha da Solução Receptora.....	75
6.8.2. Curva Padrão Obtida para os Estudos de Cedência das Formulações.....	76
6.8.3. Gel de Carbopol com P-Metoxicinamato de Octila Livre.....	77
6.8.4. Gel de Carbopol com p-Metoxicinamato de Octila incluso em β -Ciclodextrina.....	79
6.8.5. Gel de Natrosol com p-Metoxicinamato de Octila incluso em Lipossoma.....	80
6.8.6. Comparação entre as Três Formulações.....	81
7. CONCLUSÃO.....	84
8. PERSPECTIVAS.....	85
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	86

1. INTRODUÇÃO

Os efeitos nocivos da luz solar, especialmente da radiação ultravioleta, na pele humana são bem conhecidos. Enquanto a exposição aguda aos raios solares promove uma resposta inflamatória (eritema), a exposição crônica pode levar ao envelhecimento cutâneo e a certas formas de câncer de pele. A consciência dos efeitos prejudiciais da exposição solar resultou no aumento do uso de agentes fotoprotetores, principalmente porque a incidência de envelhecimento e de câncer de pele induzidos pela luz solar tem aumentado em muitos lugares do mundo. Em particular, a incidência do câncer de pele tipo melanoma, tem mostrado aumento em vários continentes nos últimos anos. (SCALIA *et al*, 1998; URBACH, 2001)

Os filtros solares têm sido largamente recomendados como uma medida preventiva contra queimaduras solares, fotoenvelhecimento e câncer de pele. Os filtros solares são aplicados regularmente em grandes áreas do corpo, sendo assim, a quantidade absorvida pode ser significativa mesmo que o grau de penetração seja baixo (SARVEIYA *et al*, 2004). Além disso, na tentativa de tornar os filtros solares mais resistentes à água os fabricantes os tornam mais lipofílicos o que pode levar a um aumento de absorção cutânea. Os filtros solares em geral têm baixa toxicidade aguda em animais, mas pouco se sabe sobre sua toxicidade crônica após aplicação tópica. É muito comum o envolvimento de filtros solares em reações alérgicas de contato (KULLAVANIJAYA & LIM, 2005). Dentre eles está a benzofenona-3, um filtro anti UVA, que também é um dos mais fotoestáveis e, portanto, é muito usado em formulações fotoprotetoras comerciais. Entretanto, em testes *in vitro* foi mostrado que a benzofenona-3 penetra na pele em maior extensão que outros filtros comumente usados. Nos estudos de Gonzalez *et al* 0,5% da quantidade aplicada de benzofenona-3 foi encontrada na urina, usando-se um filtro solar contendo 4% desta substância aplicado apenas uma vez em todo o corpo exceto na área genital e no couro cabeludo. Vários filtros solares incluindo a benzofenona-3 foram encontrados no leite materno. A recomendação para o uso de filtros solares é de que façamos

várias aplicações ao dia, sendo necessário investigar o efeito sistêmico após aplicações repetidas (GONZALEZ, 2002).

De acordo com Sarveiya (SARVEIYA et al, 2005) uma quantidade significativa dos filtros solares oxibenzona, MCO, octilsalicilato e homosalato foram encontrados em camadas mais profundas do estrato córneo 30 minutos após a aplicação em voluntários. Esta quantidade encontrada diminuiu 4 horas após a aplicação sugerindo que pode ter ocorrido absorção para camadas mais profundas da pele. Aproximadamente 1% da dose aplicada de oxibenzona e seus metabólitos foram encontrados na urina após uma única aplicação (SARVEIYA, 2004).

Em vários trabalhos podemos verificar que o encapsulamento ou a inclusão do filtro solar MCO em sistemas de liberação como ciclodextrinas, lipossomas, nanocápsulas, nanopartículas, microsferas com os objetivos de diminuir a absorção cutânea, aumentar o FPS, controlar a liberação e tornar o filtro mais fotoestável (JIMÉNEZ, 2004; PERUGINE, 2002; SCALIA, 2002; YENER, 2003). No presente trabalho verificamos se a inclusão em ciclodextrinas e lipossomas é capaz de modificar a liberação *in vitro* do filtro solar *p*-metoxicinamato de octila da formulação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O ESPECTRO SOLAR

A radiação solar abrange o espectro eletromagnético a partir da energia cósmica baixa e alta, raios gama e X, ultravioleta de alta e baixa energia, visível, infravermelho, microondas e ondas de rádio. Aproximadamente, 30 a 40% da radiação solar, incluindo a maioria das porções prejudiciais, são absorvidas na atmosfera pela camada de ozônio a uma faixa de 15 a 35km do nível do mar. Radiação de alta energia (comprimento de onda menor que 10 nm) desloca elétrons do tecido onde incidem para formar íons. Portanto, radiações desta categoria incluindo raios X e gama, são denominadas radiação ionizante. Por não possuírem este grau de energia, as radiações ultravioleta, visível, e infravermelho são da categoria de radiação não ionizante.

A radiação que atinge a Terra é aproximadamente 50% visível ($\lambda = 400 - 800$ nm), 40% infravermelho ($\lambda = 1300 - 1700$ nm) e 10% ultravioleta ($\lambda = 10 - 400$ nm). O espectro de ultravioleta é dividido por conveniência em UVA (320 a 400 nm), UVB (290 a 320 nm) e o UVC (100 a 290 nm). O olho humano só pode detectar comprimentos de onda na faixa do visível. O UVC de menores comprimentos de onda são filtrados pela camada de ozônio, que elimina essencialmente todas as radiações UV com comprimento de onda menor que 290 nm. Um pouco do UVA é filtrado na atmosfera. O UV restante que atinge o solo é cerca de 10% UVB e 90% UVA ao meio dia. A intensidade do UVB começa a declinar após o meio dia, mas o UVA tem intensidade constante o dia todo (SHAATH, 1997b e KULLAVANIJAYA, 2005).

2.2. DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE FILTROS SOLARES

Filtros solares são substâncias químicas capazes de absorver, refletir ou dispersar a radiação UV proveniente da luz solar. Existem dois tipos de filtros solares: os filtros solares orgânicos e os filtros solares inorgânicos ou bloqueadores físicos. Os filtros solares inorgânicos são substâncias que refletem e dispersam a radiação UV. Exemplos de filtros inorgânicos são: dióxido de titânio e óxido de zinco. Pequenas quantidades desses filtros são capazes de refletir boa parte da radiação UV, visível, e infravermelho. Eles são usados frequentemente em conjunto com filtros orgânicos para obter altos FPS. Sua maior desvantagem é o fato de tornarem as preparações opacas. Para reverter este processo essas substâncias têm o tamanho da partícula reduzido tornando a preparação esteticamente melhor (FAIRHURST, 1997).

Os filtros solares orgânicos são compostos aromáticos conjugados com um grupo carbonila. Em muitos casos, um grupo doador de elétrons (uma amina ou metoxila) está substituindo as posições *orto* ou *para* no anel aromático. Substâncias com esta configuração absorvem a radiação ultravioleta de menor comprimento de onda (alta energia) e convertem a energia absorvida em radiação de alto comprimento de onda (baixa energia) geralmente acima de 380 nm. Cálculos de mecânica quântica demonstraram que a energia do quanta de radiação presente na região de UVA e UVB é da mesma magnitude da energia de ressonância de deslocalização dos elétrons nesses compostos aromáticos. Então, a energia absorvida da radiação UV corresponde à energia requerida para causar uma excitação fotoquímica na molécula do filtro solar. Os filtros solares químicos são classificados em filtros anti UVA e anti UVB dependendo do tipo de radiação a qual eles conferem proteção. Filtros anti UVA absorvem radiação entre 320 a 360 nm dos espectro de UV (benzofenonas e antranilatos). Filtros anti UVB absorvem radiação entre 290 e 320 nm (PABA, salicilatos, cinamatos) (SHAATH, 1997b).

Um filtro solar deve absorver e/ou refletir a radiação UV e oferecer absorção homogênea sobre um largo espectro de radiação UV. Isto significa que, a formulação fotoprotetora não deve apenas

proteger contra a radiação ultravioleta de baixo comprimento de onda (UVB), que é o principal responsável pelo eritema e pela queimadura solar. Deve também proteger contra o UVA, a radiação ultravioleta de alto comprimento de onda que não é apenas responsável pelo bronzeamento, mas também atua nos danos à pele provocados pela luz solar, fotoenvelhecimento, fotodermatose aguda e crônica e imunossupressão. A proteção completa contra toda a faixa do UV raramente é possível com um único filtro UV. Portanto, a maioria dos filtros solares modernos usa uma combinação de vários filtros orgânicos e inorgânicos para cobrir todo o espectro de UV (PETRAZZUOLI, 2000).

Além de absorver a radiação UV, um produto fotoprotetor deve ser estável na pele humana, termo e fotoestável sob a luz solar para que ofereça proteção por várias horas e para evitar a formação de produtos de degradação (KULLAVANIJAYA, 2005). Além disso, os filtros solares não devem ser irritantes, sensibilizantes e fototóxicos. Um filtro solar deve cobrir e proteger a pele, mas não deve penetrar para evitar a exposição sistêmica à substância. Esta substância não deve ser tóxica quando traços da substância forem absorvidos pela pele ou ingeridos quando aplicados nos lábios. Finalmente, um filtro solar moderno deve ser resistente à água, insípido, inodoro, incolor e compatível com formulações cosméticas (PETRAZZUOLI, 2000 e NOHYNEK & SCHAEFER, 2001).

A eficiência de um fotoprotetor é medida pelo valor do FPS e pela substantividade. O FPS é a medida da eficácia de um fotoprotetor frente à radiação UVB, e é definido pela razão do tempo de exposição à radiação UV necessária para produzir dose mínima de eritema (DME) na pele protegida pelo tempo de aparecimento do mesmo eritema na pele desprotegida.

$$\text{FPS} = \frac{\text{DME na pele protegida}}{\text{DME na pele desprotegida}}$$

A substantividade é uma característica do fotoprotetor que exprime quanto tempo o número de FPS advertido no rótulo é mantido, sob condições adversas, incluindo exposição à água e ao suor. De acordo com a FDA nos EUA, um fotoprotetor é declarado resistente à água se ele pode manter seu

FPS original após duas imersões de 20 minutos cada. Um fotoprotetor é considerado a prova de água quando ele retém sua integridade protetora após 4 imersões de 20 minutos cada uma. A substantividade é de enorme importância por que os fotoprotetores são usados ao ar livre onde o suor abundante e as imersões em água são freqüentes (LOWE & FRIEDLANDER, 1997 e PETRAZZUOLI, 2000).

2.2.1. *p*-Metoxicinamato de Octila (MCO)

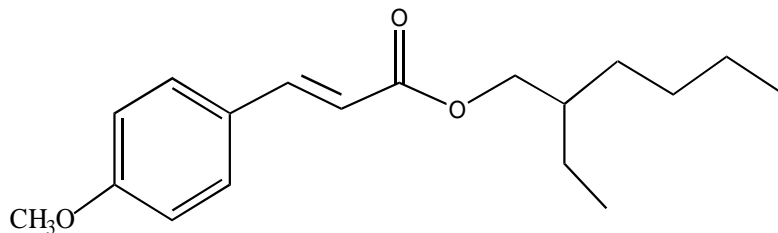


Figura 1 - Fórmula Estrutural do *p*-metoxicinamato de octila (THE MERK INDEX, 2001 e MARTINDALE, 1999)

O *p*-metoxicinamato de octila ou *p*-metoxicinamato de 2-etil-hexila é um filtro solar químico derivado de cinamato que absorve na faixa do UVB. A absorção é máxima em 310 nm de comprimento de onda. O MCO é um líquido oleoso, transparente, levemente amarelado, inodoro, insolúvel em água, solúvel em etanol e óleo mineral. Seu peso molecular é 290,4 e o ponto de ebulição está na faixa de 185-195° C a 1 mbar. Sua fórmula molecular é: C₁₈H₂₆O₃; sua fórmula estrutural está demonstrada na figura 1 (THE MERK INDEX, 2001 e MARTINDALE, 1999).

2.3. ESTRUTURA DA PELE

A pele é constituída de três camadas que, de fora para dentro, são: epiderme, derme e hipoderme (Figura 2). A epiderme é um tecido epitelial estratificado córneo. Na sua estrutura temos de considerar as células epiteliais que compõem o sistema queratínico e seus anexos (pêlos, unhas e glândulas), as células do sistema melânico, as células de Langerhans, as células dendríticas e indeterminadas e as células de Merkel. O sistema queratínico é constituído, na sua parte mais profunda, pela camada basal. Esta é formada por células mais jovens colunares, justapostas umas às outras e em multiplicação constante, que são os queratinócitos ou células basais. Estas células vão se orientando no sentido da exteriorização (AZULAY & AZULAY, 1997).

A epiderme é subdividida em camada córnea, camada granulosa e camada lúcida. A camada córnea, a mais externa, é constituída de lâminas superpostas de células queratinizadas cuja espessura varia com a região do corpo. É a camada de células mortas da epiderme e exerce a função protetora contra as agressões físicas, químicas e biológicas. Abaixo da camada córnea está a camada granulosa que é constituída de células granulosas, ou seja, células bem achatadas com abundantes grânulos queratoalínicos. Após esta camada vem a camada lúcida que é mais abundante e expressiva nas regiões palmoplantares, sendo homogênea e constituída de células achatadas e anucleadas. As camadas granulosa e lúcida constituem a chamada camada de transição, com importantes funções de barreira entre o meio interior e o exterior, pois impede, por um lado, a saída de água e, por outro, a entrada de substâncias exógenas (AZULAY & AZULAY, 1997).

As células da epiderme são unidas entre si e com a derme, através de desmossomos e hemidesmossomos, respectivamente, que são estruturas visíveis apenas pela microscopia eletrônica. Além dessas estruturas de união, existe, entre as células epidérmicas, o cimento intercelular, também chamado de glicocálice. Este é constituído de glicoproteína com consistência de gel, para servir a uma dupla finalidade: promove a coesão das células entre si, ao mesmo tempo em que permite, facilmente, a

circulação de substâncias solúveis em água. A epiderme e a derme unem-se de maneira sinuosa e interpenetrante, isto é, a epiderme penetra na derme por meio dos cones interpapilares e a derme penetra na epiderme através das papilas dérmicas. A interface entre a epiderme e a derme é conhecida como a zona de membrana basal. As principais funções da zona de membrana basal é servir como suporte mecânico, promovendo adesão, crescimento, diferenciação e migração das células basais, bem como servir de filtro semipermeável para que se efetuem as trocas necessárias entre as células da derme e da epiderme. Deve-se chamar atenção para o fato de que a renovação constante da epiderme é feita pelas células basais, que se dividem freqüentemente. A renovação completa, desde a divisão das células basais até a eliminação das lâminas córneas, ocorrem em 59-75 dias (AZULAY & AZULAY, 1997). Além do sistema queratínico, existe ainda o sistema melanocítico. Os dois constituem o sistema binário da epiderme. Os melanócitos são as células produtoras de pigmento e localizam-se predominantemente ao nível da camada basal, na proporção de um melanócito para dez queratinócitos basais. O número de melanócitos é aproximadamente o mesmo em todas as raças; nestas o que varia, é o número, a morfologia, o tamanho e a disposição dos melanossomos ou grânulos de melanina, e este fato é determinado geneticamente. Os melanócitos são células dendríticas que lembram o polvo. Cada melanócito entra em contato com vários queratinócitos, inclusive a distâncias relativamente longas, através dos seus dendritos, que injetam nos queratinócitos os grânulos de melanina, de modo que estes passam a ser células de depósito de melanina. Os melanossomos são sintetizados no complexo de Golgi pela ação da tirosinase. O bronzeamento da epiderme pelo sol deve-se a uma ativação da tirosinase, levando à formação de melanossomos maiores e em maior número (AZULAY & AZULAY, 1997).

A derme é uma camada, com estruturas próprias, que fica abaixo da epiderme e acima da hipoderme, sendo constituída de substância fundamental, fibras, vasos e nervos, além dos folículos polissebáceos e das glândulas sudoríparas já descritas anteriormente. Ela pode ser dividida em três partes distintas: a) a derme fundamental ou papilar, onde predominam as células e os feixes fibrilares de colágeno que são muito finos e dispostos em sentido vertical; b) a derme profunda, ou reticular, que

fica compreendida entre a derme papilar e a hipoderme, e é constituída de feixes de colágeno mais espessos, ondulados e horizontalmente dispostos; c) a derme adventicial, que se dispõe em torno dos folículos polisebáceos, glândulas e vasos e é constituída de feixes finos de colágenos. A substância fundamental contém glicoproteínas e proteoglicanos. As fibras elásticas existem em pequeno número e entremeiam-se com as fibras colágenas. São mais finas e formam uma rede densa ao nível da derme papilar, enquanto na derme reticular são dispostas horizontalmente em ondulação. São distensíveis mas voltam ao seu tamanho primitivo quando cessa o estiramento. Os tipos celulares da derme são representados por células mesenquimais primitivas, fibroblastos, histiócitos e mastócitos (AZULAY & AZULAY, 1997).

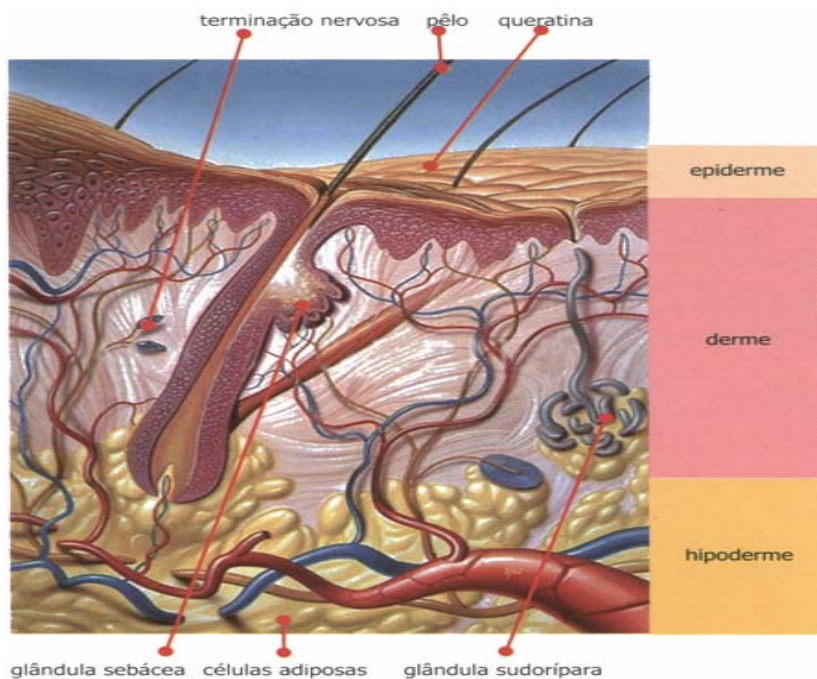


Figura 2 – Estrutura da Pele
(extraído do site www.afh.bio.br/tegumentar/tegumentar.asp)

A hipoderme é a camada mais profunda da pele, constituída de lóbulos de lipócitos delimitados por septos de colágeno com vasos sanguíneos. Os lipócitos, ou células adiposas são arredondadas e grandes, contendo em seu citoplasma uma grande quantidade de lipídios (principalmente triglicerídios). Fazem parte ainda dessa gordura, um pigmento - o lipocrômio -

colesterol, vitaminas e água. O fascículo adiposo além de ser reserva de calorias, protege o organismo de traumas e do calor (AZULAY & AZULAY, 1997).

As radiações solares que nos chegam estão na faixa dos 290 a 700 nm, uma vez que a camada de ozônio impede a chegada de radiação UVC. Constituem o espectro fotobiológico responsável pela melanogênese, fotopercepção visual, fotossíntese e outras reações fotoquímicas de interesse biológico. As radiações, ao atingirem a pele, são parcialmente refletidas, refratadas e, em parte, absorvidas, participando ativamente nesses processos na epiderme, a camada córnea, os melanócitos, os esteróides, o ácido urocânico e tanto na epiderme como na derme, os ácidos nucleicos (RNA, DNA) e as estruturas celulares, membrana citoplasmática, lisossomos e seus constituintes. Radiações de diferentes comprimentos de onda atingem estas estruturas, que funcionam como cromóforos absorvendo energia. O resultado da interação entre a luz e a matéria viva (pele), determinando efeitos nocivos, são as chamadas reações de fotossensibilidade (AZULAY & AZULAY, 1997).

A função de barreira da pele dos mamíferos é atribuída principalmente ao estrato córneo. As propriedades de barreira estão baseadas no conteúdo específico e composição dos lipídios do estrato córneo, e em particular, o arranjo da matriz lipídica intercelular e do envelope lipídico que envolve as células. Os lipídios formam bicamadas que circundam os corneócitos, produzindo um modelo tijolo-cimento com os corneócitos sendo os tijolos e os lipídios intercelulares como o cimento. Os lipídios intercelulares são constituídos principalmente de ceramidas, colesterol, ésteres de colesteril, ácidos graxos, e uma pequena fração de sulfato de colesterol (MOSER, 2001; BOUWSTRA, 2002).

A permeação de fármacos através da pele inclui a difusão através da pele intacta e através de seus apêndices, como folículos pilosos e glândulas sudoríparas, que formam desvios através da epiderme intacta. Entretanto, estes apêndices ocupam apenas 0,1% do total da superfície da pele e a contribuição dessa rota é considerada muito pequena. Como mencionado acima, a permeação de fármacos através da pele é limitada pelo estrato córneo. Duas rotas através da barreira intacta podem

ser identificadas: a rota intercelular formada de lipídios entre os corneócitos e a rota transcelular atravessando os corneócitos e os lipídios circundantes. Em ambos os casos, o permeante tem que difundir de alguma forma pela matriz lipídica intercelular, que é reconhecidamente o determinante majoritário da velocidade de transporte percutâneo (MOSER, 2001; BOUWSTRA, 2002).

2.4. EFEITOS DA RADIAÇÃO SOLAR SOBRE A PELE HUMANA

2.4.1. Efeitos da Exposição Solar Aguda

O eritema, manifestação mais familiar da exposição à radiação UV, ocorre de maneira bifásica. A porção inicial desta reação, também conhecida como escurecimento imediato de pigmento (IPD) é mediado pelo UVA e dura de 13 a 30 minutos. O eritema induzido pela radiação UVA é visto apenas em uns indivíduos, enquanto em outros não é detectado. O eritema retardado, uma função do UVB, começa de 2 a 8 horas após a exposição e atinge o máximo em 24 a 36 horas, com eritema, prurido e dor nas áreas expostas. Esta reação acaba em um período de 3 a 5 dias, e inicia um aumento na melanogênese, que atinge um ápice em 2 ou 3 semanas.

A dose mínima de eritema (DME) é definida como a quantidade de exposição ao UVB necessária para que a quantidade mínima de eritema possa ser detectada. Um valor típico de DME para um indivíduo que queima facilmente e escurece levemente é de 20 minutos ao meio dia no verão ao sul da Califórnia. Uma exposição de 5 DME produz queimadura de sol dolorosa. A 10 DME, ocorre edema, formação de vesículas e bolhas. Pode ocorrer necrose da pele levando a manchas e cicatrizes. Dependendo da área envolvida, a queimadura solar severa pode levar a sintomas sistêmicos conhecidos como “envenenamento solar”, incluindo febre, náuseas, vômitos, dor de cabeça forte, prostração e choque (LOWE & FRIEDLANDER, 1997).

2.4.2 Efeitos da Exposição Solar Prolongada

Existem duas respostas adaptativas principais iniciadas pela exposição solar: a melanogênese (bronzeamento) e o espessamento do estrato córneo. O bronzeamento ocorre como resultado da produção de melanina pelos melanócitos. A melanina é capaz de absorver, refletir e dispersar a radiação UV e também age capturando radicais livres. O bronzeamento induz aumento de fator de proteção solar de 2 a 4 contra uma exposição maior a radiação UV. Mesmo com bronzeamento protetor os caucasianos são suscetíveis a uma quantidade significativa de danos induzidos por radiação UV.

A superfície da pele é composta de uma camada de células densamente queratinizadas, chamado estrato córneo. Em resposta a uma exposição prolongada ao UVB, o estrato córneo pode hipertrofiar em até seis vezes a sua espessura original devido a síntese de queratina aumentada pelos queratinócitos basais. Esta resposta independe das mudanças na pigmentação evidenciado pelo fato de que ocorre em albinos. O estrato córneo espessado absorve ou reflete de 90 a 95% do UVB incidente tanto que somente 5 a 10% atinge os queratinócitos, melanócitos e o sistema vascular superficial da derme. A radiação UVA não induz ao espessamento do estrato córneo mas também pode provocar eritema, envelhecimento cutâneo e câncer de pele (SHAATH, 1997a; LOWE & FRIEDLANDER, 1997).

2.4.2.1. Fotossensibilidade

É o termo geral usado para respostas adversas a radiação não ionizante. Estas reações podem ser fototóxicas ou fotoalérgicas. A fototoxicidade é muito comum. Ocorrerá em qualquer um se for exposto à energia suficiente. Ou, se quantidade suficiente de moléculas fotossensibilizantes estão presentes. Geralmente, caracterizamos por um eritema seguido por hiperpigmentação e descamação.

Esta reação estimula a queimadura solar comum. De fato, a reação a radiação UVB provocando queimadura é a mais comum das respostas fototóxicas.

Ao contrário da fototoxicidade, a fotoalergia é incomum. Como todas as alergias, ela depende de uma reatividade adquirida alterada secundária a uma resposta humoral imediata ou a uma resposta tardia mediada por célula (EPISTEIN, 1997; LOWE & FRIEDLANDER, 1997).

2.4.2.2. Fotoimunologia

Em adição as reações de fotoalergia, os raios UV, com ou sem a presença de sensibilizantes exógenos, pode induzir mudanças significativas no sistema imunológico. In vitro, os raios UV destroem os linfócitos, o UVC é mais tóxico que o UVB que é mais tóxico que o UVA. Pesquisadores demonstraram que a exposição diária ao sol por 2 semanas induziu uma redução no número total de linfócitos T, levando a uma queda na concentração de células T helper. Quanto à funcionalidade, a atividade da célula T supressora foi aumentada e a atividade da célula T Killer foi diminuída.

A modulação por raios UV da hipersensibilidade por contato (CHS), da hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) e da carcinogênese cutânea têm recebido grande atenção recentemente. A importância clínica potencial dessa imunossupressão é sugerida pelos efeitos da radiação UVB antes da inoculação de agentes infecciosos em animais de laboratório, e pela fotocarcinogênese. Muitos agentes infecciosos causaram doenças mais graves o que é associado à inibição da DTH induzida por UV antes da inoculação. Além disso, a exposição de ratos a quantidades subcarcinogênicas de radiação UVB induz à tolerância induzida por UV ao transplante de tumores altamente antigênicos, devido à ativação de células T supressoras antígeno-específicas (EPISTEIN, 1997; LOWE & FRIEDLANDER, 1997).

2.4.2.3. Fotoenvelhecimento

A exposição à luz solar produz efeitos profundos na pele, produzindo envelhecimento acelerado provocando rugas, secura, telangiectasia, e anomalias na pigmentação consistindo em hiperpigmentação e hipopigmentação. Histologicamente, a derme está preenchida com uma massa amorfa de fibras elásticas desorganizadas. As fibras colágenas adquirem uma coloração basófila e possuem aparência desorganizada. As glicosaminoglicanas estão proeminentes. Os vasos sanguíneos estão dilatados e tortuosos. As células inflamatórias da derme estão aumentadas. Os queratinócitos estão irregulares com uma perda de polaridade. Os melanócitos estão irregulares. As células de Langerhans estão diminuídas na pele actínica. Já que o UVB é completamente absorvido pela epiderme, é importante entender que as alterações do envelhecimento podem ser produzidas pelo UVA sozinho (PINNEL, 2003).

2.4.2.4. Fotocarcinogênese

O melanoma é a principal causa de morte originada de doenças de pele nos Estados Unidos. A incidência de melanoma aumentou exponencialmente durante as duas últimas décadas, com uma incidência anual de 13 por 100.000 indivíduos. A causa do melanoma envolve exposição à radiação solar possivelmente anos antes do tumor aparecer. O tratamento do melanoma inclui a excisão do tumor primário e dos metastásicos e/ou regimes de tratamento quimioterápico (HOFFMAN, 1993).

O ADN pode absorver o UVB (290-320 nm), induzindo diretamente alterações entre bases pirimidínicas adjacentes em um dos filamentos do ADN. Podem ser gerados dímeros de ciclopirimidinas, particularmente dímeros de timina ou, em menor número, foto produtos. Estas alterações são maximizadas em comprimentos de onda de aproximadamente 300 nm, embora o UVA (320-400 nm) também possa gerar dímeros de timina. Essas alterações de ADN estão constantemente sendo corrigidas por reparo de excisão de nucleotídeo. A radiação UVB é um carcinógeno completo e

pode gerar carcinoma das células escamosas em animais. Enquanto que o UVB é importante para a iniciação do tumor, o UVA predominantemente causa a promoção do tumor. Comparado ao UVB, o UVA gera mais estresse oxidativo. Nos níveis encontrados na luz solar, o UVA é mais eficiente em causar peroxidação lipídica que o UVB. O UVA é mais citotóxico que o UVB. O UVA danifica o ADN por que causa quebra dos filamentos e oxidação dos ácidos nucleicos (PINNEL, 2003).

A luz solar pode suprimir a função imunológica da pele e promover a formação de câncer de pele. Aproximadamente 40% dos seres humanos são susceptíveis a imunossupressão causada pelo UV; no entanto, virtualmente todas as pessoas com carcinomas de célula basal ou de célula escamosa demonstraram imunossupressão. Embora todos os estudos de imunossupressão causadas por UV foram conduzidos usando o UVB, estudos recentes exaltaram a importância do UVA em causar a imunossupressão. A importância da imunossupressão no comportamento biológico do câncer de pele é melhor visualizado em pessoas imunossuprimidas por transplante de órgãos, com sua extrema incidência e letalidade do câncer de pele (PINNEL, 2003).

Além de gerar mais eficientemente espécies reativas de oxigênio, o UVA produz efeitos biológicos adicionais diferente do UVB. A luz solar contém cerca de 20 vezes mais UVA que UVB. Enquanto que o UVB é inteiramente absorvido pela epiderme, o UVA é capaz de atingir a derme e até mesmo afetar as células da circulação sanguínea (PINNEL, 2003).

2.5. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO

2.5.1. Ciclodextrinas

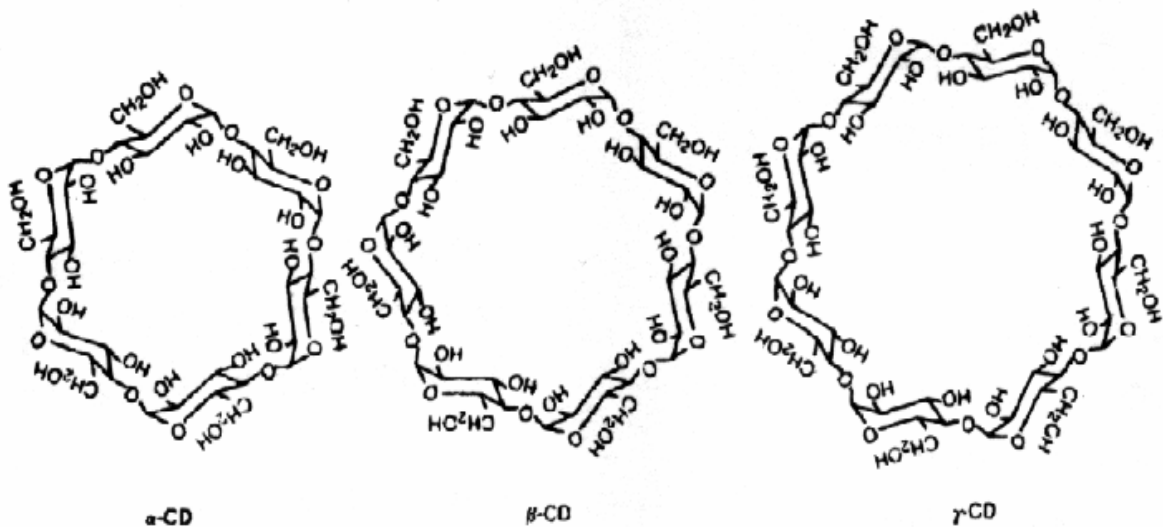


Figura 3 - Estruturas de α , β e γ -Ciclodextrina (DUCHÉNE, 1993)

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, cristalinos, não higroscópicos derivados do amido. Dentre as ciclodextrinas mais utilizadas estão as ciclodextrinas α , β e γ que têm respectivamente 6, 7 e 8 unidades de glicose (figura 3). Ciclodextrinas substituídas também estão disponíveis. Quanto à forma, as ciclodextrinas são moléculas toróides em forma de balde ou de cone. Elas têm uma estrutura rígida com uma cavidade central cujo tamanho varia de acordo com o tipo de ciclodextrina. Devido ao arranjo dos grupamentos hidroxila dentro da molécula, a superfície interna da cavidade é hidrofóbica e o lado externo é hidrofílico. Este arranjo permite as ciclodextrinas acomodarem uma outra molécula dentro dessa cavidade formando um complexo de inclusão. As ciclodextrinas podem então ser usadas para formar complexos de inclusão com uma grande variedade de fármacos promovendo melhorias na dissolução e na biodisponibilidade devido ao aumento da solubilidade. Os complexos de inclusão das ciclodextrinas também têm sido usados para mascarar sabores desagradáveis dos fármacos e para converter uma substância líquida em uma preparação sólida (KIBBE, 2000).

As ciclodextrinas influenciam na solubilidade e na fotodegradação do filtro solar butilmetoxidibenzoilmetano (BM-DBM). A estabilidade fotoquímica é a característica mais importante de um filtro solar eficiente, já que a decomposição induzida pela luz não só reduz o poder fotoprotetor, como também pode promover dermatite fototóxica ou fotoalérgica. O BM-DBM é um dos filtro UVA mais usados em preparações solares. A fotodecomposição do BM-DBM foi demonstrada tanto em soluções quanto em emulsões. Então, com o objetivo de aumentar a eficácia e a segurança desse filtro solar, há a necessidade de novos sistemas que aumentem a fotoestabilidade do BM-DBM (SCALIA, 1998).

As ciclodextrinas são capazes de modificar algumas características de substâncias ativas porque têm a capacidade de formar complexos. Esta complexação pode resultar em maior solubilidade e taxa de dissolução aumentada. Além disso, há um aumento na estabilidade da molécula incluída, em relação aos efeitos da luz e do ar. Em estudos de solubilidade de complexos formados por ciclodextrinas e BM-DBM, foram testados ciclodextrinas α , β e γ . Mas dentre estas, somente as β -ciclodextrinas (β -CD) e as hidroxipropil- β -ciclodextrinas (HP- β -CD) produziram os melhores resultados. Isto pode ser atribuído às diferentes dimensões das cavidades das ciclodextrinas. Embora β -CD e HP- β -CD produzissem os melhores resultados, somente HP- β -CD aumentou significativamente a solubilidade do BM-DBM provavelmente devido a sua maior solubilidade quando comparada à β -CD, o que limita a solubilidade do complexo formado. O aumento de solubilidade pode ser atribuído à formação de um complexo de inclusão com solubilidade maior que o BM-DBM livre (SCALIA, 2002).

Os estudos de fotoestabilidade do complexo BM-DBM e HP- β -CD foram realizados com experimentos de fotólise em que soluções contendo BM-DBM livre ou complexado (0,15% p/p) foram expostas por quatro horas a um simulador solar Xenon, o grau de fotodegradação do BM-DBM foi medido por CLAE. O percentual de perda do filtro solar foi de 70,4% em solução contendo BM-DBM sozinho. Um menor grau de degradação (49,2%) foi observado na solução contendo BM-DBM

complexado com HP- β -CD, o que indica que este sistema aumenta a fotoestabilidade deste filtro UVA. Por outro lado, a mistura física não afetou significativamente o comportamento fotoquímico do BM-DBM. (SCALIA, 1998)

Outros estudos de fotoestabilidade foram feitos em loções (emulsões o/a) para simular condições mais reais. O filtro solar livre ou complexado foi incorporado a loção (0,15% p/p) e foi irradiado com o simulador solar. Na preparação contendo o BM-DBM livre, 26,6% do conteúdo do filtro solar foi perdido por irradiação. Nas mesmas condições, loções contendo o complexo BM-DBM, exibiram uma diminuição de 17,3% do nível de filtro UVA. Esses dados indicam que a inclusão do BM-DBM reduz a fotodecomposição tanto em solução como em emulsões. (SCALIA, 1998)

Existem estudos que investigam a influência da complexação de β -CD e HP- β -CD com filtro solar anti UVB MCO na estabilidade química e fotoquímica deste filtro solar. Como o MCO contém um grupo funcional éster, sua solvólise representa um dos principais mecanismos de degradação deste filtro solar. Devido a sua baixa solubilidade em água, a decomposição do MCO foi estudada em metanol. Além disso, a catálise básica foi usada para acelerar a reação. O curso da reação foi acompanhado por CLAE medindo-se a concentração do composto original remanescente. A decomposição do MCO foi significativamente diminuída quando o filtro solar está complexado com β -CD, o mesmo não ocorre com o complexo MCO/HP- β -CD. As propriedades estabilizadoras superiores da β -CD comparadas as da HP- β -CD podem ser explicadas em termos de maior grau de interação do grupamento éster com β -CD. A degradação do MCO não foi completamente inibida pela complexação com a β -CD. Isto pode ser atribuído à localização do grupo éster, que não é eficientemente protegido do ataque nucleofílico. (SCALIA, 2002)

Com o objetivo de examinar o efeito do HP- β -CD e do β -CD no comportamento fotoquímico do MCO, experimentos de fotólise foram realizados em loção (emulsão o/a). O MCO livre ou complexado foi incorporado nas loções e expostos durante quatro horas ao simulador solar. O único

produto originado da decomposição do MCO foi o seu isômero cis. Esta isomerização fotoinduzida diminui a sua atividade fotoprotetora (PATTANAARGSON, 2004). Na preparação contendo MCO, o percentual de perda do agente fotoprotetor atingiu 35,2%. Uma redução estatisticamente significativa da degradação para 30,8% foi observada na loção, contendo complexo MCO/ β -CD. Em estudos anteriores foi demonstrado que a efetividade da complexação das ciclodextrinas em emulsões, pode ser dificultada pelo deslocamento competitivo de excipiente, o que diminui a interação do filtro solar com a cavidade do macrociclo. Esta abordagem levou ao uso de benzoato de sódio ao invés de ácido p-hidroxibenzóico metiléster como preservativo. Pois se sabe que este último interage com a β -CD. Sendo assim, uma diminuição de 26,1% no nível do filtro UV foi medido na loção contendo o complexo β -CD/MCO, enquanto que 35,8% do filtro solar foi perdido na irradiação da loção contendo MCO livre. Assim, a determinação in vitro do FPS das duas formulações mostrou que a complexação não exerce influência significativa sobre esta característica. (SCALIA, 2002)

Devido à importância da radiação UVA na contribuição para efeitos danosos do sol, produtos anti-solares com eficácia contra radiação UVA e UVB são recomendados. Em particular, a combinação de MCO com o filtro UVA BM-DBM, é freqüente em preparações solares típicas. Com o objetivo de simular estas condições, estudos adicionais foram realizados em loções contendo BM-DBM em conjunto com MCO ou com o seu complexo com β -CD. O grau de degradação do MCO diminuiu na presença do BM-DBM, devido ao efeito protetor deste último contra a decomposição adicional causada pelos raios UVA da luz solar simulada. Ainda neste caso, a fotoinstabilidade do MCO foi reduzida de 30,3% para 24,2% devido a sua inclusão na β -CD. Além disso, a perda percentual de BM-DBM, após a irradiação, foi menor (16,4%) na formulação contendo MCO complexado quando comparado à loção contendo MCO livre, cuja perda percentual foi de 22,6%. Como o BM-DBM sofre reação fotoinduzida com o MCO, sua maior estabilidade na presença do complexo β -CD/ MCO pode ser utilizada para impedir a interação com o filtro UVB, encoberto pela ciclodextrina. (SCALIA, 2002)

No trabalho de Coelho, 2001 em que se estudou a inclusão de vários filtros solares em ciclodextrinas, os filtros solares que apresentaram melhores resultados de inclusão em ciclodextrinas foram o MCO e o octil dimetil PABA por apresentarem menor quantidade de grupos polares e subunidade alifática; e o método no qual se obteve um rendimento satisfatório foi o kneading onde se observou um rendimento de inclusão de 99,85% para o metoxicinamato de octila e 110,81% para o octil dimetil PABA. A técnica de *kneading* (empastassem) baseia-se na mistura da ciclodextrina com a molécula hóspede, seguida da adição de pequenas quantidades de solvente, sendo o calor gerado pelo atrito a energia necessária para que o processo de inclusão ocorra. Esta técnica tem eficiência reconhecida quando a molécula hóspede apresenta baixa solubilidade em água. (COELHO, 2001)

Os testes de FPS tanto *in vitro* como *in vivo*, tiveram resultados semelhantes. Nos resultados de FPS *in vivo* dos inclusos, pode-se observar um aumento do FPS do MCO provavelmente devido a melhor estabilização do filtro solar e menor metabolização graças à sua inclusão na cavidade da β -CD.

A β -CD foi escolhida para a realização dos testes de inclusão devido ao volume de sua cavidade ser o mais compatível com o volume da molécula de p-metoxicinamato de octila. Outras ciclodextrinas como a α -CD, a γ -CD e a β -dimetilciclodextrina levaram a baixos rendimentos de inclusão e não mostraram nenhuma vantagem em relação a β -CD. (COELHO, 2001)

2.5.2. Lipossomas

Lipossomas são vesículas em forma de bicamada fosfolipídica que encapsulam um espaço aquoso (Figura 4) cujo tamanho varia de 0,03 a 10 μ m de diâmetro. Eles são compostos de uma ou várias membranas lipídicas que envolvem estes pequenos compartimentos aquosos. Estas vesículas podem encapsular fármacos hidrossolúveis nos espaços aquosos e fármacos lipossolúveis podem ser

incorporados dentro das membranas. Os lipossomas podem ser administrados pelas vias parenteral, tópica, inalatória ou, possivelmente, por outras rotas de administração. (ANSEL, 1999)

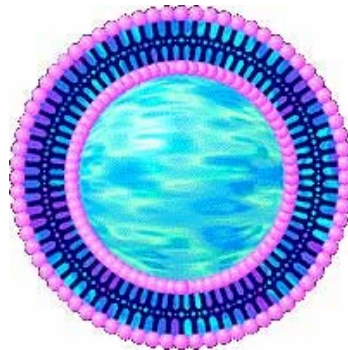


Figura 4 – Esquema de um Lipossoma, sua bicamada (apolar) e o compartimento interno (aquoso).
(extraído do site www.bunsen.de/jdc/woche31.htm)

Numerosas configurações são possíveis para os lipossomas, incluindo esferas e cilindros. Os lipossomas esféricos podem ser unilamelares (uma só camada) oligolamelares (poucas camadas) ou multilamelares (mais de cinco camadas) possuindo uma estrutura semelhante à de uma cebola. Eles também são chamados de LUV (vesículas grandes unilamelares), SUV (vesículas pequenas unilamelares), OLV (vesículas oligolamelares), MVL (lipossomas multivesiculares) e MLV (vesículas grandes multilamelares). Os menores lipossomas geralmente medem entre $0,02\mu\text{m}$ a $0,2\mu\text{m}$ e os maiores entre $0,2\mu\text{m}$ a $10\mu\text{m}$ (ANSEL, 1999 e MÜLLER-GOYMANN, 2004).

Os fosfolípidios que compõem os lipossomas são anfifílicos possuindo uma cabeça hidrofílica ou polar e uma cauda hidrofóbica ou apolar. A cauda hidrofóbica é composta de ácidos graxos contendo geralmente de 10 a 24 carbonos, e a cabeça polar contém ácido fosfórico ligado à porção solúvel em água; a sua composição pode variar consideravelmente. (ANSEL, 1999)

As vantagens dos lipossomas incluem o seguinte: 1) fármacos encapsulados em lipossomas são levados intactos para vários tecidos ou células e podem ser liberados quando o lipossoma é destruído, possibilitando liberação em sítio específico e fármacos direcionados a um alvo (*targeted*

drug); 2) lipossomas podem ser usados tanto para fármacos hidrofílicos como lipofílicos sem precisar de modificação química; 3) outros tecidos e células do organismo ficam protegidos do fármaco até ele ser liberado pelos lipossomas, diminuindo assim, a toxicidade do fármaco; 4) o tamanho, a carga e outras características podem ser alteradas dependendo do fármaco e do objetivo do uso do produto. As desvantagens dos lipossomas incluem a sua tendência a serem pegos pelas células do sistema retículo endotelial e a lentidão da liberação do fármaco quando os lipossomas são apanhados por fagócitos por meio de endocitose, fusão, adsorção de superfície ou troca de lipídio (ANSEL, 1999).

Muitos avanços foram feitos na preparação de lipossomas incluindo composição, tamanho, classificação e aumento de estabilidade. A estabilidade tem sido um problema, mas lipossomas estáveis já podem ser preparados. Os lipossomas estão sendo investigados por muitos anos como potenciais sistemas de liberação de fármacos e agora estão no mercado (ANSEL, 1999).

O lipossoma é um dos mais recentes veículos para produtos dermatológicos e cosméticos, por apresentar estrutura lamelar semelhante a dos lipídios da pele. Os lipossomas compostos de fosfatidilcolina que, devido ao grupo hidrofílico, relativamente pequeno, interagem com os lipídios da pele, constitui o veículo apropriado para incorporar princípios ativos de aplicação tópica, na epiderme (EGBARIA, 1991; 1993). Como exemplo, pode-se citar as preparações solares e bronzeadoras. Existe uma indicação de que o grau de interação entre a dispersão vesicular e a pele depende, principalmente, das propriedades físico-químicas do fosfolipídio do qual os lipossomas são compostos. Em geral, os lipossomas intactos não penetram além da camada córnea (LASCH, 1991). Os lipossomas penetram apenas nas camadas superficiais da epiderme na pele íntegra, havendo penetração mais profunda ou sistêmica somente na pele lesionada (SCHALLER, 1996; SCHIMID, 1996; BOUWSTRA, 2002)

Estudos realizados com várias substâncias lipofílicas e hidrofílicas empregando células de difusão para preparações em lipossomas e preparações convencionais, provaram que as substâncias ativas lipofílicas, em lipossomas, apresentam menor absorção sistêmica e que as hidrofílicas o apresentam ainda menor (MEZEI, 1988). Em outro estudo utilizando células de difusão, foi verificada

a permeação de substâncias lipofílicas, como a progesterona e a hidrocortisona, inclusas em lipossomas multilamelares que atravessam a pele com facilidade. A glicose, no entanto, que é altamente polar, está muito pouco disponível (GANESAN, 1984). A penetração dos lipossomas não é absolutamente necessária para a liberação da substância ativa. Se o lipossoma adere ao corneócito, este pode liberar a substância ativa pela difusão ou fusão da parede do lipossomas com os lipídios ou proteínas do estrato córneo. A intensificação da penetração na pele é conseguida com a utilização de substâncias promotoras de penetração, que removem reversivelmente a barreira de resistência do estrato córneo dentro da rota intercelular (BARRY, 1987).

Os filtros solares são normalmente veiculados em preparações cosméticas convencionais, como cremes, loções, óleos e géis. Com o intuito de proteger o indivíduo contra os danos da radiação UV, vem crescendo o número de produtos com fotoprotetores, aumentando o risco de reações alérgicas (FAIRHURST, 1995). É importante assinalar, que os lipossomas não são somente um novo tipo de formulação, mas também possuem características de componente ativo dermatológico e cosmético. Podem-se mencionar os fosfolipídios vegetais, por possuírem alto conteúdo de ácido linoléico e ácido α - linoléico, que são ácidos graxos essenciais. A aplicação dos lipossomas em cosméticos, tais como, hidratantes, para tratamento da pele, fotoprotetores, vitaminas e agentes bronzeadores em cremes de limpeza, cremes hidratantes, produtos para os cabelos, entre outros, aumenta o valor comercial dos produtos (LAUTENSCLAGER, 1990a; HAUMANN, 1992).

As formulações com lipossomas têm seus outros componentes limitados pela incompatibilidade com o lipossoma, tais como, tensoativos, etanol, propilenoglicol, glicerina em concentrações superiores a 10% podem destruir a estrutura do lipossoma, dentre outros componentes presentes nos cremes (BONI, 1984; NACHT, 1995). A formulação em gel vem solucionar este problema (LAUTENSCLAGER, 1990b). A inclusão dos lipossomas numa matriz gel tridimensional altera o perfil cinético para a liberação do material aprisionado, oferecendo uma liberação prolongada

da substância ativa, prevenindo a instabilidade associada com a interação entre os lipossomas, fusão e agregação (HAYWARD, 1990).

Com o objetivo de verificar a substantividade do lipossoma preparado com Phospholipon 90® foram preparadas formulações consideradas convencionais e preparações com lipossomas, foram determinados seus fatores de proteção solar *in vitro* e *in vivo*. Comparou-se o lipossoma com Phospholipon 90® a 280 mM com uma formulação tipo emulsão com a mesma concentração de p-metoxicinamato de octila e fez-se também a comparação da formulação gel com lipossomas com filtro solar com a formulação de um gel só com filtro solar, ambas também na mesma concentração. Foi incorporado no gel contendo 3,2% de p-metoxicinamato de octila e extrato de alecrim a 1 mg/ml, quantidade de lipossoma a 280 mM com conteúdo de filtro solar igual a 1% perfazendo um total de 4,2% de p-metoxicinamato de octila. Este gel (lipossomagel) apresentou através de testes *in vivo* um FPS de 9,3 e após teste de resistência à água, um FPS de 7,3, demonstrando um efeito reservatório do lipossoma no estrato córneo (substantividade). A mesma concentração de p-metoxicinamato de octila 4,2% foi incorporada a um gel sem lipossomas, e o mesmo apresentou *in vivo* um FPS de 7,7 demonstrando que além do efeito reservatório, existe no lipossomagel um efeito sinérgico com intensificação do FPS, provavelmente devido a uma reflexão da luz na superfície das vesículas ou na proteção do material encapsulado em sofrer degradação (GARCIA, 1998).

O lipossoma com filtro solar, quando encapsulado em uma formulação gel, aumenta de forma significativa a ação deste frente à radiação UV. Intensificando o FPS e apresentando resistência à água. A formulação lipossomagel se torna bastante útil pelo seu caráter não oleoso, na prevenção dos efeitos negativos da radiação solar em usuários que fazem uso diário de filtro solar (GARCIA, 1998).

2.5.3. Carreadores Particulados

Os carreadores particulados, investigados por muitos anos, incluem emulsões óleo/água (O/A), lipossomas, micropartículas e nanopartículas. Vesículas fosfolipídicas redescobertas como lipossomas em 1965 por Bangham encontraram um caminho no mercado de cosméticos em 1986. Foi o produto antienvhecimento Capture (Dior) que abriu caminho para os produtos farmacêuticos baseados em lipossomas. Entretanto, o número total de produtos no mercado é ainda limitado. Uma das razões para isso – afora os possíveis problemas tecnológicos – é a indisponibilidade de um produto farmacêutico de baixo custo (MÜLLER, 2000).

O número de produtos baseados em micropartículas poliméricas no mercado é limitado. Após a introdução da primeira geração de produtos microparticulados, há apenas um aumento limitado no número desses produtos no mercado. A situação é ainda pior para nanopartículas poliméricas, após mais de trinta anos de pesquisa, este sistema de liberação praticamente não existe no mercado. Há um bom número de razões bem conhecidas, dessas, duas devem ser realçadas, a citotoxicidade dos polímeros e a falta de um método de produção em larga escala adequado. Por ter um tamanho de poucos micrômetros, o polímero pode ser internalizado pelas células (macrófagos) e a sua degradação dentro das células pode levar a efeitos citotóxicos. Um pré-requisito para a introdução de produto no mercado farmacêutico é a disponibilidade de um método produtivo de larga escala adequado, e isto significa, um método de baixo custo, que leve a um produto com qualidade aceitável pelas autoridades regulatórias. Desde o início dos anos 90 a atenção de vários grupos de pesquisa voltou-se para uma alternativa às nanopartículas poliméricas, as nanopartículas de lipídio sólido (SLN). Estes lipídios podem ser usados por que são bem tolerados pelo organismo. A produção em larga escala pode ser realizada de maneira simples e com baixo custo usando homogeneização de alta pressão. Uma alternativa é utilizar a produção de SLN via microemulsões (MÜLLER, 2000).

Uma área de aplicação recentemente descoberta para o uso de SLN é em cremes fotoprotetores. Um dos efeitos adversos dos filtros solares é a penetração na pele e a conseqüente irritação. Filtros solares particulados, como o dióxido de titânio, também podem penetrar na pele. Isto pode ser evitado ou minimizado pela inclusão de filtros solares moleculares ou particulados na matriz de SLN. Surpreendentemente, descobriu-se que a própria SLN também tem efeito fotoprotetor. Devido ao seu caráter particulado são capazes de refletir a luz solar. Filtros solares moleculares têm ação sinérgica quando incorporados em SLN por isso são muito mais eficientes ao mesmo tempo em que os efeitos colaterais são reduzidos (MÜLLER, 2000).

As nanopartículas de lipídio sólido (SLN) foram introduzidas como carreadores de componentes ativos em cosméticos, e de fármacos em medicamentos. Foi mostrado que eles agem como carreadores ativos para filtros solares devido ao seu caráter particulado, isto é, eles agem como bloqueadores físicos. A incorporação de filtros solares químicos dentro de SLN aumenta de forma sinérgica as características protetoras (WISSING, 2002a)

Foram realizados estudos investigando-se a influência dos carreadores SLN na liberação e absorção percutânea do fotoprotetor modelo oxibenzona, *in vivo* e *in vitro*, comparando com a emulsão O/A convencional. Usando a técnica da homogeneização a quente, foram produzidas dispersões de SLN estáveis e nanoemulsões contendo oxibenzona em concentrações maiores que 4% (mais de 10% com relação à fase oleosa). Durante o período de duzentos dias, o tamanho médio de partículas o índice de polidispersão foi investigado por PCS (espectroscopia de correlação de fóton) e não se alterou significativamente. (WISSING, 2002a)

A incorporação de filtros solares na matriz lipídica foi bem sucedida em concentrações maiores que 15% com relação a concentração lipídica. Todas as dispersões de SLN produzidas possuíam um alto potencial zeta (-49,4 mV) sugerindo boa estabilidade em longo prazo. (WISSING, 2002a)

Em estudos de liberação empregando o modelo livre de membrana – método *in vitro* – foi observado que a taxa de liberação da oxibenzona diminuiu em formulações do tipo SLN quando comparamos à emulsão, então maior quantidade de ativo permanece na superfície da pele. A taxa de liberação da oxibenzona diminui quando aumentamos sua concentração total na formulação, aumentando mais ainda a concentração na superfície da pele levando a um aumento no FPS. (WISSING, 2002a)

Nas emulsões, a oxibenzona é incorporada ao óleo menos firmemente. Nas formulações SLN, as moléculas de oxibenzona são incorporadas dentro da matriz cristalina e sua mobilidade difusional é diminuída. Além disso, verificou-se que, após a aplicação na pele de formulações contendo SLN, a água evapora levando a formação de filme, sendo assim, a penetração da substância ativa é diminuída. (WISSING, 2002a)

A taxa de liberação da oxibenzona também depende da sua concentração total na formulação. Apesar da concentração total, a liberação da oxibenzona é sustentada e diminui quando usamos formulações com SLN ao invés de emulsões. O coeficiente de difusão diminui com o aumento do preenchimento do SLN com fármaco, portanto mais oxibenzona permanece na superfície da pele onde atua como filtro solar. (WISSING, 2002a)

As propriedades do SLN de refletir e dispersar a radiação UV depende fortemente do grau de cristalinidade da matriz lipídica. Portanto, é desejável incorporar o filtro solar molecular em matrizes altamente cristalinas. Foi estudada a eficiência de um carreador nanoparticulado altamente cristalino (CLN) para o filtro solar benzofenona-3, um filtro solar antiUVA altamente lipofílico. A incorporação de 5% de benzofenona-3 dentro de dispersões de CLN levou aos mesmos valores de absorção que 10% de benzofenona-3 em emulsão. A quantidade de benzofenona-3 pode ser reduzida em 50% mantendo o nível de fotoproteção. Investigações *in vitro* mostraram que o uso de CLN como carreador para filtros solares moleculares oferece a possibilidade de criar formulações fotoprotetoras mais eficazes e seguras com conteúdo reduzido de filtro solar. Isto se deve ao fato do CLN agir como

bloqueador físico e, portanto, também representa um carreador ativo para filtros solares moleculares. (WISSING, 2002b)

A incorporação de MCO em nanocápsulas de poli-caprolactona diminui a liberação quando comparada com a mesma emulsão sem nanocápsulas. São também capazes de fornecer liberação controlada do MCO, portanto o filtro permanece mais tempo na superfície da pele. As emulsões contendo nanocápsulas diminuem a penetração do MCO na pele suína quando comparada com a mesma emulsão sem nanocápsulas. Isso mostra a importância do encapsulamento na penetração cutânea do MCO (JIMÉNEZ, 2004).

As microsferas de lipídio sólido (SLM) contendo MCO são capazes de oferecer liberação controlada, diminuir a penetração na pele e aumentar sua fotoestabilidade. Podem então ser sugeridos como carreadores para o MCO com o objetivo de diminuir as taxas de liberação e penetração deste filtro UV. Após a exposição ao simulador solar mostrou a mesma proteção que a formulação com o filtro livre (YENER, 2003).

O encapsulamento do filtro MCO em nanopartículas de poli-D,L-lactídio-co-glicolídio (PLGA) reduziu a fotodegradação deste filtro solar em emulsão (PERUGINI, 2002)

2.6. CEDÊNCIA / LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

A formulação tópica é um sistema complexo e a dinâmica de liberação da substância ativa de seu veículo tem sido objeto de investigação por muitos anos. O sistema de células de Franz é um método de liberação *in vitro* simples, reprodutível, geralmente aplicado para todas as formas farmacêuticas de uso tópico. Desenvolvido para medir a liberação *in vitro* é recomendado pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) GUIDANCE FOR INDUSTRY (1997) como medida de equivalência para produtos de formulações semi-sólidas (UNITED STATES, 1997).

A liberação *in vitro* é um dos métodos padrão que podem ser usados para caracterizar uma forma farmacêutica semi-sólida para uso tópico como cremes, géis e pomadas. Alterações importantes nas características da formulação de um produto farmacêutico ou nas propriedades termodinâmicas do fármaco contido na formulação podem mostrar uma alteração significativa na liberação do fármaco, já que a liberação *in vitro* de um fármaco é uma propriedade da formulação que o contém (UNITED STATES, 1997).

A velocidade de liberação dos produtos tópicos dermatológicos pode ser medida empregando um sistema bicompartimental como célula de difusão vertical com membrana artificial e meio receptor adequado. A membrana artificial serve como um suporte separando a formulação do meio acceptor, e não deve ser velocidade limitante nos processos de liberação do fármaco. As membranas artificiais podem ser constituídas de acetato de celulose, nitrato de celulose e polissulfona (HAIGH, 1994) as quais não oferecem resistência à passagem do fármaco do compartimento doador para o compartimento receptor, possibilitando, desta forma, a quantificação do fármaco neste último, em função da partição entre o veículo e o meio acceptor.

O meio receptor é constituído de uma solução adequada que seja compatível com a metodologia analítica empregada na quantificação do fármaco, e que promova condição *sink*, condição na qual o volume empregado de solução receptora seja cinco vezes maior que o ponto de saturação do fármaco (ZATZ, 1995). Geralmente utiliza-se uma solução com etanol e água ou uma solução tampão.

A atividade termodinâmica e a viscosidade têm um efeito dominante sobre a liberação da substância ativa do veículo(DAVIS, 1972). A velocidade de liberação do fármaco da formulação pode ser manipulada pela mudança da sua concentração, variação do coeficiente de partição e aumento de sua solubilidade na formulação. A liberação é mais rápida em soluções do que em suspensões, cremes ou pomadas e pode refletir o coeficiente de difusão do fármaco entre o veículo e a fase receptora (SHAH, 1991)

A avaliação *in vitro* da penetração e permeação cutânea de fármacos também pode ser avaliada por um sistema bicompartimental de difusão vertical, empregando membrana natural. Dentre os vários tipos de pele animal (rato, camundongo com e sem pelo, macaco rhesus, cobra) que podem ser utilizadas, recentemente, tem-se empregado a pele suína devido a sua similaridade com a pele humana (HAIGH, 1994).

A quantidade de fármaco nas alíquotas removidas da fase receptora pode ser analisada por CLAE ou outro método analítico. Uma curva da quantidade de fármaco por unidade de área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) contra o tempo (min) resulta numa reta, cuja inclinação representa a taxa de liberação. Esta medida de taxa de liberação é específica para cada formulação e é usada para monitorar a qualidade do produto (UNITED STATES, 1997).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi comparar a velocidade de liberação *in vitro* de três formulações sob a forma de gel, a primeira contendo MCO livre, a segunda contendo MCO incluído em β -ciclodextrina e a terceira contendo MCO incluído em lipossoma. Para isso foram realizados testes de cedência *in vitro* utilizando células de difusão do tipo Franz e membrana artificial de acetato de celulose com o objetivo de verificar a capacidade de liberação do filtro solar em cada formulação testada.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar as três formulações contendo o filtro solar MCO;
- Determinar o melhor método para a purificação do complexo β -ciclodextrina/p-metoxicinamatode octila (β -CD/MCO);
- Verificar a formação do complexo β -CD/MCO e do lipossoma;
- Determinar o rendimento de inclusão do complexo β -CD/MCO e do lipossoma com MCO incluído;
- Determinar o FPS *in vitro* das formulações;
- Realizar teste de liberação *in vitro* utilizando a célula de difusão do tipo Franz.

4. MATERIAIS

4.1 MATÉRIAS-PRIMAS

Ácido Bórico - grau farmacêutico – Henrifarma

Água destilada

Álcool 96° GL - grau farmacêutico– Rezende

Aminometilpropanol 95% - grau farmacêutico - Viafarma

Carbômero, carboxipolimetileno ou Carbopol 940[®] - grau farmacêutico – Galena

β-Ciclodextrina - grau Farmacêutico – Wacker

Colesterol - grau farmacêutico – Sigma

Glicerina bidestilada – grau farmacêutico - Galena

Hidroxietilcelulose - grau farmacêutico – Viafarma

Metilparabeno - grau farmacêutico – Galena

Phospholipon 90 NG[®] - grau farmacêutico – Phospholipid

p-Metoxicinamato de Octila - grau farmacêutico – Spectrum Química

Polissorbato 80 - grau farmacêutico – Spectrum

Tripalmitina - grau farmacêutico – Sigma

4.2. REAGENTES

Ácido Bórico P.A. – Vetec

Água bidestilada - CLAE

Borato de Sódio P.A. – Vetec

Brometo de Potássio - Infravermelho - Shimadzu Corporation

Cloreto de Sódio P.A. – Merck

Clorofórmio P.A. – Vetec

Diclorometano P.A. – Vetec

Etanol 95% P.A. – Vetec

Fosfato de Potássio Monobásico P.A. – Vetec

Fosfato de Sódio Bibásico P.A. – Vetec

Metanol P.A. – Vetec e Para CLAE – Tedia

Polissorbato 80 P.A. – Vetec

Tris (Hidroximetil Amino Metano) P.A. – Vetec

4.3. PADRÃO DE REFERÊNCIA SECUNDÁRIA DE *p*-METOXCINAMATO DE OCTILA

Como não há disponibilidade de substâncias de referência dos filtros solares pela Farmacopéia Brasileira nem por qualquer outra, utilizou-se um padrão de referência secundária, o *p*-metoxicinamato de octila com teor de pureza declarado de 98,5%, cedido pela empresa Spectrum Química Ltda.

4.4. EQUIPAMENTOS

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência

Bomba Waters 510

Detector de Ultravioleta Waters 486

Integrador Waters Data Module, 746/ Hamilton 80665

Coluna – Bondapak C18, Waters, número de série T41731P05

Espectrofotômetro UV-Visível

Shimadzu UV – 2401PC

Cubeta de Quartzo de 1,0 cm de caminho óptico

Espectrofotômetro de Infravermelho

Shimadzu FTIR – 8300

Célula do Tipo Franz

Hanson Research – 58-001-610

15mm x 7mL

Parte superior padrão para pomadas, cremes e géis

Pipeta para semi-sólidos de êmbolo

Transferpettor de 200 a 1000 μ L n° 702806

BRAND Laboratory Equipment Manufacture

Rotaevaporador R-114 BÜCHI

Banho de água B-480 BÜCHI

Espectrofotômetro de Ressonância Magnética Nuclear

Bruker DRX 400

Microscópio Óptico de Luz Polarizada

Axioplan 2 Zeiss e Máquina fotográfica digital SIS Color View XS, acoplado ao software AnalySIS para análise de imagens. Objetiva com aumento de 100 vezes.

Membrana de Acetato de Celulose

Dialysis tubing - Sigma

27 mm de diâmetro, 0,2 μm de tamanho de poro, 43 mm de espessura

Ultrassom

Ultrasonic cleaner Unique modelo: USC - 2850

Agitador com misturador em hélice

Fisatom Modelo: 713 D

Membrana filtrante Millipore 0,45 μm

5. METODOLOGIA

5.1. PREPARO DOS SISTEMAS DE LIBERAÇÃO

Foram utilizadas para este estudo formulações preparadas anteriormente em outros trabalhos em que o filtro solar *p*-metoxicinamato de octila foi incluído nos seguintes sistemas de liberação: β -ciclodextrina (COELHO, 2001) e lipossomas (GARCIA, 1998). Estas formulações serão comparadas entre si e a um gel de carbopol contendo 4% do filtro solar anti UVB MCO livre.

5.1.1. Complexo de Inclusão β -Ciclodextrina/*p*-Metoxicinamato de Octila (β -CD/MCO)

5.1.1.1. Inclusão do MCO em β -CD

O método utilizado para a inclusão de MCO em β -CD é o método de *kneading* (empastagem) que consiste na mistura da ciclodextrina com a substância que se deseja incluir formando uma pasta. Este método é o mais indicado para substâncias insolúveis em água. (MARQUES, 1994; DUCHENE, 1993)

Em um gral de porcelana foram misturados por cinco minutos, com auxílio de um pistilo, 14,6 g de β -ciclodextrina e 7,4g de *p*-metoxicinamato de octila, adicionando-se a esta mistura 1,0 mL de uma solução de etanol a 70%, adquirindo o conjunto um aspecto de granulado. O produto resultante (22,0 g de massa total) foi transferido para um moinho de bolas constituído de um cilindro de 11 cm de comprimento por 8 cm de diâmetro, possuindo uma carga de bolas de porcelana (1,0 cm de diâmetro médio) igual a 27g. A mistura foi deixada no moinho por 1h. Sendo posteriormente descarregada e seca em estufa à 55°C durante 30 minutos.

5.1.1.2. Purificação do Complexo β -CD/MCO

De acordo com Coelho 2001, o melhor método para o preparo do complexo β -CD/MCO é o *kneading*. Mas não foi estabelecido um método para a purificação do complexo formado que retirasse o excesso de filtro solar sem que o complexo seja desfeito. Para isso, o complexo formado pelo *kneading* foi dividido em três partes e cada uma foi lavada com uma solução aquosa de etanol a 50%, metanol a 50% e metanol a 70%.

5.1.1.3. Caracterização do Complexo de Inclusão por:

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

A espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) é basicamente uma outra forma de espectrometria de absorção, semelhante à espectrometria de infravermelho ou de ultravioleta. Sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequência (rf) em uma frequência governada pelas características estruturais da amostra. A absorção é função de determinados núcleos da moléculas (SILVERSTEIN, R.M., 1994).

Após a lavagem do complexo formado as amostras foram analisadas por RMN ^1H em duas dimensões para a caracterização do complexo. Os espectros foram registrados em um espectrômetro (400 MHz), as amostras foram solubilizadas a uma concentração de 10 mM em DMSO- d_6 . Foram avaliadas as diferenças entre os deslocamentos químicos do MCO livre e incluso em β -ciclodextrina, resultante da purificação com etanol a 50% e metanol a 50 e a 70%.

b) Espectrometria de Infravermelho

Baseada na diferença vibracional das ligações químicas presentes em diversas substâncias químicas, a espectrometria de infravermelho é um ensaio de identificação por excelência. Apesar de pequenas impurezas presentes na amostra não alterarem significativamente o espectro, diferenças de polimorfismo, estrutura cristalina, grau de hidratação ou outras características macroscópicas da substância podem gerar diferenças no espectro (SILVERSTEIN R.M, 1994).

Nesta técnica, a região intermediária do espectro eletromagnético é a mais empregada para fins de identificação. A amostra sólida é então triturada com cerca de 100-200 mg de brometo de potássio seco e bem pulverizado, homogeneizada e introduzida em molde para compressão em prensa hidráulica. A pastilha obtida é então fixada em suporte próprio e submetida à leitura.

5.1.1.4. Determinação do Rendimento de Inclusão por CLAE

O rendimento da inclusão do MCO em β -CD foi determinado através de uma curva padrão com pontos nas concentrações de 10,0 30,0 50,0 100,0 e 150,0 $\mu\text{g/mL}$. Estas soluções foram obtidas a partir de uma solução estoque de concentração igual a 500 $\mu\text{g/mL}$. Cada solução padrão foi feita em triplicata e cada uma foi injetada duas vezes no cromatógrafo. A média das áreas resultantes das injeções um e dois constituiu um ponto na curva. A curva constituiu-se de 15 pontos. As Amostras foram diluídas na fase móvel Metanol:Água (80:20) (RIBEIRO, 2004). Cerca de 100 mg do complexo β -CD/MCO foram pesados e diluídos com a fase móvel em um balão volumétrico de 100,0 mL. Deste balão foi retirada uma alíquota de 1,0 mL e diluída para um balão volumétrico de 10,0 mL. Esta solução foi injetada no cromatógrafo líquido.

5.1.2. Lipossoma com p-Metoxicinamato de Octila

5.1.2.1. Preparo dos Lipossomas Contendo MCO

Os lipossomas foram obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico. Os componentes dessa preparação e suas concentrações estão listados na tabela 1 e dividem-se em fase oleosa e fase aquosa. A fase oleosa é composta de Phospholipon 90[®], colesterol e o filtro solar MCO. Esta fase oleosa foi dissolvida em clorofórmio. A mistura foi evaporada sob pressão reduzida em rotaevaporador por 2 horas em banho-maria a 60°C. Deixou-se a fase oleosa descansar por 24 horas. Após este tempo foi verificada a presença de clorofórmio e o balão foi levado ao rotaevaporador até que todo o solvente fosse eliminado. Somente após a evaporação completa do solvente foi adicionado o tampão TRIS (Tris[hidroximetil]aminometano) pH 6,8 para entumescer o filme lipídico sob agitação em vortex por 15 minutos. O lipossoma preparado possui concentração de 280 mM/mL de Phospholipon 90[®] com MCO na concentração de 20% em relação ao total de lipídios. Após a agitação a preparação lipossomal foi filtrada em um filtro Millipore[®] com membrana de policarbonato de 0,4 µm e gás nitrogênio para pressionar a passagem do material.

Tabela 1 – Componentes para preparo de MCO incluso em lipossoma.

Componentes	Concentrações (mM/mL)
<i>Fase Oleosa</i>	
Phospholipon 90 [®]	280,0
Colesterol	80,0
p-metoxicinamato de octila	72,0
<i>Fase Aquosa</i>	
Tampão TRIS	50mL

5.1.2.2. Verificação da formação dos lipossomas por microscopia óptica de luz polarizada

Após o preparo, a suspensão contendo os lipossomas foi submetida à microscopia óptica de luz polarizada para confirmar a formação das vesículas. A suspensão contendo os lipossomas foi diluída colocando-se uma gota em aproximadamente 1 mL de tampão TRIS. A amostra foi então depositada sobre uma lâmina e coberta com uma lamínula para a observação em microscópio utilizando-se objetiva com aumento de 100 vezes.

5.2. PREPARO DAS FORMULAÇÕES

5.2.1. Gel de Carbopol com MCO livre

Foi preparado um gel de carbopol com 4% de MCO livre com o intuito de comparar a cedência das formulações contendo sistemas de liberação com esta contendo o filtro solar livre.

Os componentes da formulação com as concentrações estão listados na tabela 2. Com 24 horas de antecedência, adicionar o ácido bórico e o Carbopol 940[®] na quantidade total de água destilada e deixar em maceração. Sob agitação, juntar o álcool, a glicerina e o aminometilpropanol. Adicionar o polissorbato 80 e o MCO sempre sob agitação. Ajustar o pH que deve ser entre 5,5 e 6,5.

Tabela 2 – Formulação gel de carbopol com MCO a 4%

Componente	Funcionalidade	Concentração (%)
Carbopol 940 [®]	Gelificante	0,8
Ácido bórico	Preservativo	0,2
Glicerina	Umectante	2,5
Etanol 96° GL	Solvente	25
Aminometilpropanol 95%	Agente alcalinizante	0,5
MCO	Filtro solar antiUVB	4,0
Polissorbato 80	Tensoativo	1,17
Água destilada qsp		100,0g

5.2.2. Gel de Carbopol com MCO incluído em β -CD

O filtro solar incluído em β -CD foi incorporado em um gel de carbopol, componentes e concentrações na tabela 3, com concentração de 4,0% p/p de MCO. A técnica de preparação utilizada é semelhante a do item 5.2.1 sendo que é desnecessário adicionar polissorbato 80. O incluído β -CD/MCO é um sólido e é incorporado ao gel de carbopol pronto sob agitação manual utilizando glicerina como intermédio.

Tabela 3 – Formulação com MCO incluído em β -ciclodextrina

Componentes	Funcionalidade	Concentrações (%)
Carbopol 940 [®]	Gelificante	0,8
Ácido bórico	Preservativo	0,2
Glicerina	Umectante	2,5
Etanol 96° GL	Solvente	25
Aminometilpropanol 95%	Agente alcalinizante	0,5
<i>p</i> -metoxicinamato de octila (incluído em β -ciclodextrina)	Filtro Solar antiUVB	4,0
Água qsp		100,0g

Com a formulação pronta o FPS *in vitro* foi determinado e os testes de cedência em célula de Franz foram realizados.

5.2.3. Gel de Natrosol com MCO incluído em Lipossoma

Tabela 4 – Fórmula do MCO incluído em Lipossoma

Componentes	Funcionalidade	Concentração (%)
<i>Fase A</i>		
Hidroxietilcelulose	Gelificante	1,0
Metilparabeno	Preservativo	0,2
Água destilada		20,5 mL

Colocar a fase A em banho-maria, sob agitação, até completa dissolução.

Depois da formação do gel misturar as duas fases.

<i>Fase B</i>		
MCO	Filtro anti UVB	3,2
Lipossoma de 280 μ M com MCO incluso	Filtro anti UVB incluso	75,0g

5.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE MCO E DAS CONCENTRAÇÕES DESTE FILTRO SOLAR NAS FORMULAÇÕES POR CLAE

O teor do MCO utilizado como matéria-prima e a concentração real das formulações utilizadas neste trabalho foram determinados através da curva padrão obtida de acordo com a metodologia descrita no item 5.1.1.4. Para determinar o teor do MCO foram pesados exatamente 50,0 mg desta matéria-prima e diluídos com a fase móvel em um balão volumétrico de 100,0 mL. Desse balão foi retirada uma alíquota de 1,0 mL com pipeta volumétrica e diluída em balão volumétrico de 10,0 mL.

Para a determinação da concentração real das três formulações foram pesados 500 mg da formulação a ser analisada, transferidos para balão volumétrico de 50,0 mL e diluído com a fase móvel com ajuda de sonicação por 12 minutos. O volume foi completado e desse balão foi retirada uma alíquota de 1,0 mL com pipeta volumétrica e diluída em balão volumétrico de 10,0 mL. Após as diluições as amostras foram injetadas no cromatógrafo líquido.

5.4. DETERMINAÇÃO DO FPS *IN VITRO*

Todas as formulações citadas acima foram preparadas com concentrações conhecidas de *p*-metoxicinamato de octila e submetidas ao teste de FPS *in vitro* descrito por Mansur (Mansur *et al*, 1986) com o objetivo de fazer um controle de qualidade das formulações comparando a concentração de filtro solar com o FPS e a quantidade liberada pela formulação.

Técnica: pesar 500 mg (ou 500 μL) da amostra e transferir para balão volumétrico de 100,0 mL, contendo cerca de 30,0 mL do solvente. No caso de líquidos viscosos, pipeta Transferpettor Brand de 1000 μL com ponteira para líquidos viscosos. Dispersar as amostras. Completar o volume com o solvente e homogeneizar. Tomar uma alíquota de 1,0 mL de cada balão e transferir para balão volumétrico de 25,0 mL com o mesmo solvente e homogeneizar. Realizar as análises em triplicata. ($C = 0,2$ mg/mL ou 200 $\mu\text{g/mL}$)

Observação: quando for gel ou emulsão utiliza-se etanol como solvente, quando o produto for um óleo, utiliza-se isopropanol como solvente.

As absorvâncias foram obtidas com auxílio de um espectrofotômetro de UV, registrando o espectro de 220 a 450 nm. Foram registradas as leituras das três amostras nos seguintes comprimentos de onda: 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320 nm.

5.5. ANÁLISE DO TEOR DE FÓSFORO

A determinação quantitativa da concentração de fosfolipídios foi feita indiretamente, uma vez que, os lipídios secos podem conter quantidades consideráveis de solvente residual ou outros lipídios como contaminantes. Conseqüentemente, empregaram-se técnicas, nas quais se mediu o conteúdo de fósforo das amostras. O método indireto utilizado para dosar a quantidade de fosfolipídios nos lipossomas é o mesmo para determinar a quantidade de fosfolipídios nas lecitinas comerciais a serem dosadas.

O objetivo desta análise para o Phospholipon 90[®] foi determinar o teor real de fosfatidilcolina na matéria-prima comparando com o teor declarado pelo fabricante. No caso de formulações contendo o Phospholipon 90[®] o objetivo foi verificar o

rendimento da preparação comparando a quantidade real de fosfatidilcolina com a massa adicionada (BARTLETT 1959).

O método indireto para a análise de fósforo é o método de Bartlett. Neste método, o fosfolípido sofre primeiramente uma hidrólise ácida, transformando-o em fosfato inorgânico que ao reagir com o molibdato de amônio forma o ácido fosfomolibdico. Este por sua vez forma um complexo azul, utilizando o ácido ascórbico como agente redutor. A intensidade da cor é medida espectrofotometricamente e comparada aos padrões de calibração, através de uma curva padrão, o que fornece o conteúdo de fósforo e, conseqüentemente, o conteúdo de fosfolípidios. Este método é realizado para o cálculo do teor de fosfolípidios no Phospholipon 90[®] e para quantificar os fosfolípidios nas preparações contendo lipossomas (BARTLETT 1959).

5.6. ESTUDO DE CEDÊNCIA EM CÉLULA DE FRANZ

5.6.1. Dispositivo

A célula de difusão vertical é composta de um compartimento receptor (volume = 7,0 mL) e compartimento doador (Figura 5). O meio receptor foi agitado por misturador em hélice e agitador magnético (900 rpm). Uma membrana de acetato de celulose previamente hidratada foi disposta em cada um dos 6 dispositivos utilizados. O volume de 7,0 mL da solução receptora foi colocado no compartimento receptor. Um volume de 600 μ L (“dose infinita”) das formulações citadas anteriormente foi colocado sobre a membrana. A área do orifício da placa para disposição da amostragem é 1,77 cm². Aliquotas de 0,6 ml foram retiradas dos 6 dispositivos para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de 30 em 30 minutos durante 3 horas (FREITAS, 2003)

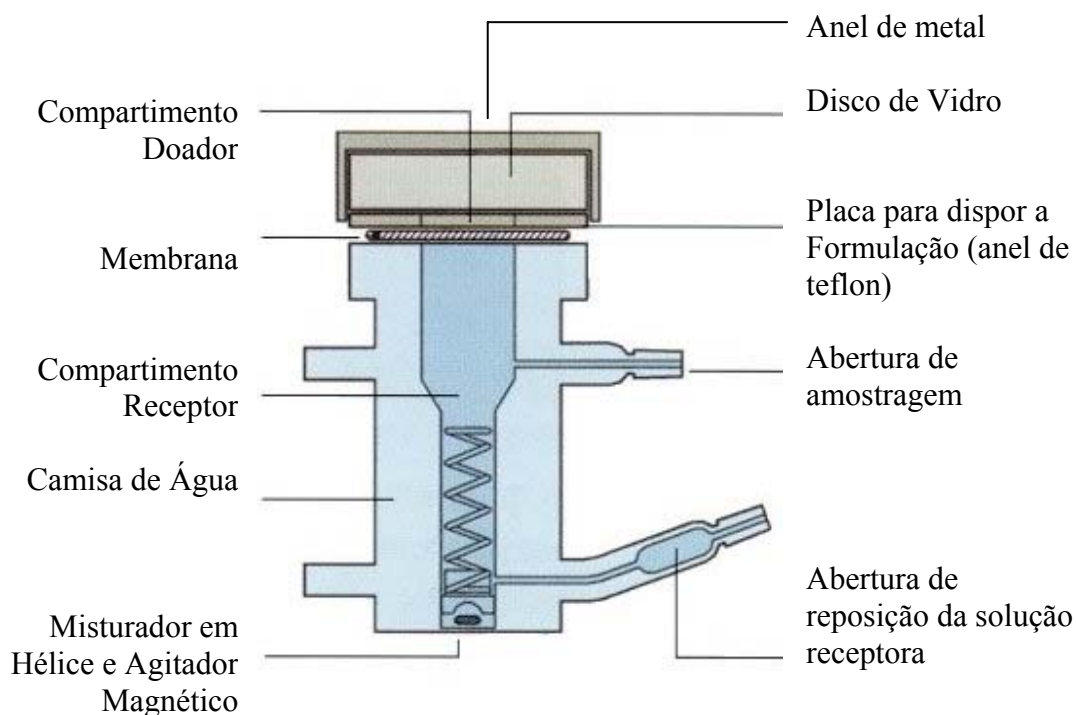


Figura 5 - Célula de difusão do tipo Franz utilizada nos estudos de liberação *in vitro*.

A célula de difusão do tipo Franz é o modelo bicompartimental mais empregado em estudos de liberação e de permeação *in vitro*. Possui um pequeno compartimento doador e uma câmara receptora. Nos estudos de permeação emprega-se membrana natural (pele humana, suína, de rato, com ou sem pelo). Para avaliação da cedência/partição utilizam-se membranas sintéticas (de celulose ou polímeros sintéticos) (FREITAS et al, 2003).

A solução do compartimento receptor deve fornecer condições *sink*. Para substâncias hidrofílicas, uma solução tampão é mais adequada, enquanto que para substâncias lipofílicas o uso de aditivos solubilizantes às vezes se faz necessário. (MOSER, 2001)

5.6.2. Solução Receptora

Antes de iniciarmos o estudo de cedência em células de difusão do tipo Franz foi preciso estabelecer qual a melhor solução receptora a ser utilizada.

O MCO é um líquido oleoso, insolúvel em água e muito solúvel em etanol. Para definir a solução receptora foi preciso fazer vários testes de solubilidade com o MCO em soluções de diferentes concentrações de etanol. YENER *et al*, 2003 usou para estudos de liberação *in vitro* do MCO incluso em microsferas uma solução receptora composta de tampão fosfato e etanol 25% com pH 7,4. Com base nesta informação foram comparadas três diferentes soluções receptoras. A primeira composta de salina tamponada pH 7,4 com 2% de polissorbato 80, a segunda foi uma solução aquosa de etanol a 30%, e a terceira uma mistura de 70% de salina tamponada pH 7,4 com 2% de polissorbato 80 e 30% de etanol. Foram realizados testes de solubilidade onde as concentrações de MCO das soluções saturadas foram analisadas por CLAE.

A salina tamponada foi preparada pesando-se os componentes da tabela 5 e transferindo-os para um balão volumétrico de 250 mL com a ajuda de água destilada. Adicionar aproximadamente mais 100 mL de água destilada. Agitar com o auxílio de um sonicador para acelerar a solubilização. Completar o volume e acertar o pH para 7,4 com solução de HCl 0,1 N ou NaOH 0,1 N se necessário

Tabela 5 - Composição da solução salina tamponada pH 7,4.

Componente	Concentração (%)
Fosfato e Sódio Dibásico	0,238
Fosfato de Potássio Monobásico	0,019
Cloreto de Sódio	0,8
Água destilada qsp	250 mL

5.6.3. Preenchimento da Célula de Franz

1. As células foram presas na placa agitadora. Os agitadores magnéticos e os misturadores em hélice foram introduzidos nas células. As conexões foram colocadas nas aberturas de amostragem e reposição de solução receptora;

2. Utilizando um becher cada célula foi preenchida com a solução receptora até a formação de um menisco convexo na abertura;

3. A membrana de acetato de celulose previamente hidratada (em 3 beckeres com água fervente, deixar as membranas por 5 minutos em cada um) foi então colocada, com cuidado para não ficar bolha de ar entre a solução receptora e a membrana;

4. A extremidade da abertura de reposição foi preenchida com a solução receptora utilizando uma pipeta automática de 200 μ l para retirar o ar da extremidade;

5. Um pouco de solução receptora foi injetada com a seringa na célula deixando extravasar para certificar que está completamente preenchida;

6. Foi verificada a presença de bolhas;

7. Após 30 minutos de equilíbrio coletou-se o tempo zero;

8. Imediatamente após a coleta do tempo zero retirou-se o anel de metal e o disco de vidro, para o preenchimento do orifício do anel de teflon com a formulação, espalhando uniformemente com a ajuda de uma espátula;

9. As células foram fechadas com o disco de vidro, o anel de metal e a garra;

10. A intervalos de 30 minutos foram coletadas novas amostras até um total de três horas de ensaio.

5.7. ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR CLAE

Coluna = WATERS C₁₈ 3,9 x 150mm

Fase móvel = Metanol : Água (80 : 20)

Fluxo da Fase Móvel = 1,3 mL/min

Comprimento de onda para detecção (λ) = 307 nm

Volume de Injeção = 20 μ L

Nessas condições, o tempo de retenção para o *p*-metoxicinamato de octila foi 7,8 minutos. A linearidade de resposta do método para avaliação de pequenas concentrações de MCO foi estabelecida através de uma curva padrão nas concentrações de 2,5 μ g/mL, 5 μ g/mL, 10 μ g/mL, 15 μ g/mL e 20 μ g/mL (VOLPATO et al, 1999).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DO FILTRO SOLAR MCO

A curva padrão obtida e a equação da reta estão apresentadas no gráfico 1. O coeficiente de determinação encontrado foi 0,9997 indicando a manutenção da linearidade da resposta na CLAE. A amostra contendo cerca de 50 µg/mL de MCO foi injetada no cromatógrafo líquido. Com a área obtida de 8136178 e através da equação da reta, foi calculado o teor real do MCO utilizado no preparo das formulações empregadas neste trabalho. O teor encontrado foi 99,7%.

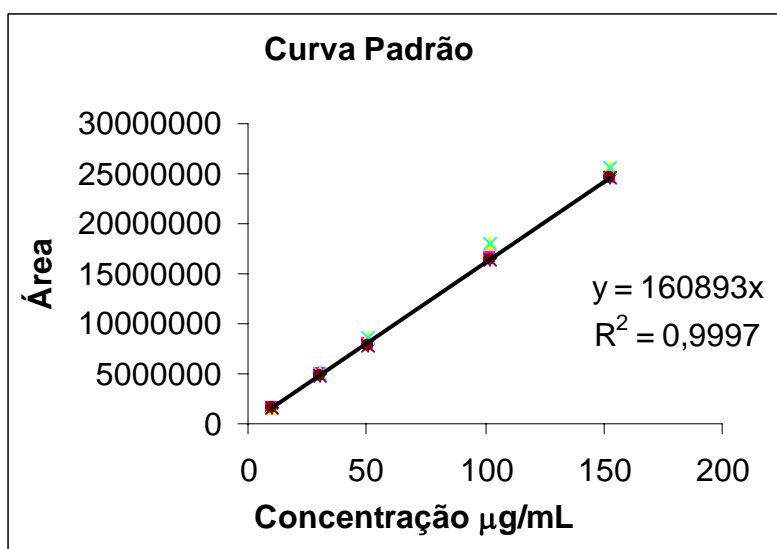


Gráfico 1 – Curva Padrão área x concentração de M em µg/mL obtida por CLAE

6.2. CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO β -CD/MCO

6.2.1. Por Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN

^1H)

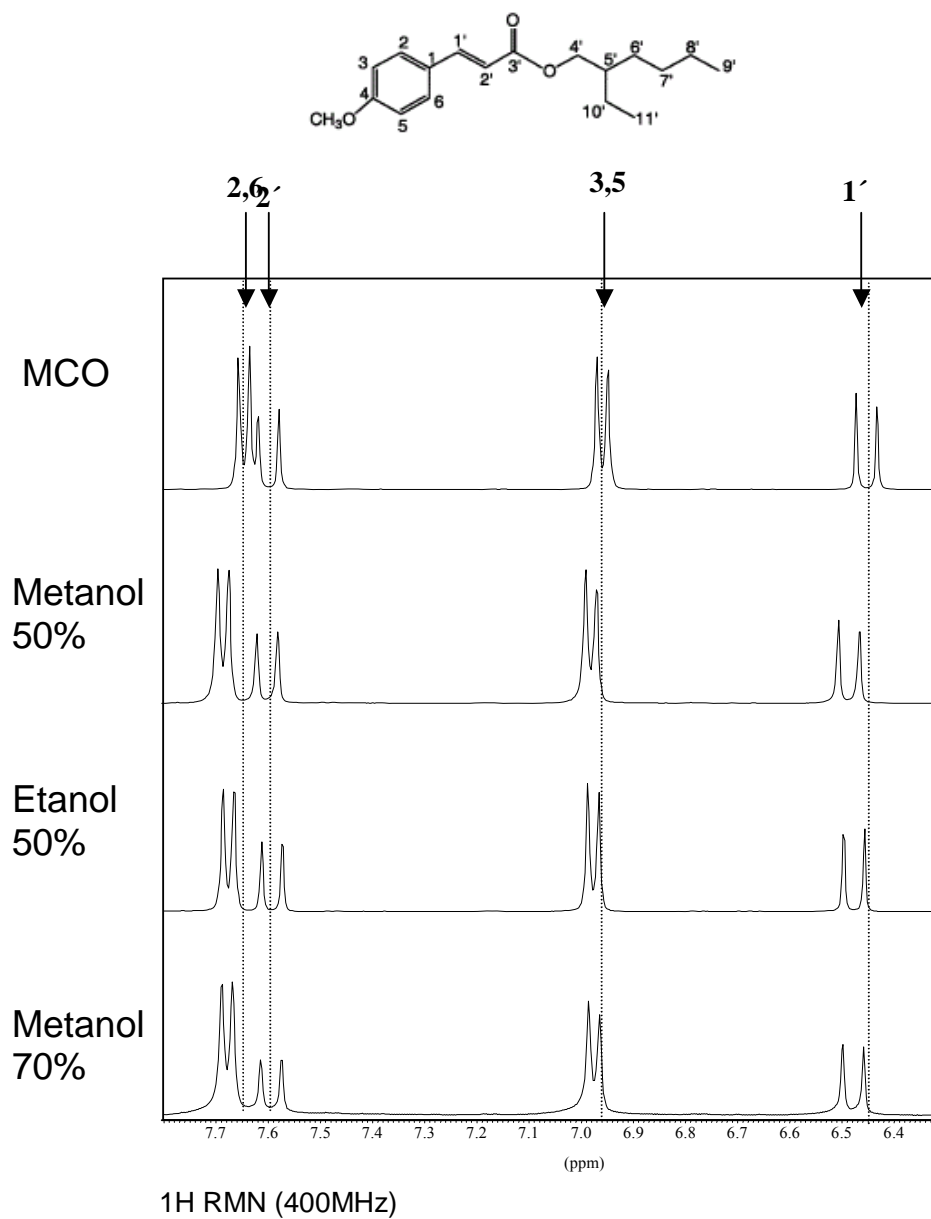


Figura 6 – Espectros de RMN ^1H do filtro solar MCO livre e dos inclusos em β -ciclodextrina purificados com solventes diferentes.

Tabela 6 - Alterações nos deslocamentos químicos do MCO quando os complexos de inclusão são lavados com diferentes soluções

Prótons	Complexo β -CD/MCO (valores de $\Delta\delta = \delta$ complexo - δ MCO)		
	Metanol 70%	Etanol 50%	Metanol 50%
H3H5	0,037	0,032	0,040
H2H6	0,015	0,017	0,019
1'	- 0,004	- 0,007	0,003
2'	0,027	0,022	0,034

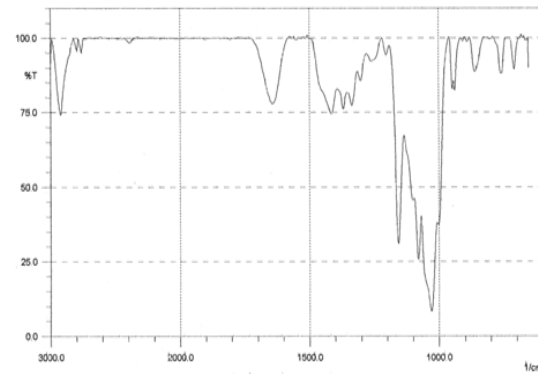
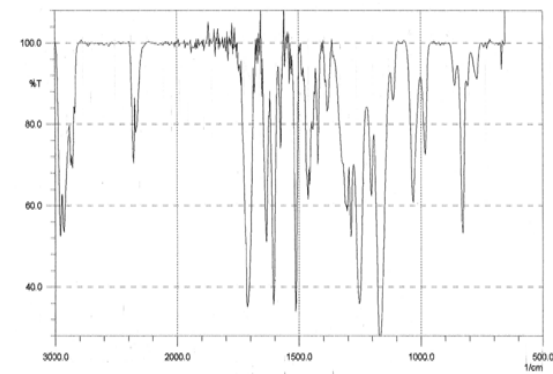
Foram obtidos espectros de RMN ^1H do MCO, da β -ciclodextrina e dos três complexos β -CD/MCO purificados com soluções diferentes (Figura 6). Os efeitos nos deslocamentos químicos dos prótons do MCO estão resumidos na Tabela 6.

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios da dupla ligação do sistema *trans* e do anel aromático foram comparados no MCO livre e nos complexos de inclusão purificados com diferentes solventes. Esses hidrogênios foram escolhidos, pois esta é a parte da molécula do MCO que entra na cavidade da β -CD durante o processo de inclusão. Devido à inclusão, esses hidrogênios que estão dentro da cavidade da β -CD ficam com menor liberdade de movimentos ocorrendo alterações nos seus deslocamentos químicos. Sendo assim, quanto maior o valor da diferença entre os deslocamentos químicos dos hidrogênios do MCO livre e incluso em β -CD, mais eficiente a inclusão.

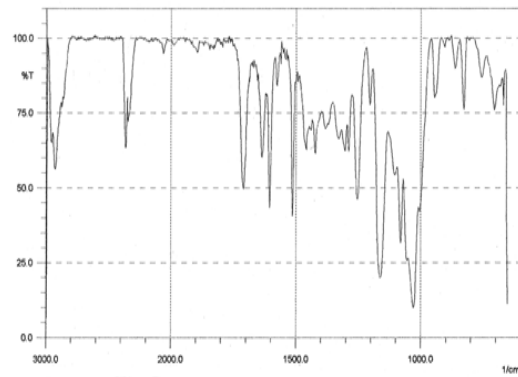
Todos os espectros mostraram diferenças nos deslocamentos químicos ($\Delta\delta$) dos hidrogênios do anel aromático e do sistema *trans* da dupla ligação entre os complexos formados e o MCO puro indicando que em todas elas ocorreu a inclusão do MCO em β -CD. Mas dentre eles o melhor complexo de inclusão obtido foi aquele purificado com a solução de metanol a 50% pois foi a amostra que apresentou as maiores diferenças de $\Delta\delta$.

6.2.2. Por Espectrometria de Infravermelho (IV)

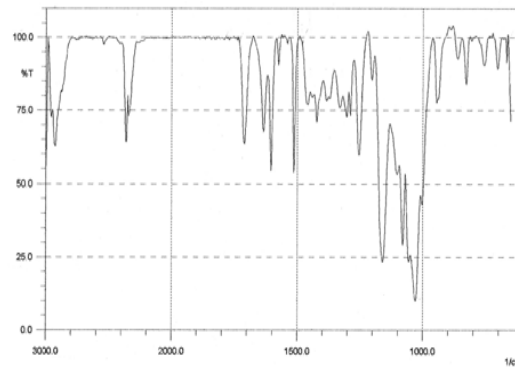
Foram comparados os espectros de IV do p-metoxicinamato de octila e da β -ciclodextrina com os complexos de inclusão. Como podemos ver não há muita diferença entre os espectros do complexo. Podemos observar a supressão de alguns picos do filtro solar e a diminuição da intensidade de outros (como por exemplo, o da carbonila). Através desse métodos podemos ver que ocorre a formação do complexo mas não podemos dizer qual o melhor método de purificação.

1- β -Ciclodextrina

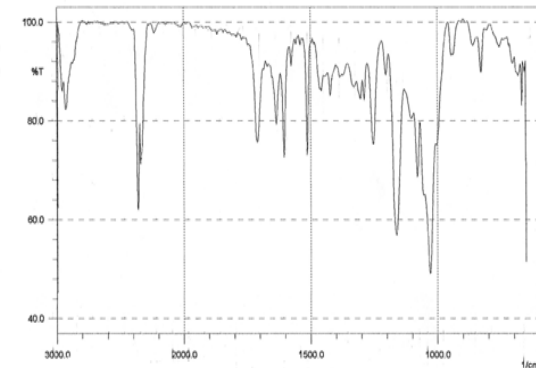
2 - p-Metoxicinamato de Octila



3 -Complexo lavado com Metanol a 50%



4 -Complexo lavado com Etanol a 50%



5- Complexo lavado com Metanol a 70%

Figura 7 - Espectros de Infravermelho (1- β -Ciclodextrina, 2 - p-Metoxicinamato de Octila, 3 - Complexo β -CD/MCO lavado com Metanol a 50%, 4 -Complexo β -CD/MCO lavado com Etanol a 50%, 5- Complexo β -CD/MCO lavado com Metanol a 70%).

6.3. RENDIMENTO DE INCLUSÃO DO COMPLEXO β -CD/MCO

O rendimento de inclusão dos complexos β -CD/MCO purificados com diferentes solventes foi determinado por CLAE utilizando a curva padrão demonstrada no gráfico 1. Este resultado também foi importante para selecionar o melhor complexo de inclusão após a purificação.

Os resultados obtidos estão contidos na Tabela 7. A concentração da amostra injetada no cromatógrafo foi calculada utilizando-se a área e a equação da reta do gráfico 1. O maior rendimento de inclusão foi de 97,7% com a amostra purificada com metanol a 50%, o segundo maior rendimento foi de 71,26% com a amostra purificada com etanol a 50% e o menor rendimento foi de 67,96% obtido com a lavagem com etanol a 50%. Portanto, o complexo de inclusão utilizado para preparar a formulação gel de carbopol com MCO incluído em β -ciclodextrina foi aquele purificado com metanol a 50%.

Tabela 7 – Rendimento de inclusão dos complexos purificados com diferentes solventes

Solvente Utilizado	Área	Rendimento de Inclusão (%)
Etanol 50%	3957966	71,26
Metanol 50%	5297236	97,77
Metanol 70%	3723388	67,96

6.4. ANÁLISE DE FÓSFORO DO PHOSPHOLIPON 90[®], DO LIPOSSOMA E DO GEL CONTENDO LIPOSSOMA.

A concentração da amostra utilizada para a análise do Phospholipon 90[®] foi de 80 μ g/mL deste fosfolípido. A absorvância média em espectrofotometria de UV-visível foi de 0,4755. Então, o teor real de fosfatidilcolina encontrado no Phospholipon 90[®] foi de 98,65% e corresponde a 100,97% do declarado que é 97,7% de fosfatidilcolina.

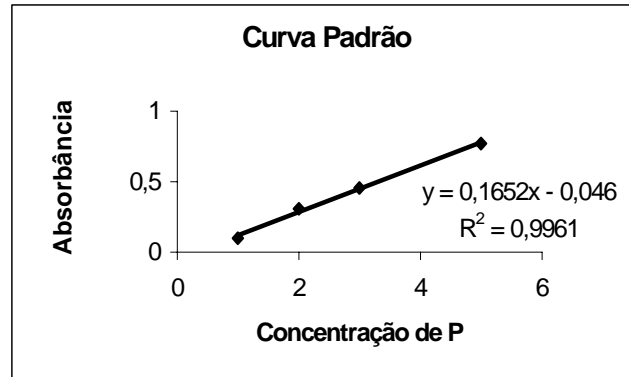


Gráfico 2 - Curva Padrão de Fósforo

Para a análise de fósforo no lipossoma foram retirados 100 μ L de amostra e diluídos em balão volumétrico de 25 mL com etanol. Deste foi retirada uma alíquota de 1 mL e transferida para balão volumétrico de 10 mL. Esta solução final com uma concentração de 3,42 μ g/mL de fósforo foi submetida à análise de fósforo. Para o gel com lipossoma foi seguido o mesmo procedimento sendo que foram pesados 100mg da amostra. A concentração da solução de análise do gel com lipossoma foi de 1,84 μ g/mL. A absorbância média encontrada para o lipossoma foi de 0,383 e para o lipossomagel foi de 0,298. Os valores de rendimento encontrados foram de 75,90% para lipossoma e 79,48% para o gel com lipossoma.

6.5. CARACTERIZAÇÃO DO LIPOSSOMA POR MICROSCOPIA ÓPTICA

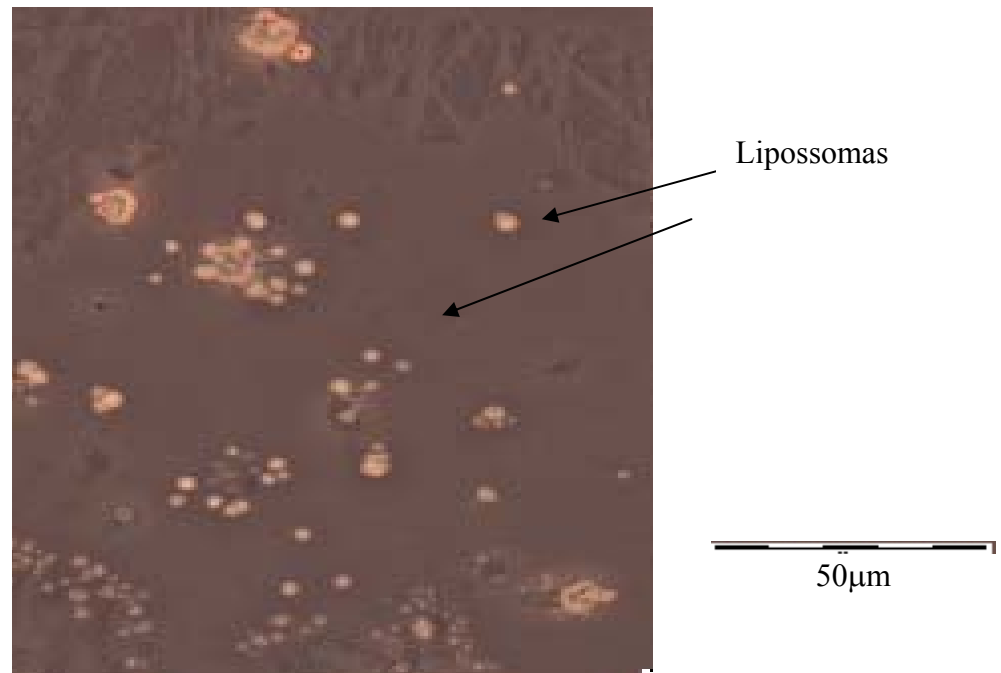


Figura 8 – Fotomicroscopia da Suspensão contendo Lipossomas com Aumento de Vezes

6.6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS FORMULAÇÕES POR CLAE

As concentrações reais das formulações preparadas para este estudo foram obtidas por CLAE através da curva padrão apresentada no gráfico 1. Tendo o valor da área e a equação da reta foi obtido o valor da concentração da amostra injetada no cromatógrafo. Todas as formulações apresentaram concentrações próximas a 4% segundo os dados da tabela 8.

Tabela 8 – Concentrações das formulações obtidas por CLAE

Formulação	Área	Concentração Real de MCO (%)
MCO livre	6875191	4,4
Lipossoma/MCO	6760688	4,7
β -CD/MCO	7647131	3,9

6.7. FPS IN VITRO DAS FORMULAÇÕES

Tabela 9 – FPS in vitro das Formulações

Formulações com MCO a 4%	FPS	Desvio Padrão
Gel	7,31	0,13
Lipossoma/MCO	7,96	0,19
β -CD/MCO	6,81	0,33

O FPS determinado *in vitro* pelo método espectrofotométrico não diferencia os sistemas de liberação já que a formulação é destruída durante a solubilização com etanol P.A. Sendo assim, o valor do FPS seguiu a concentração do filtro solar (tabela 8) presente na solução da amostra. Como podemos observar na tabela 9 o FPS do lipossoma foi o mais alto de (7,96) pois a concentração do filtro nesta formulação foi maior (4,7%). O FPS da formulação contendo ciclodextrina foi a menor (6,81) mas esta também foi a formulação com menor concentração de filtro solar (3,9%).

6.8. ESTUDO DE CEDÊNCIA EM CÉLULA DE FRANZ

6.8.1. Escolha da Solução Receptora

Tabela 10 – Estudo de Solubilidade do MCO em Solução Receptora

Solução Receptora	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
Salina tamponada com 2% de Polissorbato 80	189,8
(Salina com tamponada 2% de Polissorbato 80)/Etanol (70:30)	382,2
Etanol a 30%	4,1

A solução receptora escolhida foi a salina (Salina com tamponada 2% de Polissorbato 80)/Etanol (70:30) devido a maior concentração de saturação encontrada 382,2 $\mu\text{g/mL}$ obedecendo, desta forma, a condição *sink*.

6.8.2. Curva Padrão Obtida Para os Estudos de Cedência das Formulações

A cada dia de análise, antes de injetar as amostras no cromatógrafo líquido era obtida uma curva padrão de três pontos nas concentrações de 2,5; 5,0 e 10,0 µg/ml de MCO. A partir destas curvas padrão foi obtida a curva padrão apresentada no gráfico 3 a partir das médias dos pontos (concentrações e áreas). O coeficiente de determinação encontrado foi 0,9993 indicando que o método foi linear.

Tabela 11 – Médias das concentrações e das áreas de MCO obtidas por CLAE nos diversos dias de trabalho.

Concentrações de MCO Médias (µg/ml)	Áreas Médias
2,5024	421856
5,0048	822328
10,0096	1611196

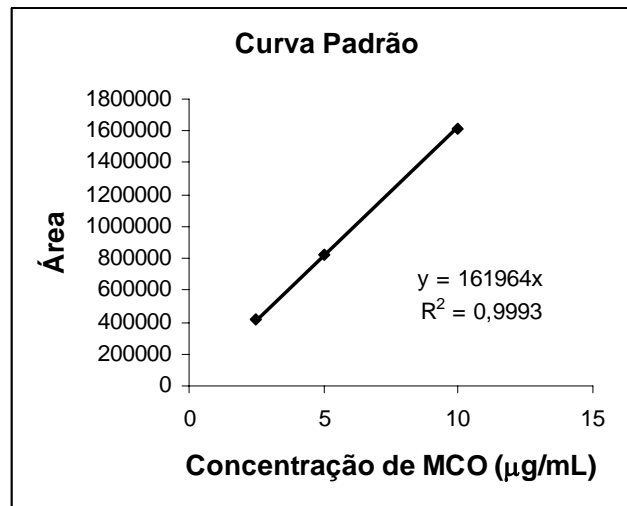


Gráfico 3 – Curva padrão geral obtida em CLAE nos diversos dias de trabalho para o estudo de cedência das formulações.

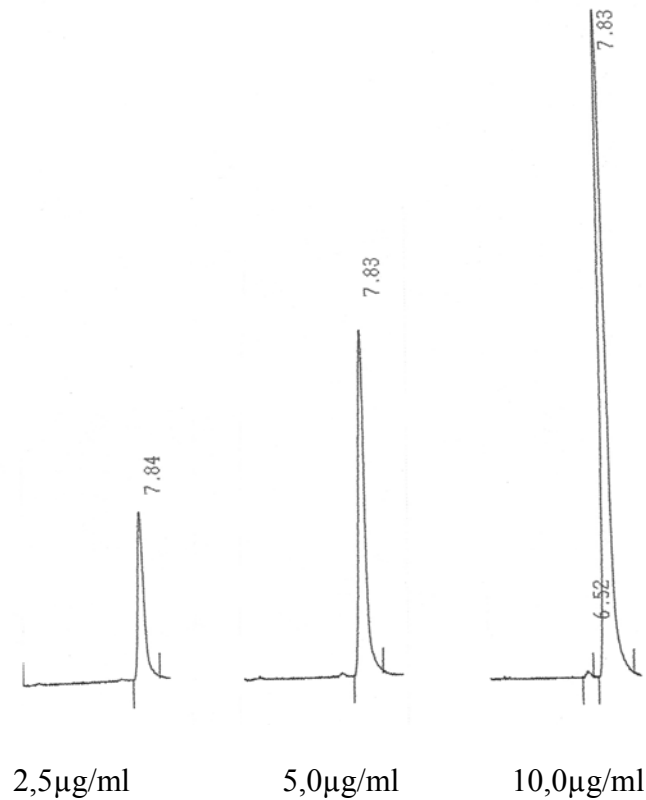


Figura 9 – Exemplos de Cromatogramas dos Pontos da Curva Padrão

6.8.3. Gel de Carbopol com MCO livre

Tabela 12 – Média das quantidades cedidas de MCO da formulação contendo o gel de carbopol com o filtro solar livre (n = 6)

Tempo (min.)	Quantidade Cedida ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Desvio Padrão (DP)	Erro Padrão da Média (EPM)
30	1,01	1,24	0,51
60	1,38	1,54	0,63
90	0,94	1,23	0,50
120	1,45	2,02	0,82
150	1,86	1,86	0,76
180	2,08	1,67	0,68

O estudo de cedência desta formulação contendo MCO livre mostrou grande variabilidade entre as células, como pode ser visto através dos altos valores de desvio padrão (DP¹) e erro padrão da

média (EPM²) encontrados, como mostrado na tabela 12. Como a difusão do MCO da formulação para a solução receptora é irregular e o sistema não atinge o estado estacionário durante o tempo decorrente do experimento não foi possível calcular o fluxo de acordo com a primeira lei de Fick. Esta formulação foi a que cedeu a maior quantidade do filtro solar para a solução receptora: $2,08 \pm 1,67 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ em 180 minutos.

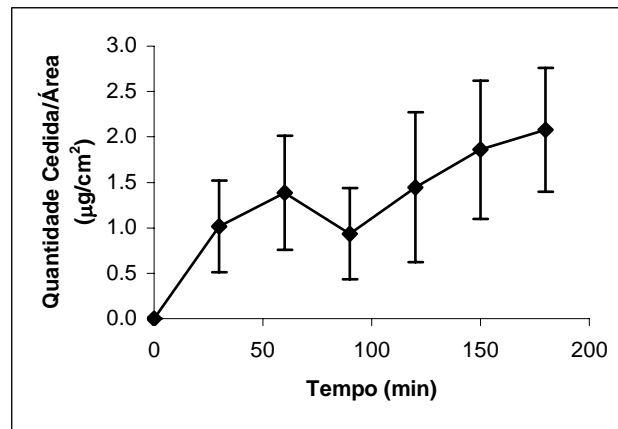


Gráfico 4 – Estudo de Cedência do MCO em Gel de Carbopol

$$1 - DP = \frac{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2}}{n - 1}$$

$$2 - EPM = \frac{DP}{2,5}$$

Onde:

x = valor de uma amostra

\bar{x} = média dos valores das amostras

n = número de amostras

6.8.4. Gel de Carbopol com MCO incluso em β -CD

A formulação contendo MCO incluso em β -CD também apresentou grande variabilidade entre as células como pode ser visto através dos altos valores de desvio padrão (DP) e erro padrão da média (EPM) encontrados. Podemos perceber que a ciclodextrina dificulta a difusão do MCO para a solução receptora quando comparamos esta formulação com a anterior contendo o MCO livre já que nos primeiros 150 minutos observamos pequena elevação na concentração de filtro cedido para o meio receptor.

O sistema não atingiu o estado estacionário durante o tempo do experimento por isso não foi possível calcular o fluxo. Ao final dos 180 minutos a quantidade cedida de MCO da formulação para a solução receptora foi $1,64 \pm 0,77 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, menor do que a quantidade cedida pela formulação com MCO livre.

Tabela 13 – Médias das quantidades cedidas de MCO da formulação gel de carbopol com o filtro solar incluso em β – ciclodextrina (n = 6).

Tempo (min.)	Quant. Cedida ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Desvio Padrão (DP)	Erro Padrão da Média (EPM)
0	0	0	0
30	0,49	0,52	0,21
60	0,47	0,48	0,20
90	0,44	0,48	0,20
120	0,56	0,56	0,23
150	0,75	0,56	0,23
180	1,64	0,77	0,31

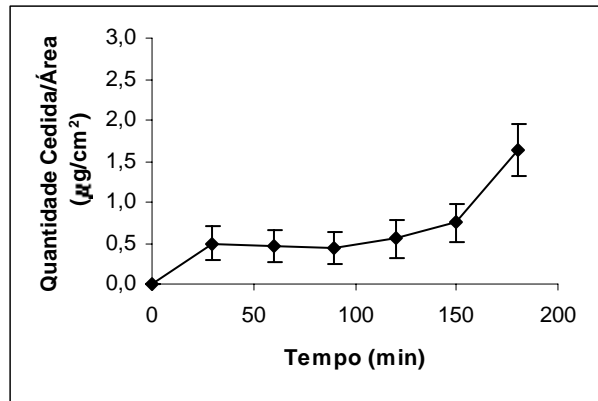


Gráfico 5 – Estudo de Cedência do MCO incluído em β-ciclodextrina

6.8.5. Gel de Natrosol com MCO incluído em lipossoma

A formulação com MCO incluído em lipossoma foi a que apresentou taxa de cedência mais regular, já que a concentração de MCO na solução receptora é sempre crescente; além de menor variabilidade entre as células o que é verificado através dos baixos valores de DP e EPM. Após um pequeno *lag time* inicial, o perfil de liberação foi sempre linear com o tempo, permitindo o cálculo do fluxo no estado estacionário. Os fluxos foram calculados para cada célula, por regressão linear, a partir do tempo de 90 minutos, partindo da premissa que deste ponto em diante o equilíbrio já estaria alcançado. O valor do fluxo encontrado foi $0,4344 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, o que não ocorreu com as outras duas formulações. A quantidade cedida por área aos 180 minutos foi a menor dentre as três formulações testadas com valor de $1,14 \pm 0,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Tabela 14 – Médias das quantidades cedidas de MCO da formulação contendo o gel de natrosol com o filtro solar incluso em lipossoma (n=6).

Tempo (min.)	Quant. Cedida ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Desvio Padrão (DP)	Erro Padrão da Média (EPM)
0	0	0	0
30	0,19	0,07	0,03
60	0,32	0,07	0,03
90	0,48	0,08	0,03
120	0,70	0,10	0,04
150	0,89	0,08	0,03
180	1,14	0,07	0,03

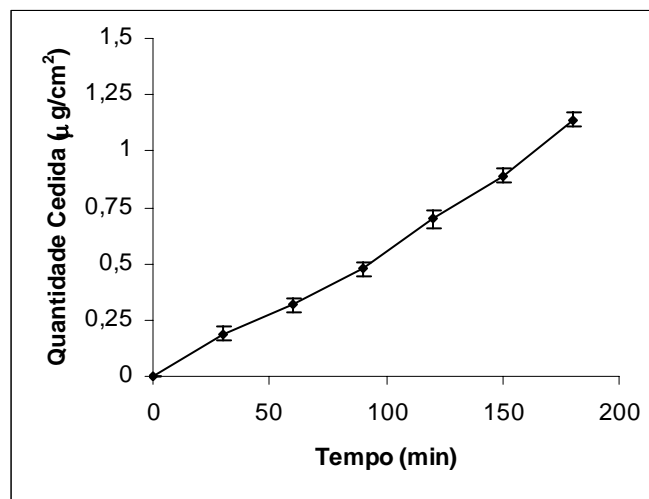


Gráfico 6 – Estudo de Cedência do MCO incluso em lipossoma

6.8.6. Comparação entre as três formulações

Tabela 15 – Comparação das quantidades cedidas de MCO entre as três formulações

Tempo (min.)	Quantidade de MCO Cedida por Área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)		
	Gel	Ciclodextrina	Lipossoma
30	1,01 \pm 1,24	0,49 \pm 0,52	0,19 \pm 0,07
60	1,39 \pm 1,54	0,47 \pm 0,48	0,32 \pm 0,07
90	0,94 \pm 1,23	0,44 \pm 0,48	0,48 \pm 0,08
120	1,45 \pm 2,02	0,56 \pm 0,56	0,70 \pm 0,10
150	1,86 \pm 1,86	0,75 \pm 0,56	0,89 \pm 0,08
180	2,08 \pm 1,67	1,64 \pm 0,77	1,14 \pm 0,07

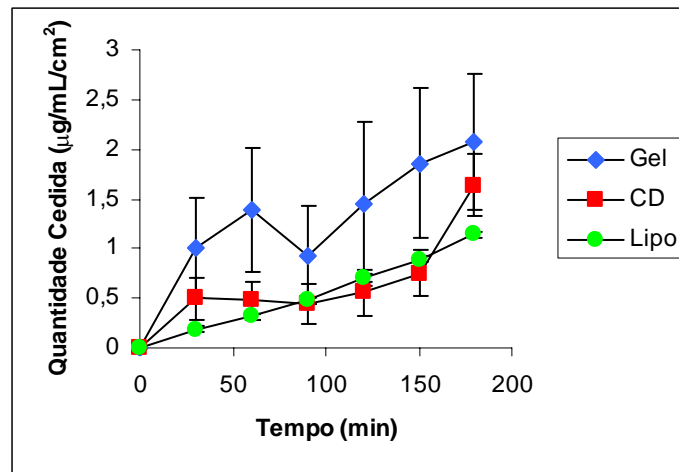


Gráfico 7 – Estudo de cedência de MCO das três formulações

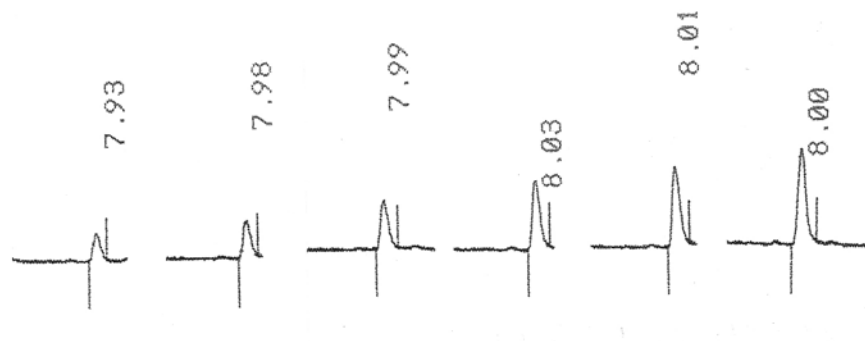


Figura 10 - Cromatogramas da solução receptora ao longo do tempo dos estudos de cedência da Formulação Contendo Lipossomas (célula B).

Quando dispostas em um mesmo gráfico, as curvas de quantidade cedida por área x tempo das três formulações, podemos verificar que os sistemas estudados, são capazes de diminuir a difusão do MCO da formulação para o meio aceptor.

A inclusão do MCO nestes dois sistemas de liberação faz com que este filtro solar seja cedido mais lentamente da formulação para o meio aceptor pois verificamos que em cada tempo de coleta a quantidade cedida foi maior no gel contendo o filtro livre do que nas outras duas formulações.

A quantidade total de MCO cedida em 180 minutos diminuiu quando usamos o filtro solar MCO incluso em em sistemas de liberação o que indica que a inclusão deste filtro solar em sistemas de liberação diminui a partição do filtro solar da formulação para a solução receptora, permitindo que o MCO fique mais tempo retido na formulação.

O objetivo da inclusão de filtros solares em ciclodextrinas e lipossomas foi diminuir a capacidade de liberação da formulação para aumentar a sua concentração na epiderme, minimizando assim, o risco de absorção cutânea com a finalidade de obter formulações com maior eficácia e segurança. A formulação que apresentou melhores resultados foi aquela capaz de reter a maior quantidade de filtro solar impedindo a sua difusão para a solução receptora.

Dentre os dois sistemas de liberação comparados, o lipossoma foi o que liberou menor quantidade de filtro solar. A formulação contendo o lipossoma obteve um melhor perfil de liberação dentre as três formulações comparadas apresentando boa linearidade e boa repetibilidade entre as seis células estudadas.

7. CONCLUSÕES

- O melhor complexo formado verificado por RMN ^1H e o de maior rendimento de inclusão determinado por CLAE foi obtido utilizando-se Metanol a 50% como solução purificadora.
- Após a determinação da concentração de saturação por CLAE verificou-se que a melhor solução receptora para o estudo de cedência, dentre as três testadas, foi a (salina tamponada pH 7,4 com 2% de polissorbato 80) / etanol (70:30), visto que apresentou a maior concentração de saturação, obedecendo, assim a condição *sink*.
- Dentre as formulações comparadas no estudo de cedência (com filtro livre, incluso em ciclodextrina e incluso em lipossoma) o que cedeu maior quantidade de filtro foi o gel de carbopol com MCO livre.
- Como era esperado, as formulações contendo o filtro MCO incluso em sistemas de liberação conseguiram reter mais o filtro solar liberando-o mais lentamente e em menor quantidade para a solução receptora.
- Dentre os dois sistemas de liberação comparados, o lipossoma foi o que liberou menor quantidade de filtro solar.
- A formulação contendo o lipossoma obteve um melhor perfil de liberação dentre as três formulações comparadas apresentando boa linearidade e boa repetibilidade entre as seis células estudadas.
- Formulações contendo filtros solares inclusos em sistemas de liberação são inovações promissoras podendo proporcionar mais segurança e eficácia às formulações oferecendo menor risco de absorção percutânea e maior proteção contra os efeitos nocivos da radiação.

8. PERSPECTIVAS

- Estudar a permeação em pele suína
- Realizar teste de tape stripping para verificar a permanência do filtro solar na pele o que poderá indicar maior resistência à água ou menor metabolização na pele.
- Determinar o FPS in vivo para avaliar se o uso de sistemas de liberação altera a eficácia da formulação
- Comparar outros tipos de sistemas de liberação

9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ANSEL, H.C., ALLEN, L.V., POPOVICH, N.G. **Pharmaceutical dosage forms and drug delivery**. 7th edition. USA. 1999. 595 p. Bibliografia: p. 548 a 551. ISBN: 0-683-30572-7.
- AZULAY, R.D. & AZULAY, D.R. **Dermatologia**. 2 Ed. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. Brasil. 1997. 517 p. Cap. 1 e 32.
- BARRY, B.W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. **Journal of Controlled Release**. v. 6, p. 85-97, 1987.
- BARTLETT, G.R. Phosphorus assay in column chromatography. **Journal of Biological Chemistry**, v. 234, n. 3, p. 466-468, 1959.
- BONI, L.T.; STEWART, T.P.; HUI, S.W. Alterations in phospholipid polymorphism by polyethyleneglycol. **Journal of Membrane Biology**, v. 80, p. 91-104, 1984.
- BOUWSTRA, J.A.; HONEYWELL-NGUYEN, P.L. Skin structure and mode of action of vesicles. **Advanced drug delivery reviews**, v. 54, Suppl. 1, p. S41-S55, 2002.
- COELHO, G.L.N. Estudo da inclusão de filtros solares em ciclodextrinas e suas aplicações em dermocosmética. 2001. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, UFRJ, Rio de Janeiro.
- DAVIS, S.S.; KHANDERIA, M.S. Viscoelastic properties of pharmaceutical semi-solids: characterization of the plastibases for bioavailability studies. **Journal of Pharmaceutical and Pharmacology**, v. 24, p. 176-180, 1972
- DUCHÉNE, D.; WOUESSIDJEW, D. New possibilities for the pharmaceutical uses of cyclodextrins and their derivatives. **Chimica Oggi**. v.1, p. 17-24, 1993.
- EGBARIA, K.; WEINER, N. Topical application of liposomal preparation. **Cosmetics and Toiletries**. v.106, n.3, p. 79-93, 1991.
- EGBARIA, K.; WEINER, N. Topical application of liposomal preparation. In: ZATZ, J.L.; WHEATON, I.L. **Skin permeation: Fundamental and Application**. Wheaton: Allured, 1993 p.193-285.
- EPSTEIN, J.H. Biological Effects of Sunlight. In: LOWE, N.J., SHAATH, N.A., PATHAK, M.A. **Sunscreens development, evaluation and regulatory aspects**. 2nd edition. New York: Marcel Dekker, USA, 1997, ISBN: 0-8247-9306-4, Cap. 4, p. 83-100.
- FAIRHURST, D.; MITCHNICK, M. Particulate sunblocks: general principles. In: LOWE, N.J., SHAATH, N.A., PATHAK, M.A. **Sunscreens development, evaluation and regulatory aspects**. 2nd edition. New York: Marcel Dekker, USA. 1997. 792 p. ISBN: 0-8247-9306-4. Cap. 17, p. 313-352.

- UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center of Drug Evaluation Research. Guidance for: nonsterile semisolid dosage forms. scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls; *in vitro* release testing and *in vivo* bioequivalence documentation, 1997. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder/guidance/1447fnl.pdf> acessado em 18 de setembro de 2003.
- FREITAS, Z.M.F., BEMVINDO, C., SANTOS, E.P., STORPIRTIS, S., VOLPATO, N.M. Avaliação da cedência de cetoconazol de formulações tópicas empregando células de Franz e membrana artificial. Riopharma 3^a edição. Rio de Janeiro, 2003.
- GANESAN, M.G.; WEINER, N.D.; FLYNN, G.L.; HO, N.F.H. Influence of liposomal drug entrapment on percutaneous absorption. **International Journal of Pharmaceutics**. v.20, p.139-154, 1984.
- GARCIA, S. **Lipossomas com filtro solar: preparação e controle de qualidade**. 1998. 161 p. Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamentos)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GONZALEZ H.G., FARBROT, A., LARKÖ, O. Percutaneous absorption of benzophenone-3, a common component of topical sunscreens. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 27, p.691-694, 2002.
- HAIGH, J.M.; SMITH, E.W. The selection and use of natural and synthetic membranes for in vitro diffusion experiment. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 311-330, 1994.
- HAUMANN, B.F. Liposomes-their role in personal care products, cosmetics. **Inform**. v. 3, n. 11, p. 1172-1178, 1992
- HAYARD, J.A.; SMITH, W.P. Potencial of liposomes in cosmetic science. **Cosmetics and Toiletries**. v. 105, n. 7, p. 47-54, 1990.
- HOFFMAN, S.J.; YOHN, J.J.; NORRIS, D.A.; SMITH, C.M.; ROBINSON, W.A. Cutaneous malignant melanoma. **Current Problems in Dermatology**, v.5, p. 7-41, 1993
- JIMÉNEZ, M.M., PELLETIER, J., BOBIN, M.F., MARTINI, M.C. Influence of encapsulation on the *in vitro* percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 272, p. 45-55, 2004.
- KIBBE, A.H. Handbook of pharmaceutical excipients. 3rd edition. USA. 2000. 665p. Bibliografia: p165 a 168.
- KULLAVANIJAYA, P. LIM, H. Photoprotection. **Journal of American Academy of Dermatology**. v. 52, n. 6, p. 937-958, 2005
- LASCH, J.; LAUB, R.; WOHLRAB, W. How deep do intact liposomes penetrate into human skin? **Journal of Controlled Release**. v.18, p.55-58, 1991.
- LAUTENSCHLAGER, H. Liposomes in dermatological preparations. Part I. **Cosmetics and Toiletries**. v. 105, n. 5, p. 89-96, 1990a.

- LAUTENSCHLAGER, H. Liposomes in dermatological preparations. Part II. **Cosmetics and Toiletries**. v. 105, n. 7, p. 63-70, 1990b.
- LOWE, N.J.; FRIEDLANDER J. Sunscreens: rationale for use to reduce photodamage and phototoxicity. In: LOWE, N.J., SHAATH, N.A., PATHAK, M.A. **Sunscreens development, evaluation and regulatory aspects**. 2nd edition. New York: Marcel Dekker, USA. 1997. 792 p. ISBN: 0-8247-9306-4. Cap. 2, p. 35-58.
- MANSUR, J.S., BREDER, M.N.R., MANSUR, M.C.A.; et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 61, n. 3, p. 121-124, 1986.
- MARQUES, H.M.C. Preparation of complexes: evidence for complex formation. **Revista Portuguesa de Farmácia**. v. XLIV n. 4, p.157-163, 1994.
- MARTINDALE, **The Complete Drug Reference**. Thirty Second Edition. Editado por Katherine Parfitt, Pharmaceutical Press, London, UK, ISBN: 085369429, 1999, p. 1487.
- MEZEI, M. Liposomes in the topical application of drugs: a review. In: **Liposomes as drug carriers**, ed. G. Gregoriadis. John Willey & Sons Ltd.; 1988, p. 663-677
- MOSER K., KRIWET, K., KALIA, Y.N., GUY R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 52, p. 103-112, 2001.
- MÜLLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 58, p. 343-356, 2004.
- MÜLLER, R.H., MÄDER, K., GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 50, p. 161-177, 2000.
- NACHT, S. Encapsulation and other topical delivery systems. **Cosmetic and Toiletries**, v. 110, n. 9, p. 25-30, 1995
- NOHYNEK, G.J. & SCHAEFER, H. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v 33, p. 285-299, 2001.
- PATTANAARGSON, S.; MUNHAPOL, T.; HIRUNSUPACHOT, P.; LUANGTHONGARAM, P. Photoisomerization of octylmethoxycinnamate. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v. 161, p. 269-274, 2004.
- PERUGINI, P., SIMEONI, S., SCALIA, S., GENTA, I., MODENA, T., CONTI, B., PAVANETTO, F. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-metoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 246, p. 34-45, 2002.
- PETRAZZUOLI, M. Advances in sunscreens. **Current Problems in Dermatology**. v.12, n. 6, p. 287-290, 2000.

- PINNEL, S.R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of American Academy of Dermatology**. v. 48, p. 1-19, 2003.
- RIBEIRO, R.P. **Desenvolvimento e validação da metodologia de análise do teor de filtros solares e determinação do FPS in vitro em formulações fotoprotetoras comerciais**. 2004. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- SARVEYA, V.; RISK, S.; BENSON, H.^ªE. Liquid chromatographic assay for common sunscreen agents: application to in vivo assessment of skin penetration and systemic absorption in human volunteers. **Journal of Chromatography B**. v. 803, p. 225-231, 2004.
- SCALIA, S., CASOLARI, A., IACONINOTO, A., SIMEONI, S. Comparative studies of the influence of cyclodextrins on the stability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 30, p. 1181-1189, 2002.
- SCALIA, S., VILLANI, S., SCATURIN, A., VANDELLI, M.A., FORNI, F. Complexation of the sunscreen agent, butyl-metoxydibenzoylmethane, with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 175, p. 205-213, 1998.
- SHAATH, N.A. Evolution of Modern Sunscreen Chemicals. In: LOWE, N.J., SHAATH, N.A., PATHAK, M.A. **Sunscreens development, evaluation and regulatory aspects**. 2nd edition. New York: Marcel Dekker, USA, 1997, ISBN: 0-8247-9306-4, Cap. 1, p. 3-34, a.
- SHAATH, N.A. The chemistry of sunscreens. In: LOWE, N.J., SHAATH, N.A., PATHAK, M.A. **Sunscreens development, evaluation and regulatory aspects**. 2nd edition. New York: Marcel Dekker, USA, 1997, ISBN: 0-8247-9306-4, Cap. 15, p. 263-284, b.
- SHAH, V.P.; ELKINS, J.; HANUS, J.; NOORIZADEH, C. SKELLY, J.P. In vitro release of hydrocortisone from topical preparations and automated procedure. **Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 55-59, 1991.
- SCHALLER, M.; KORTING, H.C. Interaction of liposomes with human skin: the hole of the stratum corneum. **Advanced drug delivery reviews**, v. 18, p. 303-309, 1996.
- SCHIMID, M.H.; KORTING, H.C. Therapeutic progress with topical liposome drugs for skin disease. **Advanced drug delivery reviews**, v. 18, p. 335-342, 1996.
- SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., MORRILL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5ª Edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 1994. 387 p. Bibliografia: cap. 3 e 4.
- THE MERCK INDEX. Thirteenth Edition, Merck., USA, ISBN: 0911910-13-1, 2001, p. 1213.
- TREFFEL, P.; GABARD, B. Skin penetration and sun protection factor of ultra-violet filters from two vehicles. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 5, p. 770-774, 1996.

- URBACH, F. The historical aspects of sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v.64, p. 99-104, 2001.
- VOLPATO, N.M., GARCIA, S., GONÇALVES, J.R.O., SALES, W.D.R., SANTOS, E.P. Evaluation of skin permeation of octyl methoxycinnamate in liposomes. IV Pharmatec. Proceedings of the IV Pharmatec: New perspectives in drug delivery systems. P.67. Rio Grande do Norte. Brazil. Aug.1999.
- WISSING, S.A., MÜLLER, R.H. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. **Journal of Controlled release**. v. 81, p. 225-233, 2002 a.
- WISSING, S.A., MÜLLER, R.H. The development of an improved carrier system for sunscreen formulations based on crystalline lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 242, p. 379-375, 2002 b.
- YENER, G., INCEGÜL, T., YENER, N. Importance of using solid lipid microspheres as carriers for UV filters on the example octyl methoxy cinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 258, p. 203-207, 2003.
- ZATZ, J.L. Drug release from semisolids: effect of membrane permeability on sensitivity to product parameters. **Pharmaceutical Research**, v. 12,p. 787-789, 1995.

* Referências de acordo com a norma NBR 6023/39 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).