

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Faculdade de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

PREPARAÇÃO DE FILTROS SOLARES EM NANOSISTEMA  
VISANDO À MAIOR AÇÃO PROTETORA

Vinícius Machado Santos

2007



UFRJ

# PREPARAÇÃO DE FILTROS SOLARES EM NANOSISTEMA VISANDO À MAIOR AÇÃO PROTETORA

Vinícius Machado Santos

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

Orientadora: Profa. Dra. Sheila Garcia

Rio de Janeiro

Maio / 2007

Santos, Vinícius Machado.

Preparação de filtros solares em nanosistema visando à ação prolongada / Vinícius Machado Santos. - Rio de Janeiro: UFRJ/ FF, 2007.

xxii, 106f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Sheila Garcia

Dissertação (mestrado) – UFRJ / FF / Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2007.

Referências Bibliográficas: f. 115-124.

1. Filtros solares. 2. Lipossomas. 3. Benzofenona-3. I. Garcia, Sheila. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Preparação de filtros solares em nanosistema visando à ação prolongada.

PREPARAÇÃO DE FILTROS SOLARES EM NANOSISTEMA VISANDO À MAIOR  
AÇÃO PROTETORA

Vinícius Machado Santos

Orientadora: Profa. Dra. Sheila Garcia

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa 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 título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada por:

---

Presidente, Profa. Dra. Sheila Garcia

---

Prof. Dr. Carlos Rangel Rodrigues

---

Prof. Dr. Davi Pereira de Santana

---

Profa. Dra. Elisabete Pereira dos Santos

Rio de Janeiro

Maio / 2007

Aos meus Pais, Raymundo e Dalva que  
sempre me mostraram a Educação como o  
maior presente que poderiam me dar.

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo quero agradecer a Deus pelo enorme privilégio de poder viver e realizar meus sonhos. E agradecer a São Francisco de Assis por todo apoio e ensinamento.

Agradeço aos meus pais por todo carinho, educação e suporte para que eu pudesse chegar a mais esta etapa.

Ao meu Tio Elair, minha Tia Zita e minha madrinha Lila que sempre me acompanharam bem de pertinho ajudando e incentivando, sem eles tudo seria muito mais difícil. E a toda minha família, tios, tias, primos e primas por toda ajuda e torcida.

À Mariana por todo companheirismo (até na hora de digitar as referências!!), carinhos, beijos, ajuda e por todos estes anos que está ao meu lado me incentivando e superando juntos os problemas que surgem. E aos seus pais, seu irmão, seus avós e sua família que sempre torcem, incentivam e acompanham.

À minha orientadora, Sheila, minha CHEFE!!! A quem eu atormento desde de março de 2002 (e espero atormentar por muito tempo ainda!) que nunca negou ajuda ou uma conversa num dia ruim. Por todo estímulo, amizade e confiança e por sempre me dar a chance de tentar, de arriscar.

À Renatinha, minha Padauan! Agradeço por seu companheirismo e incentivo e pela sorte que tive no dia em que a chamei para fazer iniciação científica. Ao invés de ganhar uma aluna de iniciação, ganhei uma amiga.

Àqueles que, como eu, tiveram a sorte de serem alunos da Sheila: Bianca, Emeli, Mariana, Renata Pietsch, Márcio Robert e Márcio Miranda.

Aos professores Maurício, Valéria e Nádia por toda colaboração e pelo suporte para que tudo no LabCQ esteja funcionando e quando possível, evoluindo. Tenho que destacar a Eliane que conhece tudo do laboratório e desde o meu 1º dia no LabCQ estava pronta para me ajudar.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Professora Gisela Dellamora, por toda sua dedicação e abnegação para colocar nosso curso em uma linha crescente de qualidade.

Aos professores que sempre me acompanharam de perto e incentivaram desde a graduação, Prof. Carla, Prof. Mirian, Prof. Maria Isabel, Prof. Jorge Teixeira, Prof. Marcelo e a todos os professores da Pós-Graduação.

Ao Prof. Carlos Rangel, gostaria de agradecer primeiro, como Diretor da Faculdade de Farmácia, pelo suporte a Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e segundo como professor da minha banca de acompanhamento, contribuindo para que o trabalho se torne mais forte e sustentado.

À Prof. Elisabete por todo o suporte dado ao meu trabalho no LADEG e pelas amostras doadas e por fazer parte da minha banca de acompanhamento, contribuindo com seu vasto conhecimento na área para enriquecer este trabalho.

Ao Dr. André Vergnanini e toda sua equipe da ALLERGISA, pela simpatia e pelo espírito de colaboração, realizando os testes *in vivo* das amostras, contribuindo de forma decisiva para o sucesso deste trabalho.

Ao Venício Feo da Veiga e ao Instituto de Microbiologia Paulo Góes da UFRJ, por todo apoio para a realização das observações por microscopia que puderam comprovar a formação dos lipossomas.

À Ana Maria Travalloni e ao CENPES-PETROBRÁS por toda colaboração nas análises para determinação do tamanho dos lipossomas, fundamental para a avaliação de todo o processo de preparo.

À Indústria Farmacêutica Spectrum Química, pela doação das amostras de filtros utilizadas como padrões de trabalho.

Ao pessoal da minha turma do Mestrado: Bárbara, Juliana, Fábio, e em especial pra Laís por toda ajuda no Lab, pelas muitas conversas e por conseguir me encontrar na sexta, véspera do carnaval, para avisar que nossas inscrições no concurso para o Mestrado tinham sido indeferidas (Já pensou?).

À meus amigos do LabCQ pelos vários momentos engraçados: Adriana, Clara, Fernanda, Guilherme, Joana, Maria, Monique, Raquel, Socorro, Tailane, Viviane e é claro, a minha amiga de almoço e sorvete, Yara!

À Vivian, que junto comigo faz parte da velha guarda do LabCQ, agradeço muito por sua ajuda e sua amizade, Ah! E também por ser uma Chefe nota 10!

A todos os meus alunos que me incentivam e que são o combustível para que eu esteja sempre melhorando meus conhecimentos e formas de transmiti-los.

Agradeço aos meus amigos e amigas que mesmo longe torcem por mim, meu agradecimento especial aos outros 3 vértices do quarteto (Antonio, Glauber e Luis), à Barbara e ao Paulo José (Béééé!!)

À CNPq pela bolsa de estudos fornecida.

“Senhoras e senhores,  
Filtro Solar!

Nunca deixem de usar filtro solar  
Se eu pudesse dar uma só dica  
sobre o futuro, seria esta:  
use filtro solar.

Os benefícios a longo prazo  
do uso de filtro solar  
estão provados e comprovados  
pela ciência;

já o resto dos meus conselhos  
não tem outra base confiável  
além de minha própria  
experiência errante.”

Mary Schmich



## RESUMO

### PREPARAÇÃO DE FILTROS SOLARES EM NANOSISTEMA VISANDO À MAIOR AÇÃO PROTETORA

Vinícius Machado Santos

Orientadora: Profa. Dra. Sheila Garcia

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa 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 título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

A benzofenona-3 (BZ-3) é um dos filtros solares mais utilizados nos EUA e no Brasil. Pode causar sérios problemas dermatológicos e algumas pesquisas têm levantado a hipótese de ter atividade hormonal, porém outras pesquisas indicam que tais ações não ocorrem nas concentrações de BZ-3 liberadas para uso. Os lipossomas são vesículas formadas por uma membrana fosfolipídica. O uso de preparações lipossomais está associado a uma concentração maior de ativos na pele e a uma absorção sistêmica menor que as formulações convencionais. Esse trabalho tem como objetivos: caracterizar a inclusão da BZ-3 em lipossomas e desenvolver uma formulação fotoprotetora utilizando a BZ-3 incluída em lipossomas com fator de proteção solar (FPS) 20. Dessa forma, foram comparados dois métodos de preparo dos lipossomas. Para obter vesículas de mesmo tamanho, as suspensões lipossomais foram filtradas sob pressão e o material não incluído foi separado. Os lipossomas foram analisados quanto ao teor dos constituintes e análise estrutural. Para obter uma formulação com FPS 20 foi necessária a presença de mais um filtro solar, o *p*-metoxicinamato de octila (MCO), que já teve sua inclusão em lipossomas descrita. Os geles preparados continham MCO e BZ-3, incluídos ou não em lipossomas e para todos os geles foram determinados o FPS por método *in vitro* e *in vivo*. A melhor inclusão da BZ-3 foi com o método de hidratação de filme fosfolipídico com 96h de hidratação e 7,0 mM de BZ-3. O gel com a BZ-3 e o MCO, incluídos nos lipossomas, obteve resultados semelhantes a formulação contendo os filtros e os fosfolipídios dispersos e ambas se mostraram superiores a formulação contendo apenas os filtros, por não apresentarem degradação dos filtros durante o armazenamento.

Palavras-chave: Filtros solares, lipossomas, benzofenona-3

## ABSTRACT

### PREPARATION OF SUNSCREENS ON NANOSYSTEM AIMING AT BETTER PROTECTION ACTION

Vinícius Machado Santos

Orientadora: Profa. Dra. Sheila Garcia

*Abstract* da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Biológica, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Benzophenone-3 (BZ-3) is one of the most used sunscreens in USA and Brazil. It may cause severe dermatologic damages and some researches indicate that BZ-3 could have a hormonal activity, but others insist that these actions couldn't happen using legal concentrations of BZ-3. Liposomes are vesicles composed by a phospholipids bilayer. The use of liposomal preparations is associated to higher concentrations of the active substance on epidermis and dermis and a lower systemic absorption compared to conventional formulations. Objectives: characterization of the encapsulation process and liposomes containing BZ-3 and development of a sunscreen formulation containing BZ-3 encapsulated with high sun protection factor (SPF). Two methods were used to prepare the liposomes. The liposomal suspensions were filtered under pressure to normalize particle size and then, the material not encapsulated was discarded. Liposomes were analyzed to determine the concentration of the components and structural analysis. To obtain a SPF 20 was necessary to use another sunscreen octyl methoxycinnamate (MCO) whose encapsulation process had already described. The best conditions to the encapsulation process of BZ-3 were hydration of phospholipid method by 96h and 7,0mM BZ-3. The product containing BZ-3 and MCO included on the liposomes and the formulation containing the sunscreens and dispersed phospholipids had similar performances and much better than product containing only the sunscreens, because it wasn't observed any degradation of the sunscreen combination. This protection probably is due to the phospholipids presence.

Kew-words: Liposomes, sunscreens, benzophenone-3

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1: Classificação da radiação solar não-ionizante.	24
FIGURA 2: Estrutura da pele.	29
FIGURA 3: Camadas anatômicas da epiderme.	29
FIGURA 4: Função barreira do estrato córneo.	31
FIGURA 5: Estrutura do ácido urocânico.	32
FIGURA 6: Estrutura de ressonância do ácido <i>p</i> -aminobenzóico.	33
FIGURA 7: Estrutura geral dos filtros solares orgânicos.	35
FIGURA 8: Estrutura da benzofenona-3.	44
FIGURA 9: Estruturas de ressonância das benzofenonas.	45
FIGURA 10: Estrutura do <i>p</i> -metoxicinamato de octila.	48
FIGURA 11: Estrutura tridimensional dos lipossomas.	50
FIGURA 12: Localização de ativos lipofílicos e hidrofílicos nos lipossomas.	50
FIGURA 13: Estrutura da fosfatidilcolina.	52
FIGURA 14: Processo de formação das vesículas lipossomais.	52
FIGURA 15: Estrutura do colesterol.	53
FIGURA 16: Comparação entre formulações lipossomais e convencionais.	55
FIGURA 17: Formação de lipossomas por hidratação de filme lipídico.	69
FIGURA 18: Formação de lipossomas pelo método de agitação mecânica utilizando um pré-lipossoma.	70
FIGURA 19: Processo de normalização do tamanho dos lipossomas.	71
FIGURA 20: Passagem dos lipossomas por coluna de gel de Sephadex <sup>®</sup> G-50.	72
FIGURA 21: Método de Bartlett para determinação do teor de fósforo.	74
FIGURA 22: Preparo das amostras para MET.	75
FIGURA 23: Apresenta o espectro no infravermelho da BZ-3.	87

	Pág.
FIGURA 24: Apresenta o espectro no infravermelho do MCO.	88
FIGURA 25: Curva de Ringbom para a BZ-3.	90
FIGURA 26: Curva-padrão da BZ-3.	91
FIGURA 27: curva-padrão do MCO.	92
FIGURA 28: Foto microscopia óptica dos lipossomas com BZ-3 a 7,0mM - fração sem filtrar.	98
FIGURA 29: Foto microscopia óptica dos lipossomas com BZ-3 a 7,0mM - fração após membrana de 0,2 µm.	99
FIGURA 30: Foto microscopia óptica dos lipossomas com BZ-3 a 7,0mM - fração após Sephadex <sup>®</sup> coluna G-50.	99
FIGURA 31: Micrografia eletrônica dos lipossomas com BZ-3 a 7,0mM - fração após Sephadex <sup>®</sup> coluna G-50.	100
FIGURA 32: Micrografia eletrônica dos lipossomas com BZ-3 a 7,0mM - fração após coluna Sephadex <sup>®</sup> G-50.	101
FIGURA 33: Micrografia eletrônica dos lipossomas com BZ-3 a 7,0mM - fração após coluna Sephadex <sup>®</sup> G-50.	101
FIGURA 34: Tamanho das partículas nos lipossomas com BZ-3 a 7,0mM - fração sem filtrar.	103
FIGURA 35: Tamanho das partículas nos lipossomas com BZ-3 a 7,0mM - fração após filtrar em membrana de 0,2 µm.	103
FIGURA 36: Tamanho das partículas nos lipossomas com BZ-3 a 7,0mM - fração após coluna Sephadex <sup>®</sup> G-50.	104
FIGURA 37: Tamanho das partículas nos lipossomas com MCO a 10,8mM - fração sem filtrar.	105
FIGURA 38: Tamanho das partículas nos lipossomas com MCO a 10,8mM - fração após filtrar em membrana de 0,2 µm.	106
FIGURA 39: Tamanho das partículas nos lipossomas com MCO a 10,8mM - fração após coluna Sephadex <sup>®</sup> G-50.	106

## LISTA DE QUADROS

	Pág.
QUADRO 1: Percentual aproximado de radiação UV ambiente recebida durante dia de verão.	26
QUADRO 2: Classes de filtros solares químicos e seus representantes.	35
QUADRO 3: Categorias em que se enquadram os produtos para proteção solar.	40
QUADRO 4: Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda.	43

## LISTA DE EQUAÇÕES

	Pág.
EQUAÇÃO 1: Fator de Proteção Solar.	40
EQUAÇÃO 2: Cálculo do FPS segundo Mansur.	42
EQUAÇÃO 3: Cálculo do intervalo de confiança de 95% para o FPS médio.	82

## LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1: Classificação dos lipossomas.	51
TABELA 2: Formulação em gel contendo os filtros solares BZ-3 e MCO livres.	77
TABELA 3: Formulação em gel contendo os filtros solares BZ-3 e MCO inclusos em lipossomas.	78
TABELA 4: Formulação em gel contendo os filtros solares BZ-3 e MCO livres e fosfolipídios dispersos.	79
TABELA 5: Avaliação do fototipo da pele através do histórico.	81
TABELA 6: Determinação da dose mínima eritematogênica (DME) na pele.	82
TABELA 7: Valores de Ponto de Fusão da BZ-3.	84
TABELA 8: Valores de Índice de refração do MCO.	85
TABELA 9: Parâmetros observados na análise por ultravioleta dos filtros solares.	86
TABELA 10: Comparação das principais bandas de absorção do espectro infravermelho da BZ-3.	87
TABELA 11: Comparação das principais bandas de absorção do espectro infravermelho do MCO.	88
TABELA 12: Valores utilizados para a construção da curva de Ringbom.	89
TABELA 13: Valores de teor das amostras de BZ-3 e MCO recebidas como matérias-primas para as formulações.	93
TABELA 14: Valores de teor de BZ-3 e fosfolipídios nos lipossomas preparados com 48 h de hidratação do filme lipídico.	94
TABELA 15: Comparação entre os valores de teor de BZ-3 e fosfolipídios nos lipossomas preparados com 48h e 96h de hidratação.	96
TABELA 16: Comparação entre os valores de teor de BZ-3 e fosfolipídios nos lipossomas obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico e pelo método do pré-lipossoma.	97

	Pág.
TABELA 17: Valores de FPS <i>in vitro</i> das três formulações em gel preparadas.	108
TABELA 18: Resultados do Teste t utilizado para comparar o FPS inicial com o FPS após 3 meses das formulações.	109
TABELA 19: Valores de FPS <i>in vivo</i> a seco das três formulações em gel preparadas.	110
TABELA 20: Comparação dos valores de FPS <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> das formulações.	111
TABELA 21: Valores de FPS <i>in vivo</i> das três formulações em gel preparadas após imersão na água.	112
TABELA 22: Comparação entre o FPS <i>in vivo</i> a seco e após imersão na água para avaliação da resistência à água.	112



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Abs.	Absorbância
Anti-UVA	Ação contra a radiação ultravioleta A
Anti-UVB	Ação contra a radiação ultravioleta B
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BZ-3	Benzofenona-3
°C	Graus celsius
cm	Centímetro(s)
cm <sup>2</sup>	Centímetro(s) quadrado(s)
CNS	Conselho Nacional de Saúde
COLIPA	Comitee de la Liasion des Associations Europeans de L'Industries de la Parfumerie, de Produits Cosmetiques et de Toilette (Comitê das Associações Européias das Indústrias de Perfumaria, Cosméticos e produtos de Toucador)
conc.	Concentração
DEET	N-N-dietil-m-toluamida
DL <sub>50</sub>	Dose letal para 50% da população testada
DME	Dose mínima eritematosa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EC	Estrato córneo
EE	Efeito eritematogênico
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration (Administração de Drogas e Alimentos)
FPS	Fator de Proteção Solar
g	Gramas(s)
g/Kg	Gramas / quilograma
h	Hora(s)
IC	Intervalo de confiança
LADEG	Laboratório de Desenvolvimento Galênico
MCO	<i>p</i> -Metoxicinamato de octila
m	Metro(s)
M	Molar (moles / litro)
mM	Milimolar (milimoles / litro)

$\mu\text{g/mL}$	Microgramas / mililitro
$\mu\text{L/mg}$	Microlitros / miligrama
$\mu\text{L/mL}$	Microlitros / mililitro
$\mu\text{m}$	micrômetro(s)
$\mu\text{M}$	Micromolar (micromoles / litro)
$\mu\text{g}$	Micrograma(s)
$\text{mg/cm}^2$	Miligramas / centímetro quadrado
$\text{mg/L}$	Miligramas / litro
$\text{mg/mL}$	Miligramas / mililitro
$\text{mg/Kg}$	Miligramas / quilograma
$\text{mL}$	Mililitro(s)
$\text{mm}$	Milímetro(s)
$\text{min.}$	Minuto(s)
$n$	tamanho da amostra
$N$	Normal
$\text{nm}$	Nanômetro(s)
$\text{nM}$	Nanomolar (nanomoles / Litro)
OTC	Over The Counter (denominação para medicamentos de venda livre)
$p$	nível de probabilidade
$P$	Fósforo
P.A.	Pró-Análise
PABA	Ácido <i>p</i> -aminobenzóico
PC	Fosfatidilcolina
PF	Ponto de fusão
$\text{pH}$	Potencial de Hidrogênio iônico
PTK	Fosfotungstato de potássio
q.s.p	Quantidade suficiente para
$r$	Coefficiente de correlação
$r^2$	Coefficiente de determinação
$t$	valor obtido no teste $t$ de Student
TRIS	Tris[hidroximetil]aminometano
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A

UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VML	Vesículas multilamelares
VUG	Vesículas unilamelares grandes
VUP	Vesículas unilamelares pequenas
W	Watts
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)
%	Percentual
% (v/v)	Percentual volume / volume
% (p/v)	Percentual peso / volume
$\varepsilon$	Coefficiente de extinção molar
$\lambda$	Comprimento de onda
$\lambda$ máx	Comprimento de onda em que ocorre a maior absorbância

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>24</b>
2.1 RADIAÇÃO SOLAR .....	24
2.1.1 <b>Efeitos da radiação ultravioleta sobre o ser humano</b> .....	27
2.1.1.1 Pele .....	27
2.1.1.2 Olhos .....	27
2.1.1.3 Sistema imunológico .....	28
2.2 PELE .....	28
2.2.1 <b>Estrato córneo</b> .....	30
2.3 SISTEMAS NATURAIS DE PROTEÇÃO À RADIAÇÃO UV .....	31
2.4 FILTROS SOLARES .....	32
2.4.1 <b>Histórico</b> .....	32
2.4.2 <b>Classificação</b> .....	34
2.4.3 <b>Mecanismo de ação dos filtros solares</b> .....	36
2.4.4 <b>Efeitos biológicos da ação dos filtros solares</b> .....	36
2.4.5 <b>Eficácia das formulações protetoras solares</b> .....	37
2.4.5.1 Eficácia contra a radiação UVB – o fator de proteção solar .....	39
2.4.5.1.1 Métodos <i>in vivo</i> de determinação do FPS .....	40
2.4.5.1.2 Métodos <i>in vitro</i> de determinação do FPS .....	40
2.4.5.2 Eficácia contra a radiação UVA .....	43
2.5 BENZOFENONA-3 .....	44
2.6 <i>p</i> -METOXICINAMATO DE OCTILA .....	47
2.7 LIPOSSOMAS .....	49
2.7.1 <b>Aplicação dos lipossomas em formulações de uso tópico</b> .....	54

<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>58</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	58
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	58
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>60</b>
4.1 MATERIAL .....	60
4.1.1 Equipamentos .....	60
4.1.2 Outros materiais .....	61
4.1.3 Reagentes .....	61
4.1.4 Filtros solares – Padrões de trabalho .....	62
4.1.5 Matérias-primas .....	62
4.2 MÉTODOS .....	63
4.2.1 Preparo das soluções utilizadas na pesquisa .....	63
4.2.1.1 Preparo da solução tampão TRIS pH 6,8 .....	63
4.2.1.2 Preparo da solução reagente de molibdato de amônio .....	63
4.2.1.3 Preparo da solução de H <sub>s</sub> SO <sub>4</sub> 10N .....	64
4.2.1.4 Preparo da solução de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10% (v/v) .....	64
4.2.1.5 Preparo da solução de ácido ascórbico 10% (p/v) .....	64
4.2.1.6 Preparo da solução de fosfotungstato de potássio 2% (p/v) ...	64
4.2.2 Análise dos filtros solares utilizados como padrões de trabalho ..	65
4.2.2.1 Determinação do ponto de fusão (PF) da BZ-3 .....	65
4.2.2.2 Determinação do índice de refração do MCO .....	65
4.2.2.3 Análise do espectro de absorção na região ultravioleta .....	65
4.2.2.4 Análise do espectro de absorção na região do infravermelho	66
4.2.3 Construção da Curva de Ringbom para a BZ-3 .....	66

4.2.4 Construção da curva-padrão para a determinação da equação da reta da BZ-3 .....	67
4.2.5 Construção da curva-padrão para a determinação da equação da reta do MCO .....	67
4.2.6 Preparação dos lipossomas contendo a Benzofenona-3 .....	67
4.2.7 Preparação dos lipossomas contendo o <i>p</i> -Metoxinamato de octila .....	69
4.2.8 Normalização dos lipossomas .....	70
4.2.9 Avaliação percentual de filtro incorporado no lipossoma .....	71
4.2.10 Determinação da quantidade de filtro solar incorporado nas frações da suspensão lipossomal .....	72
4.2.11 Determinação da quantidade de fosfolipídio nas frações pelo método de Bartlett .....	73
4.2.12 Visualização dos lipossomas por microscopia óptica .....	74
4.2.13 Visualização dos lipossomas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) .....	75
4.2.14 Determinação do tamanho dos lipossomas por espalhamento da luz laser .....	76
4.2.15 Determinação do teor dos filtros recebidos como matérias-primas .....	76
4.2.16 Formulação do gel contendo os filtros não incorporados em lipossomas .....	76
4.2.17 Desenvolvimento da formulação em gel contendo os filtros solares inclusos nos lipossomas .....	77
4.2.18 Formulação do gel contendo os filtros não incorporados e com os fosfolipídios dispersos .....	79
4.2.19 Determinação <i>in vitro</i> do FPS das formulações .....	80
4.2.20 Determinação do FPS <i>in vivo</i> das formulações .....	80
4.2.21 Determinação do FPS <i>in vivo</i> após imersão em água – “Resistência à água” .....	83

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>84</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS PADRÕES DE TRABALHO (BZ-3 E MCO) .....	84
5.1.1 Determinação do ponto de fusão (PF) da BZ-3 .....	84
5.1.2 Determinação do índice de refração do MCO .....	85
5.1.3 Determinação dos parâmetros de absorção na região ultravioleta .....	85
5.1.4 Espectro da BZ-3 e MCO na região do infravermelho .....	86
5.2 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE RINGBOM PARA A BZ-3 .....	89
5.3 CONSTRUÇÃO DA CURVA-PADRÃO E DETERMINAÇÃO DA EQUAÇÃO DA RETA PARA A BZ-3 .....	90
5.4 CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO E DETERMINAÇÃO DA EQUAÇÃO DA RETA PARA O MCO .....	91
5.5 DETERMINAÇÃO DE TEOR DE BZ-3 E MCO (MATÉRIAS-PRIMAS) .....	92
5.6 RELAÇÃO DOS TEORES DE BZ-3 E DE FOSFOLIPÍDIOS NOS LIPOSSOMAS COM AS QUANTIDADES INICIAIS .....	93
5.7 RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE HIDRATAÇÃO E A QUANTIDADE DE BZ-3 ENCAPSULADA .....	95
5.8 RELAÇÃO ENTRE O MÉTODO DE PREPARO DOS LIPOSSOMAS E A QUANTIDADE DE BZ-3 ENCAPSULADA .....	97
5.9 VISUALIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA .....	98
5.10 VISUALIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	100
5.11 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DOS LIPOSSOMAS POR ESPALHAMENTO DA LUZ LASER .....	102
5.12 AVALIAÇÃO DAS FORMULAÇÕES PREPARADAS .....	107
5.13 DETERMINAÇÃO DO FPS <i>in vitro</i> DAS FORMULAÇÕES .....	107
5.14 DETERMINAÇÃO DO FPS <i>in vivo</i> DAS FORMULAÇÕES .....	109
5.15 COMPARAÇÃO DO FPS <i>in vitro</i> COM O FPS <i>in vivo</i> A SECO .....	110

5.16 DETERMINAÇÃO DO FPS <i>in vivo</i> APÓS IMERSÃO EM ÁGUA .....	111
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>113</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>115</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Devido à constatação dos efeitos danosos causados pela radiação ultravioleta (UV) emitida pelo Sol, a fotoproteção tem se tornado um tópico essencial no dia a dia das pessoas. As formulações protetoras solares são utilizadas regularmente por milhões de pessoas. Considerando o uso freqüente e a longo prazo, tem se dado atenção particular a eficiência e segurança destas moléculas (MÜLLER; WISSING, 2002). Muitos produtos contem filtros como a benzofenona-3 (BZ-3) e seus derivados (KODA *et al.*, 2005). Alguns estudos têm indicado que a BZ-3 aplicada na pele pode ter uma absorção sistêmica indesejável (LEWERENZ *et al.*, 1972; NTP, 1991; OKEREKE *et al.*, 1995; HAYDEN *et al.*, 1997; NEDOROST, 2003; JANJUA *et al.*, 2004; KODA *et al.*, 2005; SUZUKI *et al.*, 2005).

Diversos estudos utilizaram os lipossomas como veículos para filtros solares tendo diversos benefícios como o aumento da permanência do filtro no estrato córneo (WOLF *et al.*, 1995; GARCIA, 1998; TRAN *et al.*, 2002). Os lipossomas são vesículas nas quais um volume aquoso está totalmente envolto por uma membrana fosfolipídica. Um ponto importante é a possibilidade dos lipossomas serem compostos naturais conferindo grande similaridade com as membranas celulares, tornando-os um veículo eficaz e seguro (NEW, 1997).

Este trabalho propõe-se a determinar os parâmetros necessários para a inclusão da BZ-3, filtro anti-UVA, em lipossomas. Desenvolver uma formulação fotoprotetora associando lipossomas contendo *p*-metoxicinamato de octila (MCO), filtro anti-UVB, em uma formulação em gel com objetivo de aumentar a proteção dada pelo filtro, conferindo resistência à água e evitando uma possível absorção sistêmica indesejável.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 RADIAÇÃO SOLAR

O Sol emite um amplo espectro de radiação eletromagnética que é desviado ou atenuado pelas camadas atmosféricas da Terra (ROY *et al.*, 1998). As radiações que chegam à superfície são classificadas como não-ionizantes (FIGURA 1) e subdivididas em infravermelho, visível e ultravioleta (UV) (KIRCHOFF, 1995).

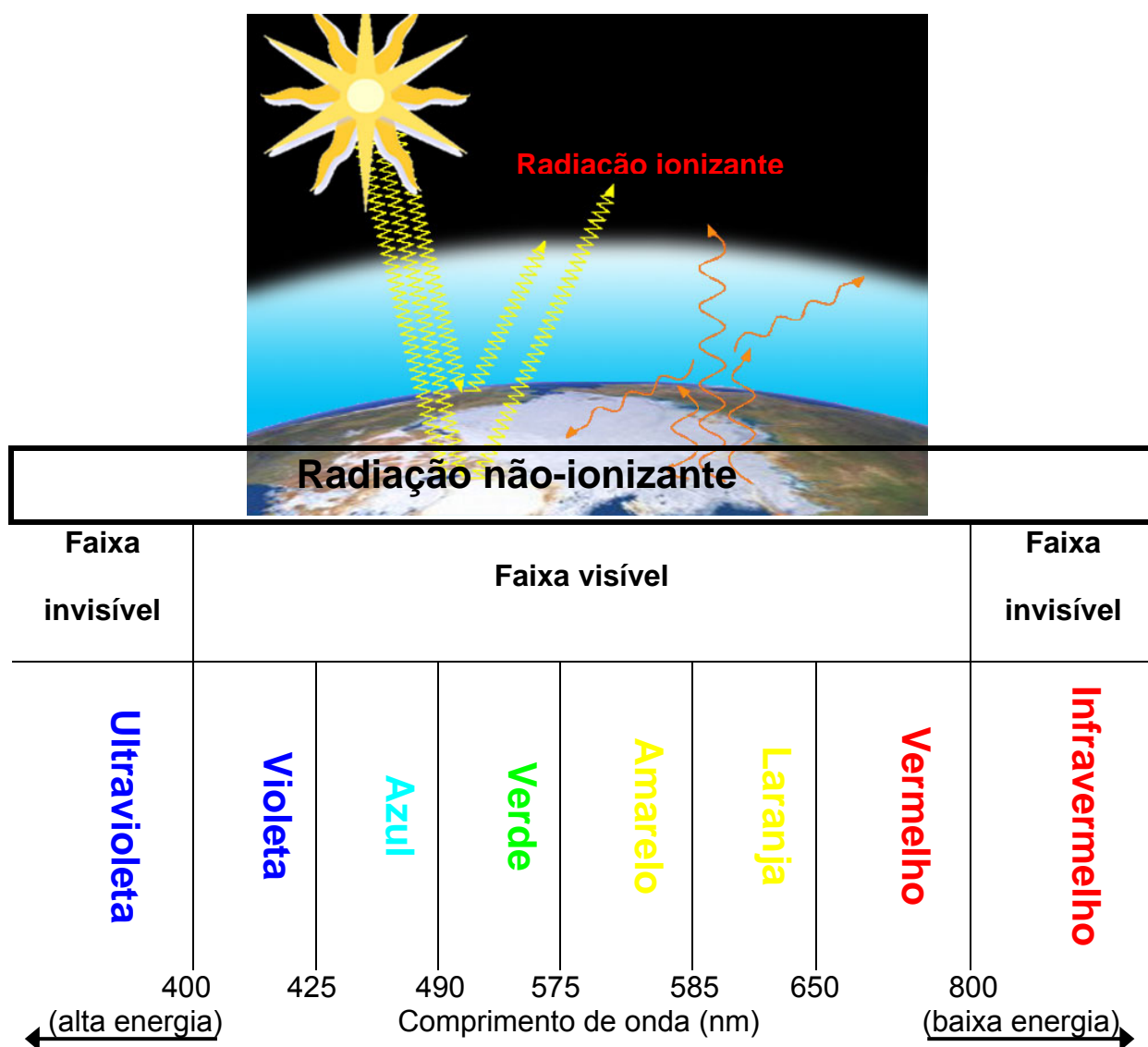


FIGURA 1: Classificação da radiação solar não-ionizante

A exposição excessiva aos raios solares pode desencadear diversos processos patológicos nos seres humanos. Tais efeitos são atribuídos à radiação UV emitida pelo Sol (GASPARRO, 2000; ARMSTRONG; KRICKER, 2001).

Os efeitos danosos dos raios UV ao ser humano incluem queimadura solar, conjuntivite, câncer de pele, envelhecimento precoce, entre outros. Em contraste, o processo de síntese de vitamina K e vitamina D nos seres humanos e o fenômeno vital da fotossíntese nos vegetais, são exemplos dos efeitos benéficos dos raios solares (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005).

A radiação UV pode ser subdividida de acordo com o comprimento de onda ( $\lambda$ ), sendo seus efeitos abaixo apresentados:

a) UVA: comprimento de onda de 320 a 400 nm.

- Bronzeamento direto, porém seu acúmulo, ao longo dos anos, provoca efeitos crônicos como: alterações das fibras colágenas e elásticas, favorecendo o envelhecimento precoce (BILLHIMER, 1989), imunossupressão e carcinogênese (HAYWOOD, 2006).

b) UVB: comprimento de onda de 280 a 320 nm.

- Eritematosa, sendo uma reação de defesa do organismo que aumenta a formação de melanina bronzeando a pele (RIEGER, 1989), causa inflamação cutânea e possui capacidade carcinogênica (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005).

c) UVC: comprimento de onda de 200 a 280 nm.

- Germicida, por sua ação esterilizante, é prejudicial ao tecido cutâneo sendo, porém bloqueada pela camada de ozônio (KIRCHOFF, 1995).

A quantidade de radiação UV que atinge a superfície terrestre é alterada pela latitude, altitude, estação do ano, hora do dia (QUADRO 1), nuvens e pela camada

de ozônio. A maior irradiação ocorre na linha do equador em elevadas altitudes. Na superfície a proporção entre UVA e UVB é de 20:1. A radiação UVB é mais forte entre 10:00 h e 16:00 h. Como a radiação UVA possui maior comprimento de onda, é menos afetada pela altitude e condições atmosféricas (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005).

QUADRO 1: Percentual aproximado de radiação UV ambiente recebida durante um dia claro de verão das latitudes tropicais (20°) até temperadas (60°) (DIFFEY, 2002).

Intervalo do dia	Radiação UV (%)
Antes de 8:30	6
8:30 até 9:30	8
9:30 até 10:30	12
10:30 até 11:30	15
11:30 até 12:30	17
12:30 até 13:30	15
13:30 até 14:30	12
14:30 até 15:30	8
15:30 até 16:30	4
16:30 até 17:30	2
Após 17:30	1

Nos seres humanos, a absorção de fótons por moléculas endógenas fotosensibilizantes acarreta reações subseqüentes com o oxigênio resultando na formação de diferentes espécies de oxigênio reativas incluindo o radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxil ( $HO^{\bullet}$ ) e o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ). Altos níveis dessas espécies reativas no organismo, através de um estresse oxidativo elevado nas células da pele, resultarão em danos genéticos temporários e permanentes e na ativação de processos citoplasmáticos referentes ao crescimento, diferenciação, replicação sem controle e degradação do tecido conectivo (PODDA *et al.*, 1998; MANCEK; PECAR, 2001).

## **2.1.1 Efeitos da radiação ultravioleta sobre o ser humano**

### **2.1.1.1 Pele**

Os efeitos agudos na pele ocorrem principalmente devido à radiação UVB e incluem o eritema, edemas e o escurecimento dos pigmentos seguidos de bronzeamento (mais relacionado à radiação UVA) e espessamento da epiderme e da derme (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005).

A exposição excessiva à radiação UV resulta em inúmeras alterações crônicas na pele. Essas alterações incluem vários tipos de câncer de pele entre eles o melanoma, tido como o mais agressivo. O Programa das Nações Unidas para o meio ambiente (UNEP) estima que mais de 2 milhões de casos de câncer de pele não-melanoma e 200 mil casos melanomas malignos ocorrem no mundo a cada ano. Um decréscimo de 10% da camada de ozônio estratosférica levaria a mais 300 mil casos de câncer não-melanoma e 4,5 mil de melanomas por ano. A ocorrência mundial de melanomas malignos está fortemente relacionada à exposição ao sol durante o lazer e ao histórico de queimaduras solares. Existem ainda algumas evidências de que o risco de desenvolvimento de melanoma está relacionado também a exposição intermitente aos raios UV especialmente durante a infância (WHO, 2002).

### **2.1.1.2 Olhos**

A exposição dos olhos a radiação UV depende de vários fatores: reflexão do solo, a claridade do céu e o uso de óculos. Os efeitos agudos dos raios UV incluem

o desenvolvimento de fotoceratite e fotoconjuntivite. Embora dolorosos, eles são reversíveis, facilmente prevenidos pelo uso de óculos escuros. Os efeitos crônicos incluem o desenvolvimento de pterígio, câncer das células da conjuntiva e catarata (WHO, 2002).

#### 2.1.1.3 Sistema imunológico

A maioria dos efeitos imunossupressores causados pela radiação UV foi associada à radiação UVB. Estudos recentes indicaram que a radiação UVA é muito mais imunossupressora que a UVB (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005).

A radiação UV parece alterar a resposta imunológica através da modificação da atividade e da distribuição das células responsáveis por organizar tais respostas (WHO, 2002).

## 2.2 PELE

A pele (FIGURA 2) é essencialmente composta de duas camadas principais: a epiderme, camada externa e não vascularizada, e a derme, camada interna muito vascularizada, com terminações nervosas, glândulas sudoríparas e sebáceas e folículos capilares, tendo a estrutura mantida por tecido conectivo (ODLAND, 1983).

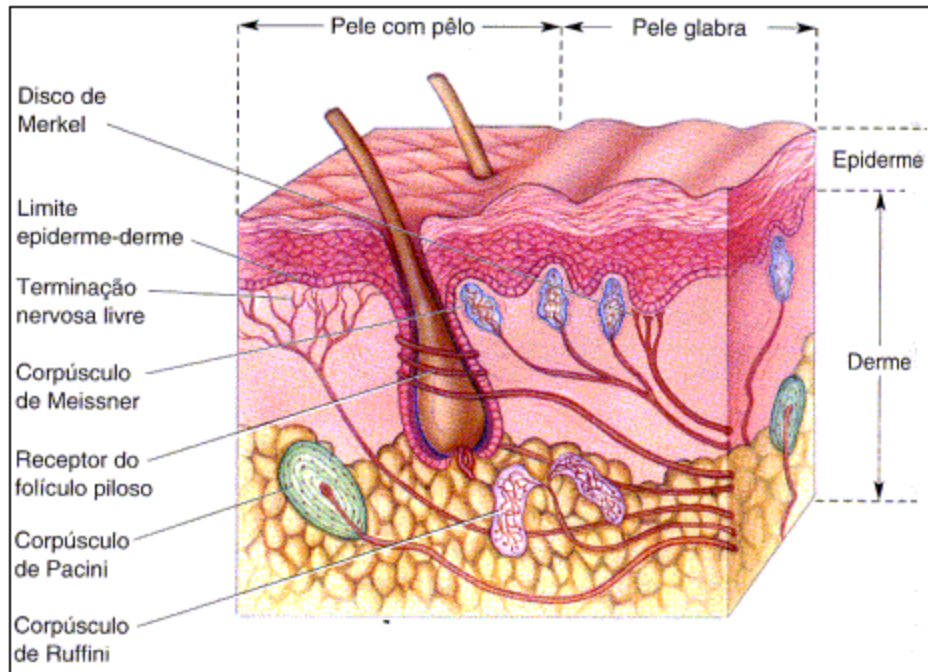


FIGURA 2: Estrutura da pele (BEAR *et al.*, 2002).

A epiderme pode ainda ser dividida em diversas camadas anatômicas (FIGURA 3) que representam diferentes estágios da diferenciação das células (SUHONEN *et al.*, 1999).

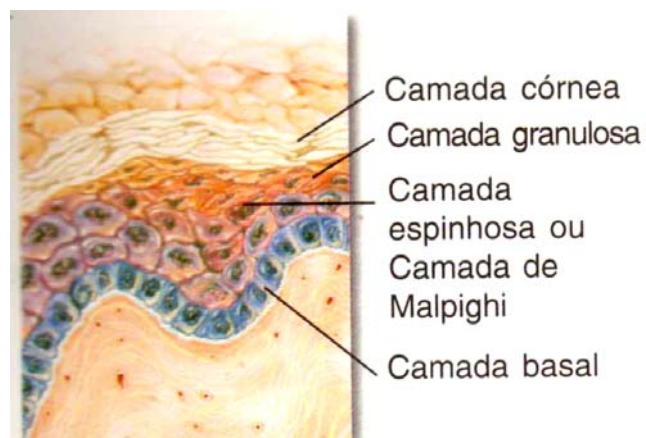


FIGURA 3: Camadas anatômicas da epiderme (LÉPORI, 2002).

### 2.2.1 Estrato córneo

A camada mais superficial da epiderme é o estágio final da diferenciação celular, denominada de estrato córneo (EC). É uma camada formada por células mortas conectadas por uma matriz lipídica. Na avaliação do peso seco do EC, 75% a 80% é composto de proteínas, sendo a  $\alpha$ -queratina a mais abundante e tendo uma porção menor de  $\beta$ -queratina (SUHONEN *et al.*, 1999).

A função de barreira da pele é atribuída ao EC. Este possui uma permeabilidade a água aproximadamente 1000 vezes menor que a maioria das outras membranas biológicas o que é atribuído à composição lipídica única do EC e ao arranjo estrutural da matriz lipídica intercelular (POTTS; FRANCOCEUR, 1991; SQUIER *et al.*, 1991).

A composição lipídica do EC é formada por 41% de fosfolipídios, 27% de colesterol, 10% de ésteres de colesterol, 9% de ácidos graxos e 2% de sulfatos de colesterol (WERTZ; DOWNING, 1989). O grande conteúdo de fosfolipídios com cadeias alifáticas saturadas longas e sem ramificações é ideal para a organização de membranas impermeáveis e resistentes à variação de temperatura, exposição à radiação UV e oxidação pelo ar (SCHURER; ELIAS, 1991).

Os lipídios extracelulares do EC são organizados em estruturas lamelares formando fases lipídicas contínuas que ocupam aproximadamente 20% do volume total do EC (ELIAS *et al.*, 1977; ELIAS; LEVENTHAL, 1979). A estrutura lamelar também é mantida pela presença de compostos anfipáticos no EC como os sulfatos de colesterol (WILLIAMS; ELIAS, 1987).



### 2.3 SISTEMAS NATURAIS DE PROTEÇÃO À RADIAÇÃO UV

A evolução dos seres humanos permitiu que pudéssemos contar com sistemas próprios de proteção contra os raios UV.

A barreira formada pelo EC (FIGURA 4) também impede a penetração da radiação e de 5 a 10% da luz é refletida. As áreas em que o EC é mais fino são muito mais susceptíveis e se lesionam mais facilmente (LÉPORI, 2002).

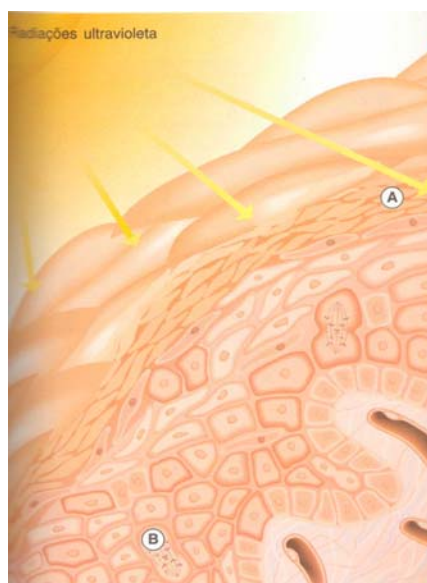


FIGURA 4: Função barreira do estrato córneo. A – estrato córneo, B – Transformação: mitose induzida por radiação UV (LÉPORI, 2002).

A secreção sudorípara possui um componente capaz de absorver a radiação UV, o ácido urocânico (ácido 4-imidazoilacrílico) (FIGURA 5) que tem máxima absorção em 277 nm (BARTH, 2000). Com a absorção de fótons, o ácido *trans*-urocânico é isomerizado a *cis*-urocânico, que está envolvido com os efeitos imunossupressor e carcinogênico (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005).

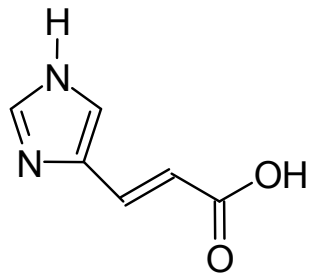


FIGURA 5: Estrutura do ácido urocânico.

A melanina (eumelanina) é o pigmento natural presente nos seres humanos. É capaz de absorver em uma ampla faixa de comprimento de onda, desde o ultravioleta até o infravermelho próximo. Ela é capaz de neutralizar radicais livres presentes nas células, sendo finalmente desprendida com o EC. Nas células, a melanina tende a cobrir o núcleo para proteger o DNA celular do dano que possa ser causado pela radiação UV (LÉPORI, 2002).

## 2.4 FILTROS SOLARES

### 2.4.1 Histórico

Em 1891, Hammer publicou uma revisão em que ele descreve a influência da luz sobre a pele. Ele reuniu diversas evidências de que a queimadura solar era devida à radiação UV e foi o primeiro a recomendar o uso de filtros solares químicos: “Materiais que impedem a radiação UV de atingir a pele protegendo-a contra os eritemas solares” (URBACH, 2001).

O primeiro uso popular de filtros solares no mundo ocorreu em 1928, nos Estados Unidos, com o uso comercial de uma emulsão contendo dois compostos

capazes de absorver a energia da radiação UV, o salicilato de benzila e o cinamato de benzila (SHAATH, 1997).

O protetor solar mais famoso do início do século XX foi o “Ambre Solaire” lançado em 1935 por Eugene Schueller, contendo o salicilato de benzila como filtro UV em um veículo oleoso. A partir daí Schueller fundou a companhia atualmente conhecida como L’Oreal (URBACH, 2001).

O ácido *p*-aminobenzóico (PABA) (FIGURA 6) foi o primeiro filtro a ser patenteado, em 1943, abrindo caminho para utilização de diversos derivados do PABA. Durante a 2ª Guerra Mundial o exército norte-americano desenvolveu algumas formulações com protetores solar para utilização em suas tropas, o que trouxe bastante desenvolvimento para a área de fotoproteção (SHAATH, 1997).

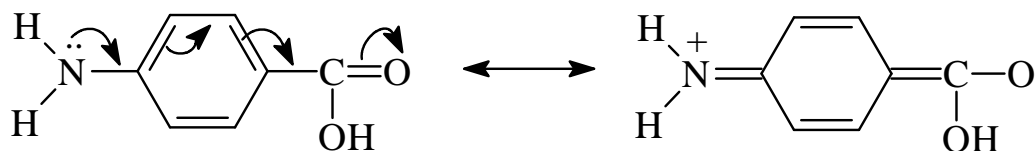


FIGURA 6: Estrutura de ressonância do ácido *p*-aminobenzóico (SHAATH, 1997).

Em 1958, Knox e colaboradores introduziram o uso da benzofenona (ácido 3-benzil-4-hidroxi-6-methoxi-benzenosulfônico) que absorve fortemente na região UVA (KNOX *et al.*, 1958). Com o aumento das evidências de que a radiação UVA pode causar danos crônicos à pele, as pesquisas de novos compostos capazes de absorver na região UVA foram muito aceleradas (URBACH, 2001).

Atualmente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a Administração de Drogas e Alimentos “Food and Drug Administration” (FDA) e o Comitê das Associações Europeias das Indústrias de Perfumaria, Cosméticos e

produtos de Toucador “Comitte de la Liaison des Associations Europeans de L’Industries de la Parfumerie, de Produits Cosmetiques et de Toilette” (COLIPA) possuem listagens das substâncias químicas orgânicas e inorgânicas que podem ser utilizadas como filtros solares (URBACH, 2001; KULLAVANIJAYA; LIM 2005; ANVISA, 2006).

#### **2.4.2 Classificação**

Os primeiros filtros solares a serem utilizados protegiam a pele da radiação UVB, capaz de causar os eritemas. Com os avanços na área da bioquímica e fotobiologia observou-se a necessidade da utilização de compostos capazes de absorver na região do UVA. As formulações utilizadas atualmente contêm combinações de filtros para aumentar o espectro de absorção (ROSEN, 2003).

Além da divisão pela faixa de absorção, os filtros solares também são classificados em dois grandes grupos: filtros químicos e filtros físicos. Os filtros químicos atuam absorvendo a radiação UV e emitindo-a geralmente na região do infravermelho dando a sensação de calor. Os filtros físicos são compostos inorgânicos capazes de refletir ou absorver a radiação UV. Atualmente na categoria de filtros físicos existem dois representantes: o dióxido de titânio e o óxido de zinco, ambos sendo fabricados em partículas microfinas para que possam ser utilizados com boa aceitação dos consumidores (SHAATH, 1997; ROSEN, 2003).

A classe dos filtros químicos é formada por inúmeros compostos reunidos em famílias de acordo com suas naturezas químicas. O QUADRO 2 apresenta as famílias com seus representantes mais comuns e regiões de absorção correspondentes.

QUADRO 2: Classes de filtros solares químicos e seus representantes (Adaptado de ROSEN, 2003).

Derivados do PABA
Octil dimetil PABA (UVB)
Cinamatos
<i>p</i> -Metoxicinamato de octila (UVB)
Octocrileno (UVA/UVB)
Salicilatos
Salicilato de octila (UVB)
Antranilatos
Antranilato de Metila (UVA)
Benzofenonas
Benzofenona-3 (UVA/UVB)
Dibenzoilmetanos
Avobenzona (UVA)
Derivados da Benzilideno cânfora
Ácido tereftalideno dicânfora sulfônico (UVA)
Trisiloxano de drometrizol (UVA/UVB)
Outros
Metileno-bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol (Tinosorb M) (UVA/UVB)
Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil (Anizotriazina) (UVA/UVB)

A maioria dos filtros solares orgânicos é formada por compostos aromáticos dissustituídos que apresentam um grupamento carbonila, cetona ou éster, e um substituinte com par de elétrons livres (amina ou metoxila) doadores de elétrons (FIGURA 7), usualmente em posição *orto* ou *para* ao grupamento carbonila (SHAATH, 1997).

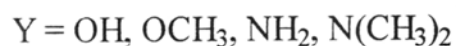
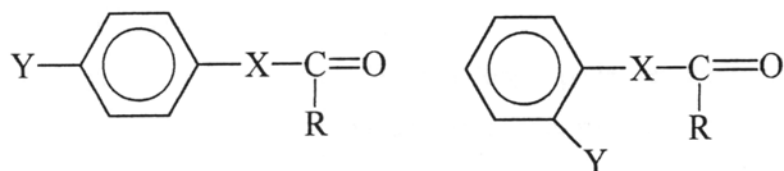


FIGURA 7: Estrutura geral dos filtros solares orgânicos (Adaptado de SHAATH, 1987).

### 2.4.3 Mecanismo de ação dos filtros solares

Cálculos de mecânica quântica demonstraram que a energia contida nas radiações UVA e UVB são da mesma magnitude da energia de ressonância para deslocalização de elétrons. Portanto, a energia absorvida da radiação UV corresponde à energia necessária a excitação fotoquímica. Ou seja, a radiação UV absorvida corresponde à energia necessária para transição eletrônica (passagem dos elétrons do orbital molecular do estado fundamental  $\pi$  para o orbital molecular no estado excitado  $\pi^*$ ). A seguir, a molécula excitada retorna ao seu estado fundamental através da emissão de radiação com comprimento de onda maior e energia mais baixa que a absorvida (RIEGER, 1997).

A radiação de comprimento de onda maior pode ser emitida de várias maneiras. Se a perda de energia for grande o suficiente para o seu comprimento de onda recair na região do infravermelho, ela será percebida como uma radiação calorífica na pele, imperceptível diante do calor recebido pela exposição ao sol. Se a energia emitida recair na região do visível, ela poderá ser percebida através do efeito fluorescente ou fosforescente. Em alguns casos, a radiação emitida pode ser tão energética, que provocará reações fotoquímicas na molécula do filtro solar, levando a isomerizações ou degradações (BARTH, 2000).

### 2.4.4 Efeitos biológicos da ação dos filtros solares

Em estudos utilizando camundongos sem pêlo, o uso de filtros solares reduziu significativamente a incidência de casos de câncer induzidos pela radiação UV e preveniu eritemas, edemas e alterações crônicas da pele (KLIGMAN *et al.*, 1982; PLASTOW *et al.*, 1988). A formação de dímeros de pirimidina-ciclobutano no DNA

de células da pele diminui, assim como, o número de mutações p53 em camundongos tratados com filtros solares antes da exposição à radiação UV (WOLF *et al.*, 1993; ANANTHASWAMY *et al.*, 1997).

Pesquisa em humanos indicou que o uso de filtros solares levou a uma diminuição de casos de queratoses actínicas (NAYLOR *et al.*, 1995). Um estudo controlado randomizado com humanos indicou uma redução de 46% de carcinomas de células escamosas em pessoas que utilizaram filtros solares por 4 anos e 6 meses (GREEN *et al.*, 1999). Outro estudo controlado randomizado demonstrou que o uso de formulações protetoras solares com amplo espectro de absorção diminuiu o número de casos de nevus em crianças brancas (GALLAGHER *et al.*, 2000). O uso de filtros solares também diminuiu o número de casos de reativação de herpes labial ativada pelo Sol (ROONEY *et al.*, 1991). A possível ação dos filtros solares na prevenção da supressão imunológica induzida pela radiação UV ainda não está esclarecida (ROSEN, 2003).

#### **2.4.5 Eficácia das formulações protetoras solares**

As formulações com filtros solares geralmente são aplicadas superficialmente em grandes áreas da pele. A eficácia irá depender da adesão dos filtros solares na pele formando um filme protetor. Os filtros solares são desenvolvidos para permanecerem nas camadas mais externas da pele tendo uma grande afinidade pelo EC. Uma formulação fotoprotetora ideal deve permitir grande acúmulo dos filtros solares na pele com uma permeação mínima para a corrente sanguínea (JIMÉNEZ *et al.*, 2004).

Um dos fatores mais importantes para uma boa ação dos protetores solares é a quantidade aplicada na pele. Atualmente, a maioria das pessoas aplica uma quantidade menor que a utilizada nos testes (2,0 mg/cm<sup>2</sup>) (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005).

A técnica de aplicação das formulações irá afetar na uniformidade da camada protetora, dessa forma algumas áreas serão menos protegidas que outras levando a uma perda de eficácia (LOTT, 2003).

A composição das formulações também é um fator muito importante. Se o produto é considerado cosmeticamente inaceitável pelos consumidores, ele ficará na embalagem. A polaridade e pH poderão interferir na capacidade de absorção dos filtros (ROSEN, 2003). Além disso, pode-se prever, através de estudos de estabilidade, quais interações podem ocorrer entre os componentes ativos e os demais constituintes de forma a garantir a eficácia e segurança do produto.

As formulações fotoprotetoras devem ser desenvolvidas para serem resistentes permanecendo na pele sob condições desfavoráveis. Atualmente, a maioria das formulações comerciais são resistentes à água enquanto algumas já anunciam resistência a areia (DIFFEY, 2002). A ANVISA não descreve um método para determinação de “Resistência à água” ou “Muito resistente à água” mas indica o método que deve ser seguido: Federal Register - Norma FDA - Department of Health and Human Services- Wednesday May 12, 1993 - Sunscreen Drug Products for Over the Counter Human Use; Final Monograph; Final Rule - Subparte D Testing Procedure , seção 352.76 (ANVISA, 2002).

A reaplicação da formulação irá contribuir para a eficiência da proteção. As razões para a reaplicação são: compensar a aplicação inicial geralmente inferior ao ideal, mantendo uma proteção mais regular durante a exposição ao Sol e aumentar



a quantidade de filtros solares que podem ser removidos pela água, suor, toalhas, roupas, fricção ou areia (DIFFEY, 2002). Um modelo matemático sugere que a reaplicação a cada 20 minutos durante um período de 6 horas de exposição ao sol, resulta em uma exposição menor à radiação que uma reaplicação a cada 2 ou 4 horas (ROSEN, 2003).

Um filtro solar ideal deve ter estabilidade fotoquímica. Quanto mais lábil for um filtro, mais rapidamente ele é degradado pela radiação UV. A fotoestabilidade de uma formulação irá depender dos filtros solares que a compõem e dos excipientes. Todos os filtros solares são fotolábeis, uns mais que outros. Como exemplo, o p-metoxicinamato de octila (MCO) e a avobenzona são muito lábeis enquanto filtros como, o octocrileno e os salicilatos são utilizados para aumentar a fotoestabilidade da formulação final (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005). Outra razão para desenvolver filtros solares fotoestáveis é que os produtos de degradação dos filtros entram em contato direto com a pele e podem se tornar foto-oxidantes, ou promover fototoxicidade ou dermatite de contato fotoalérgica. A interação de produtos de fotodegradação com os demais excipientes ou com componentes da pele pode levar a formação de novas moléculas com propriedades toxicológicas desconhecidas (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2006).

#### 2.4.5.1 Eficácia contra a radiação UVB – o fator de proteção solar (FPS)

O fator de proteção solar é uma medida da capacidade de um filtro solar de proteger contra o eritema que é causado principalmente pela radiação UVB, sendo então uma medida de eficácia do filtro contra a radiação UVB. Diversas agências reguladoras estão envolvidas na normatização sobre filtros solares, como a FDA e o

COLIPA. Nos Estados Unidos (EUA), a FDA publicou, em 1999, sua última monografia sobre os filtros solares. Nela, os filtros solares são enquadrados na categoria de drogas OTC (over the counter, denominação para medicamentos de venda livre) (ROSEN, 2003).

No Brasil, a ANVISA considera os filtros solares como cosméticos e enquadra os produtos para proteção solar nas categorias apresentadas (QUADRO 3).

QUADRO 3: Categorias em que se enquadram os produtos para proteção solar (ANVISA, 2002).

Fotipos de Pele	Comportamento da Pele à Radiação Solar	Proteção Recomendada	FPS Recomendado
Pouco Sensível	Raramente Apresenta Eritema	Baixa	$\geq 2 < 6$
Sensível	Ocasionalmente Apresenta Eritema	Moderada	$\geq 6 < 12$
Muito Sensível	Freqüentemente Apresenta Eritema	Alta	$\geq 12 < 20$
Extremamente Sensível	Sempre Apresenta Eritema	Muito Alta	$\geq 20$

A ANVISA define fator de proteção solar como sendo a razão entre a dose mínima eritematosa (DME) na pele protegida, dividida pela dose mínima eritematosa na pele não protegida (EQUAÇÃO 1). A DME é definida como a dose mínima de radiação ultravioleta requerida para produzir a primeira reação eritematosa perceptível com bordas claramente definidas, observadas entre 16 e 24 horas (h) após a exposição à radiação ultravioleta (ANVISA, 2002).

$$\text{FPS} = \frac{\text{DME (pele protegida)}}{\text{DME (pele não protegida)}}$$

EQUAÇÃO 1: Fator de Proteção Solar (ANVISA, 2002).

A ANVISA não descreve um método para determinação do FPS, mas indica que deverá ser realizada pela aplicação estrita de uma das seguintes normas de testes *in vivo*: (a) Federal Register - Norma FDA- Department of Health and Human Services - Wednesday May 12, 1993 - Sunscreen Drug Product for Over the Counter

Human Use; Final Monograph; Final Rule; Subparte D Testing Procedure, seção 352.70 a 352.73, (b) Norma Colipa- Colipa Sun Protection Factor Test Method- The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association ref. 94/289 October 1994 (ANVISA, 2002).

#### 2.4.5.1.1 Métodos *in vivo* de determinação do FPS

Em linhas gerais, os métodos de determinação de FPS *in vivo* utilizam 20 indivíduos sadios, homens e mulheres com sensibilidade mediana a radiação UV. É demarcada uma área nas costas do voluntário (0,3 m x 0,3 m) aplica-se a amostra formando um filme de 2,0 mg/cm<sup>2</sup> e mantém-se uma região desprotegida que é separada por uma fita de 1,0 cm de largura. A irradiação é realizada com uma lâmpada UV de 300 W, 20 minutos após a aplicação do produto. Mede-se o tempo de formação de eritema e através dos cálculos determina-se o FPS (JANOUSEK, 1997). O padrão utilizado pela FDA é uma formulação contendo 8,0% de homosalato que resulta em um FPS de 4,47 (RIBEIRO, 2004).

#### 2.4.5.1.2 Métodos *in vitro* de determinação do FPS

Como alternativa aos métodos *in vivo*, existem métodos *in vitro* que foram desenvolvidos com o objetivo de acelerar o resultado e diminuir o custo dos testes *in vivo*. Atualmente, estes métodos podem ser utilizados para avaliar o FPS durante o desenvolvimento de novas formulações e para o controle de qualidade de rotina, lote a lote (RIBEIRO *et al.*, 2004).

Os principais empregam soluções diluídas dos produtos testados que são levadas para leitura por espectrofotometria no UV. Os métodos podem explorar a absorvância (MANSUR *et al.*, 1986) ou a reflectância (DIFFEY, 1997) dos filtros solares.

O método descrito por Mansur (MANSUR *et al.*, 1986) é o mais difundido. É um método simples no qual é preparada uma solução com solvente apropriado para a formulação e filtro solar a ser avaliado, com concentração conhecida, para que possa ser avaliada por espectrofotometria no ultravioleta. Mede-se a absorvância (Abs.) em comprimentos de onda definidos e através da fórmula matemática desenvolvida (EQUAÇÃO 2) e de valores para correção (TABELA 3), é possível relacionar os valores de absorvância obtidos com o FPS da amostra (SANTOS *et al.*, 1999).

$$\text{FPS} = \text{FC} \cdot \sum_{320}^{290} \text{EE}_{\lambda} \cdot I_{\lambda} \cdot \text{Abs}_{\lambda} \quad (\text{conc.} = 0,2\mu\text{L/mL ou } 0,2\text{mg/mL})$$

EQUAÇÃO 2: Cálculo do FPS segundo Mansur (MANSUR *et al.*, 1986).

Onde,

FC = fator de correção (igual a 10).

$\text{EE}_{\lambda}$  = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda definido pelo QUADRO 4.

$I_{\lambda}$  = intensidade da luz solar no comprimento de onda definido pelo QUADRO 4.

$\text{Abs}_{\lambda}$  = absorvância da solução no comprimento de onda definido pelo QUADRO 4.

QUADRO 4: Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda (MANSUR *et al.*, 1986).

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

#### 2.4.5.2 Eficácia contra a radiação UVA

Atualmente, não existem métodos padronizados aceitos para a medida da proteção UVA. A ANVISA apenas indica que a quantificação da proteção UVA deverá ser realizada através de métodos reconhecidos devidamente validados (ANVISA, 2002). Uma vez que a radiação UVA é 1000 vezes menos eritematosa que a UVB, usar o eritema como marcador nos testes, torna-se inviável pelo tempo muito longo em que os voluntários deveriam permanecer imóveis. Os métodos *in vivo* mais comuns são os baseados em: pigmentação imediata, pigmentação persistente e fator de proteção no UVA. Este último não é mais utilizado, pois é necessária a aplicação tópica de psoralen seguida pela exposição UVA, possuindo um potencial carcinogênico. Entre os métodos *in vivo*, o de pigmentação persistente é o mais empregado porque a pigmentação permanece estável entre 2 e 24 horas e é sensível a todos os filtros UVA permitidos. A proteção UVA pode ser medida por espectrofotometria onde é determinado o comprimento de onda principal que é definido como sendo o comprimento de onda, entre 290nm e 400nm, em que ocorre pelo menos 90% da absorção do filtro. Os consumidores devem ser orientados a

procurar nos rótulos dos produtos comerciais as expressões: amplo espectro de proteção e/ou proteção UVA e UVB, e verificar a presença de filtros anti-UVA na lista de composição (KULLAVANAJAYA; LIM, 2005; ROSEN, 2003).

## 2.5 BENZOFENONA-3

As benzofenonas começaram a ser utilizadas como filtros solares no final da década de 50. A benzofenona-3 (BZ-3) (2-hidroxi-4-metoxibenzofenona) ou oxibenzona, um composto lipofílico, é o mais utilizado dessa categoria nos Estados Unidos (NEDOROST, 2003). A BZ-3 (FIGURA 8) é um congênere monometoxilado da 2-hidroxibenzofenona que é encontrada em pigmentos de plantas. Ela pode ser sintetizada pela reação entre o 2-hidroxianisol e cloreto de benzoíla (STECHEER, 1958).

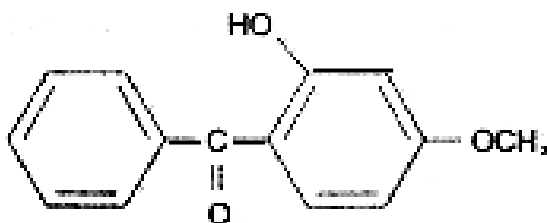


FIGURA 8: Estrutura da benzofenona-3 (SHAATH, 1997).

As hidroxibenzofenonas e seus derivados têm a habilidade de absorver e dissipar a radiação UVA, porém absorvendo em menor intensidade, na região UVB (SUZUKI *et al.*, 2004). As benzofenonas são a única classe de filtros solares formada por cetonas aromáticas. A deslocalização por ressonância é acrescida pela presença de um grupamento doador de elétrons nas posições *orto* e/ou *para*. O grupamento carbonila participa deste processo, sendo o grupamento receptor de

elétrons (SHAATH, 1997). A BZ-3 possui dois picos de absorção com  $\lambda$  máximos em 288 nm e 325nm, é fotolábil e pode ser oxidada rapidamente (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005).

Quando comparadas a outros filtros, as benzofenonas fazem ressonância mais facilmente requerendo menor energia quântica para a transição eletrônica (FIGURA 9). E como a energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda ( $E = hc/\lambda$ ), os compostos desta classe absorverão a energia com valores correspondentes de comprimento de onda acima de 320 nm (SKOOG; LEARY, 1992; SHAATH, 1997).

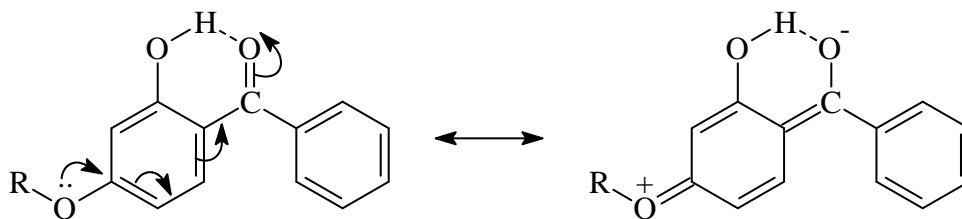


FIGURA 9: Estruturas de ressonância das benzofenonas (SHAATH, 1997).

A FDA aprova o uso da BZ-3 como filtro solar e nas funções de aditivo alimentar indireto (componente das embalagens) e fotoestabilizante em filmes usados na agricultura e em tintas (OKEREKE *et al*, 1995). A ANVISA aprova o uso da BZ-3 como filtro solar em produtos para higiene pessoal, cosméticos e perfumes na concentração máxima de 10% e ressalta que para concentrações maiores que 0,5% deve-se incluir a seguinte advertência na rotulagem: contém oxibenzona (ANVISA, 2006).

Estudo de farmacocinética da BZ-3 após administração dérmica em ratos apontou um modelo de eliminação bicompartimental. A eliminação ocorre através de um padrão bifásico  $\alpha$  e  $\beta$ , com meias-vidas de 1,3 h e 15,1 h, respectivamente. A absorção dérmica foi muito rápida com meia-vida de 0,87 h (OKEREKE *et al*, 1994).

Além disso, a BZ-3 não possui potencial tóxico agudo ( $DL_{50} > 12,8\text{g/Kg}$  em ratos) (LEWERENZ *et al.*, 1972).

A metabolização da BZ-3 produz compostos, através de reações catalisadas pelo sistema enzimático do citocromo P-450, que também são utilizados como filtros solares. A BZ-3 produz três metabólitos: 2,4-dihidroxibenzofenona, 2,3,4-trihidroxibenzofenona e 2,2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona (OKEREKE *et al.*, 1993).

Embora seja um filtro amplamente utilizado, a BZ-3 pode causar reações adversas. A BZ-3 pode causar eritemas faciais em pessoas alérgicas a este composto (NEDOROST, 2003), podendo causar também urticária logo após aplicação e uma dermatite tardia (COLLINS; FERGUSON, 1994).

Além dos problemas dermatológicos associados à BZ-3, algumas pesquisas têm levantado a possibilidade de ações adversas sistêmicas da BZ-3. Hayden e colaboradores quantificaram a absorção sistêmica da BZ-3 em voluntários humanos. Após 12 horas de ensaio, 1% a 2%, da quantidade de BZ-3 aplicada na pele, foi detectado na urina. Nesta pesquisa foram utilizadas quantidades de filtro seis vezes maiores que as utilizadas para determinação do fator de proteção solar (HAYDEN *et al.*, 1997).

Em um estudo de segurança da BZ-3, após administração dérmica em ratos, a BZ-3 formulada em uma base oleosa foi aplicada na dose de 100 mg/Kg de peso corpóreo, duas vezes ao dia, por quatro semanas. Baseando-se nos seus resultados bioquímicos, hematológicos e patológicos sugeriu que a BZ-3 não é tóxica nas condições da pesquisa (OKEREKE *et al.*, 1995).

Um estudo de mutagenicidade em bactérias teve resultado positivo para a 2,2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona, metabólito da BZ-3 (MORTELMANS *et al.*, 1986). A BZ-3 obteve resultado positivo como uterotrófico em ensaio utilizando ratas



jovens (NAKAGAWA; TAYAMA, 2001). Ma e colaboradores indicou que a BZ-3 é um antagonista fraco para o receptor de hormônios androgênicos no ensaio com células MDA-kb2 (MA *et al.*, 2003).

Outro estudo sobre a atividade estrogênica de derivados da BZ-3 utilizou o ensaio para uterotróficos com ratas ovariectomizadas. Como resultado, a 2,4-dihidroxibenzofenona (metabólito da BZ-3) foi indicada como composto estrogênico fraco (KODA *et al.*, 2005).

Suzuki e colaboradores avaliaram as atividades estrogênicas e antiandrogênicas de 17 derivados da benzofenona. Neste estudo, as benzofenonas hidroxiladas, como a BZ-3, mostraram atividade estrogênica em células MCF-7 de câncer de mama humanas. Alguns derivados também mostraram efeitos inibitórios significantes na atividade androgênica da dihidrotestosterona em células NIH3T3 de fibroblastos de ratos. Como conclusão, indicaram que o grupamento hidroxil na posição quatro do anel fenílico dos derivados, é essencial para atividades hormonais elevadas (SUZUKI *et al.*, 2005). A atividade estrogênica da BZ-3, utilizando células MCF-7, foi confirmada por Schlumpf e colaboradores (SCHLUMPF *et al.*, 2004).

## 2.6 *p*-METOXICINAMATO DE OCTILA

O *p*-metoxicinamato de octila (MCO) (octinoxato, *p*-metoxicinamato de etilhexila) (FIGURA 10) é capaz de absorver a radiação na região UVB, pertence à classe dos cinamatos, sendo esta uma das classes mais utilizadas na proteção da porção UVB do espectro eletromagnético (SHAATH, 1997). É atualmente o filtro anti-UVB mais utilizado nos Estados Unidos (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005). A

concentração máxima de uso do MCO é 10% na Europa e 7,5% nos EUA (HUONG, 2006). A ANVISA aprova o uso do MCO como filtro solar em produtos para higiene pessoal, cosméticos e perfumes na concentração máxima de 10% (ANVISA, 2006).

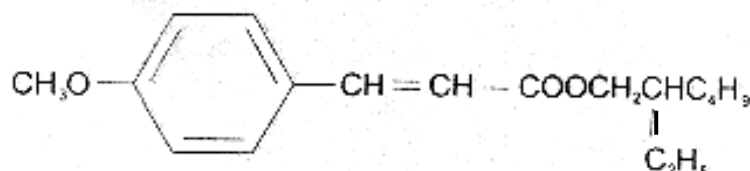


FIGURA 10: Estrutura do *p*-metoxicinamato de octila (SHAATH, 1997).

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

Estudos com modelos animais mostraram que o MCO não é tóxico por administração oral ( $DL_{50} > 5g/Kg$  em ratos), não irrita a pele e mucosas, não causa sensibilização e não é mutagênico pelo teste de Ames (SCHNEIDER *et al.*, 2005).

O primeiro problema relacionado ao uso do MCO é sua capacidade de sofrer fotoisomerização, quando o isômero E (utilizado como filtro solar) é irradiado sofre degradação por dimerização da estrutura molecular do cinamato, levando a perda de ação. Como esse fenômeno ocorre rapidamente, pode-se sugerir que ocorra na superfície da pele o que diminuiria a proteção dada pelo MCO. A extensão dessa perda irá depender dos outros constituintes da formulação e do ambiente em que o MCO será posto. A taxa mínima de isomerização, se for de 20%, irá acarretar numa

diminuição de aproximadamente 10% do FPS. Para uma taxa de isomerização de 60% a queda no FPS pode variar entre 29% e 38% (HUONG, 2006).

Em relação a ações hormonais, o MCO apresentou atividade antiandrogênica nas concentrações de 1,0 nM até 10,0  $\mu$ M, quando testados em receptores de células MDA-kb2 de carcinoma de mama humana (MA *et al.*, 2003). Outro estudo demonstrou o aumento da produção de vitelogenina, um marcador clássico de atividade estrogênica, em peixes Medaka machos (INUI *et al.*, 2003). O MCO foi capaz de estimular a proliferação *in vitro* de células MCF-7 (células sensíveis a estrogênio) e apresentou atividade estrogênica no teste uterotrófico com ratas Long-Evans jovens (SCHLUMPF *et al.*, 2004). Quando este mesmo teste foi realizado com ratas Wistar jovens, o MCO teve resultado negativo com doses semelhantes aquelas já utilizadas. Além disso, não foi observada ligação *in vitro* do MCO a receptores estrogênicos de úteros de porcos ou a proteínas recombinantes RE $\alpha$  e RE $\beta$ . Não houve indicação de atividade antiandrogênica no teste de Hershberger usando ratos castrados e não houve evidências da influência do MCO, administrado por via oral, na reprodução de ratos Wistar (SCHNEIDER *et al.*, 2005).

## 2.7 LIPOSSOMAS

Os lipossomas (FIGURA 11) têm sido investigados como um sistema de liberação de substâncias em locais específicos do corpo desde os anos 60 (ZHU *et al.*, 2005). São vesículas nas quais um volume aquoso está totalmente envolto por uma membrana lipídica. Quando lipídios anfipáticos, contendo uma cabeça polar e uma cauda hidrocarbônica hidrofóbica, são suspensos em um meio aquoso,

associaram-se espontaneamente, criando uma população de vesículas que podem variar em tamanho de dezenas de nanômetros até dezenas de microns de diâmetro. A estrutura básica em bicamada dos lipossomas é similar a das membranas celulares. As vesículas possuem uma ou mais bicamadas lipídicas que aprisionam compartimentos aquosos (NEW, 1997; GÓMEZ-HENZ; FERNANDEZ-ROMERO, 2006).

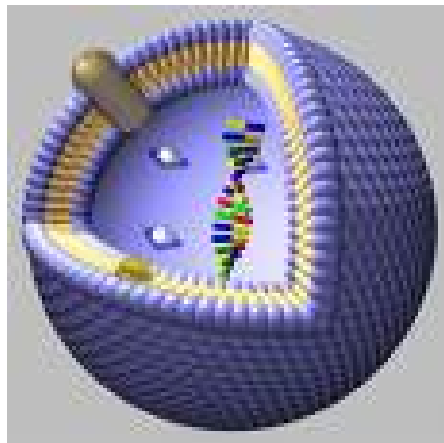


FIGURA 11: Estrutura tridimensional dos lipossomas (Acessado em 10/12/2006 de <http://www.avantilipidis.com/images/liposomes/vesicle.jpg>)

Podem ser construídos de forma a armazenar compostos hidrofílicos no compartimento aquoso ou compostos lipofílicos na membrana lipídica (FIGURA 12).

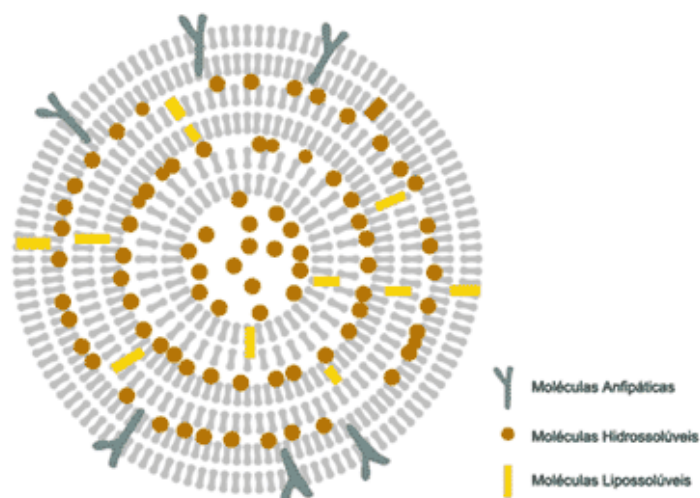





FIGURA 12: Localização de ativos lipofílicos e hidrofílicos nos lipossomas ([http://www2.cristalia.com.br:8080/cristalia/site/images/empresa/parceiros\\_unicamp\\_ipossoma.gif](http://www2.cristalia.com.br:8080/cristalia/site/images/empresa/parceiros_unicamp_ipossoma.gif), acessado em 05/02/2007).

A forma e o tamanho dos lipossomas depende do método de preparação, da composição lipídica, da força iônica do meio e do pH (ANSEL, 1999). Segundo a estrutura podem ser classificados conforme explicitado na TABELA 1.

TABELA 1: Classificação dos lipossomas (Adaptado de NEW, 1997).

Parâmetros	Vesículas multilamelares (VML)	Vesículas unilamelares pequenas (VUP)	Vesículas unilamelares grandes (VUG)
Forma			
Diâmetro (nm)	400 – 3500	20 – 50	200 – 1000
Volume Aquoso ( $\mu\text{L}/\text{mg}$ )	4,1	0,5	13,7
% de encapsulação	5 – 15	0,5 – 1,0	35 – 65

Um dos pontos importantes do emprego de lipossomas é a possibilidade de serem constituídos de componentes naturais conferindo grande similaridade com as membranas celulares, tornando-os um veículo eficaz e seguro. Alternativamente, os lipossomas podem ser compostos por constituintes inteiramente artificiais, escolhidos por suas propriedades químicas (NEW, 1997).

Dentre os diferentes lipídios que podem ser empregados na formação dos lipossomas podemos citar: fosfatidilcolina (de ovo e de soja), fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina hidrogenada, 1,2 dioleoil-glicero-3-fosfocolina, 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina, diestearoilfosfatidiletanolamina, colesterol e 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (MELO *et al.*, 2003). O mais empregado é a fosfatidilcolina (PC) (FIGURA 13), presente em grandes quantidades nas membranas celulares (NACHT, 1995; IMBERT; WICKETT, 1995; NEW, 1997).

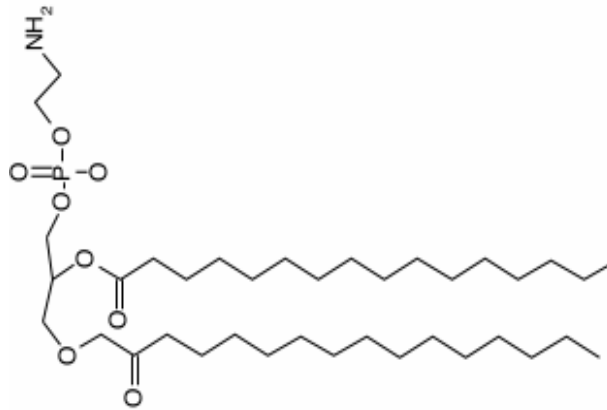


FIGURA 13: Estrutura da fosfatidilcolina.

As moléculas de PC se alinham em meio aquoso e formam folhas de bicamadas planares, minimizando as interações desfavoráveis entre o meio e as cadeias hidrofóbicas. Essas interações são completamente eliminadas, quando estas folhas fecham em si próprias formando vesículas seladas (FIGURA 14). As moléculas de PC podem ser obtidas de origem natural ou sintética. Elas podem ser prontamente extraídas da soja, tendo um alto grau de polinsaturação nas cadeias graxas. A PC obtida de fontes naturais é constituída por uma mistura de fosfatidilcolinas, cada uma com cadeias de tamanhos diferentes e com vários graus de insaturação (NEW, 1997).

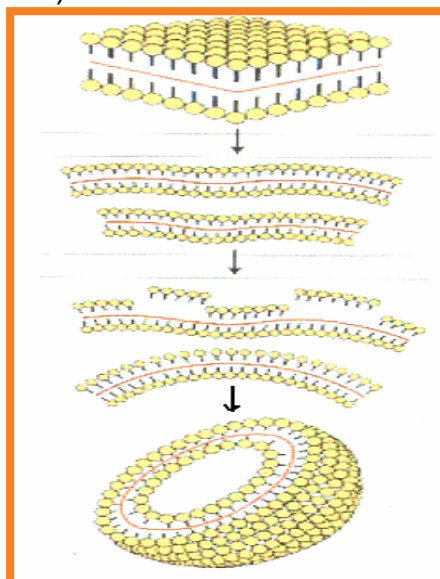


FIGURA 14: Processo de formação das vesículas lipossomais.

Na formação dos lipossomas podem ser adicionados esteróis, como o colesterol e agentes indutores de carga com o objetivo de facilitar a interação com as bicamadas e/ou estabilizar os lipossomas, evitando processos de fusão e agregação das vesículas e o esvaziamento do material incorporado. O colesterol (FIGURA 15) é um componente importante na maioria das membranas naturais e sua incorporação nas membranas lipossomais tem o objetivo de aumentar a estabilidade desta, tornando-a mais semelhante às membranas biológicas, e contribuindo para o aumento da resistência pela diminuição da fluidez da membrana lipossomal (TALSMA; CROMELLIN, 1992).

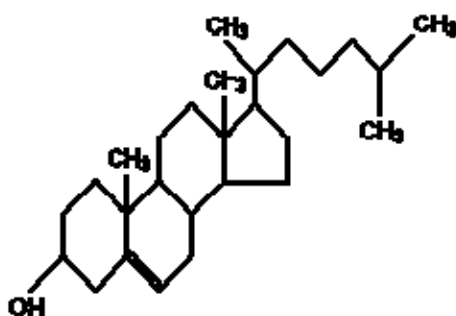


FIGURA 15: Estrutura do colesterol.

A natureza e características dos lipossomas, assim como os métodos utilizados para sua formação, estão amplamente documentados na literatura. A escolha correta do tipo de lipossoma a ser utilizado no sistema de liberação irá depender de alguns critérios (GÓMEZ-HENS; FERNANDEZ-ROMERO, 2006):

- características físico-químicas da substância que será incorporada e dos constituintes do lipossoma;
- natureza do meio em que o lipossoma é disperso;
- a concentração de ativo que efetivamente é incorporada e sua toxicidade potencial;

- d) processos adicionais envolvidos na liberação do lipossoma;
- e) modificações nas características dos lipossomas no sítio de ação.

Comparado a outros sistemas de liberação, os lipossomas tem propriedades em termos de biocompatibilidade, biodegradação, baixa toxicidade, facilidade de incorporação de compostos, variabilidade de estruturas e características físico-químicas que os destacam. Contudo, existem alguns problemas limitantes no desenvolvimento e industrialização de sistemas utilizando lipossomas: estabilidade, irreprodutibilidade lote a lote, cuidados para esterilização, baixa taxa de incorporação, dificuldades no controle dos tamanhos dos lipossomas e irregularidade na produção em grande escala (GÓMEZ-HENS; FERNANDEZ-ROMERO, 2006).

### **2.7.1 Aplicação dos lipossomas em formulações de uso tópico**

Muitos fatores governam a liberação de fármacos e outros compostos na pele a partir de formulações de uso tópico. Estes fatores incluem o tamanho da molécula, lipofilia do ativo, tipo de formulação, presença de promotores de penetração e estado do EC. Os lipossomas vêm sendo usados por anos para liberarem ativos dentro da pele. Características como número de lamelas, composição lipídica, carga na superfície lipossomal, modo de aplicação e a concentração de lipídios total tiveram influência comprovada na liberação de ativos pelos lipossomas nas camadas internas da pele (VERMA *et al.*, 2003).

Entre os primeiros estudos que indicaram o potencial dos lipossomas nas aplicações tópicas na pele, existem dois realizados com coelhos que fizeram uma



comparação entre formulações convencionais e lipossomais de triancinolona. Em ambos, as aplicações de preparações lipossomais foram associadas a concentrações maiores de esteróide na epiderme e derme e uma absorção sistêmica menor que as formulações convencionais (FIGURA 16) (MEZEI; GULASEKHARAM, 1980, 1982).

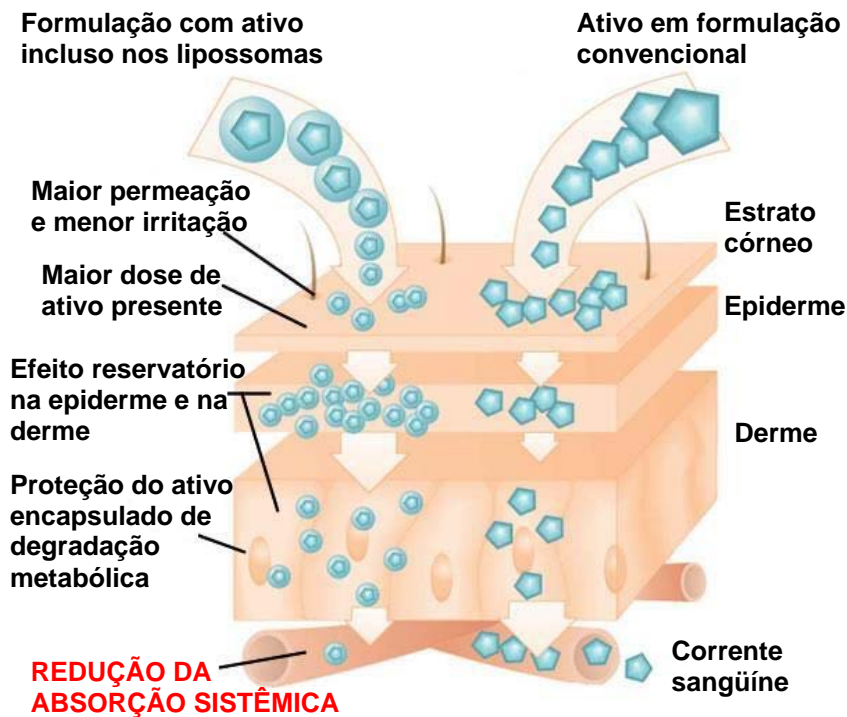


FIGURA 16: Comparação entre formulações lipossomais e convencionais (Adaptado do Catálogo Lipo Chemicals INC. and Biozone Laboratories INC.).

Já foi descrito que a maior elasticidade das vesículas pode aumentar o transporte de ativos pela pele em comparação com vesículas de membrana rígida (CEVC *et al.*, 1998). Lipossomas com uma composição lipídica heterogênea aumentam a penetração na pele dos ativos aprisionados. Supõe-se que, uma vez em contato com a pele, deva ocorrer uma eclosão do lipossoma. Isso poderia causar uma mistura da bicamada do lipossoma com os lipídios intracelulares do EC, levando a uma mudança na hidratação e na estrutura lamelar. Tal efeito aumenta a

penetração de compostos lipofílicos no EC e facilita a difusão de compostos hidrofílicos pelos espaços interlamelares (VERMA *et al.*, 2003).

Por outro lado, é possível que algumas vesículas mais deformáveis passem intactas pelo EC ou se acumulem em regiões semelhantes a canais dependendo de sua composição (HONEYWELL-NGUYEN, 2000).

A forma de aplicação dos lipossomas é outro ponto de discussão. Vesículas flexíveis são mais eficientes em aplicações não oclusivas. Isto seria a chave para criar um gradiente osmótico transepidermal. Este seria a força motriz do transporte dos lipossomas para dentro da pele (CEVC; BLUME, 1992).

Puglia e colaboradores realizaram testes de estímulo à ação eritematosa por radiações UV com voluntários. Aplicou-se um gel para uso tópico contendo indometacina incorporada ao lipossoma e o mesmo gel sem lipossoma. Os resultados concluíram que o gel com lipossomas obteve um tempo de ação prolongado e que isto estaria relacionado às interações das vesículas com os lipídios do EC (PUGLIA *et al.*, 2004).

Um estudo de permeação em células de difusão de Franz utilizou mucosa vaginal de coelhas e mostrou que há um aumento da concentração do antifúngico veiculado em lipossomas no local de aplicação (NING *et al.*, 2005).

A N,N-dietil-m-toluamida (DEET) usada como repelente de mosquito, teve sua ação comparada entre uma formulação convencional e uma formulação em gel no qual tinha-se o DEET incluso em lipossomas. A inclusão nos lipossomas levou a um aumento do tempo de ação por um período de 12 horas (MIRANDA, 2005).

Devido a suas propriedades lipofílicas, os filtros solares podem ser incorporados entre os fosfolipídios das membranas dos lipossomas (TRAN *et al.*, 2002). Existem na literatura estudos que caracterizaram a incorporação de filtros

solares e demonstraram um efeito reservatório na pele (WOLF *et al.*, 1995; GARCIA, 1998).

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver uma formulação protetora solar contendo os filtros BZ-3 e MCO inclusos em lipossomas visando à maior ação protetora quando comparado a uma formulação convencional.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método de incorporação da BZ-3 em lipossomas;
- Comparar o método de hidratação do filme fosfolipídico com o de agitação do pré-lipossoma para o preparo dos lipossomas;
- Realizar a avaliação ultraestrutural dos lipossomas;
- Determinar os tamanhos dos lipossomas preparados;
- Desenvolver as seguintes formulações: gel contendo os filtros solares BZ-3 e MCO livres; gel contendo os filtros solares BZ-3 e MCO inclusos nos lipossomas e gel contendo os filtros solares BZ-3 e MCO livres e fosfolipídios dispersos. Na formulação com lipossomas deverão ser adicionados ambos os filtros solares livres para obter o mesmo FPS das demais formulações;

- Determinar durante 3 meses e comparar estatisticamente o FPS de todas as formulações determinado por método *in vitro*;
- Determinar o FPS de todas as formulações por método *in vivo* e comparar estatisticamente com os valores obtidos *in vitro*;
- Comparar a permanência da formulação contendo os filtros solares inclusos nos lipossomas, frente as outras formulações quando aplicadas na pele, através de testes de resistência à água (*in vivo*) das formulações.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Equipamentos

- Espectrofotômetro UV-VIS SHIMADZU CORPORATION mod. UV-2401 PC com software UVPC;
- Espectrofotômetro de infravermelho FTIR - 8300 PERKIN ELMER com software Hyper - IR;
- Aparelho para determinação de ponto de fusão BÜCHI B-540;
- Refratômetro CARL ZEISS 120540;
- Potenciômetro METTLER TOLEDO MPC227;
- Microscópio eletrônico de transmissão AXIOPLAN2 ZEICE;
- Microscópio óptico MORGAGNI mod. 268 FEI;
- Aparelho ZETASEIZER;
- Agitador de tubos PHOENIX AP56;
- Rota-evaporador BÜCHI R-114;
- Balança analítica METTLER TOLEDO AB204;
- Balança de precisão METTLER TOLEDO PB3002;
- Aparelho de ultra-som THORNTRON – 14;
- Placa de aquecimento com agitação magnética CORNING;
- Destilador QUIMIS Q. 341-210

#### 4.1.2 Outros materiais

- Suporte para filtração SWINEX<sup>®</sup> em polipropileno com 25 mm de diâmetro;
- Colunas PD-10 vazias PHARMACIA BIOTECH;
- Sephadex<sup>®</sup> G-50 SIGMA-ALDRICH;
- Seringas descartáveis de 5,0 mL BECKTON & DICKSON;
- Membranas de policarbonato ISOPORE<sup>®</sup> com poros de 0,4 µm e 0,2 µm;

#### 4.1.3 Reagentes

- Ácido ascórbico (ROCHE);
- Ácido clorídrico P.A. (VETEC);
- Ácido fosfotungstico (SIGMA);
- Ácido sulfúrico P.A. (VETEC);
- Clorofórmio P.A. (VETEC);
- Etanol P.A. (VETEC);
- Metanol P.A. (VETEC);
- Molibdato de amônio (MERCK);
- Peróxido de hidrogênio (VETEC);
- Solução padrão de fósforo a 20 µg P / mL (SIGMA);
- TRIS – Tris[hidroximetil]aminometano (SIGMA).

#### 4.1.4 Filtros solares – Padrões de trabalho

- Benzofenona-3 teor declarado: 102,7% (SPECTRUM);
- *p*-Metoxicinamato de octila teor declarado: 100% (SPECTRUM).

#### 4.1.5 Matérias-primas

- Benzofenona-3 (VETEC);
- Colesterol (SIGMA);
- Eumulgin® VL 75 (lauril glucósido, poligliceril 2-dipoli-hidroxiestearato e glicerina);
- Hidroxietil celulose (natrosol);
- Metilparabeno (ROCHE);
- *p*-Metoxicinamato de octila (MERCK);
- Phosal® 75 AS (GmbH);
- Phospholipon® 90NG (GmbH).



## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Preparo das soluções utilizadas na pesquisa

#### 4.2.1.1 Preparo da solução tampão TRIS pH 6,8

Pesar 2,42g de Tris[hidroximetil]aminometano, transferir quantitativamente para balão volumétrico de 100,0 mL e completar o volume com água destilada. Ajustar o pH da solução para 6,8 utilizando HCl concentrado e monitorando com o potenciômetro. A solução deve ser armazenada em frasco de vidro âmbar sob refrigeração.

#### 4.2.1.2 Preparo da solução reagente de molibdato de amônio

Pesar 2,2g de molibdato de amônio, transferir quantitativamente para balão volumétrico de 1000,0 mL, adicionar cerca de 300 mL de água destilada. Colocar o balão em banho de gelo e adicionar lentamente a solução de  $H_2SO_4$  preparada (7,0 mL de  $H_2SO_4$  concentrado em 400,0 mL de água destilada). Retirar o balão volumétrico do gelo, aguardar o retorno à temperatura ambiente e completar o volume do balão com água destilada (MORITA; ASSUMPÇÃO, 2001). A solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar.

#### 4.2.1.3 Preparo da solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10N

Em um balão volumétrico de 100,0 mL, adicionar 50 mL de água destilada. Colocar o balão em banho de gelo e adicionar lentamente 30 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Retirar o balão volumétrico do gelo, aguardar o retorno à temperatura ambiente e completar o volume do balão com água destilada (MORITA; ASSUMPÇÃO, 2001).

#### 4.2.1.4 Preparo da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% (v/v)

Pipetar 3,4 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> P.A., transferir para balão volumétrico de 10,0 mL e completar com água destilada. Esta solução deve ser preparada no momento do uso (MORITA; ASSUMPÇÃO, 2001).

#### 4.2.1.5 Preparo da solução de ácido ascórbico 10% (p/v)

Pesar 1,0g de ácido ascórbico, transferir quantitativamente para balão volumétrico de 10,0 mL e completar com água destilada. Esta solução deve ser preparada no momento do uso (MORITA; ASSUMPÇÃO, 2001).

#### 4.2.1.6 Preparo da solução de fosfotungstato de potássio 2% (p/v)

Pesar 0,57g de ácido fosfotungstico em um becher de 50 mL, adicionar cerca de 5 mL de água destilada. Neutralizar até pH 7,0 com solução aquosa de KOH 1 M.

Transferir a solução para balão volumétrico de 10,0 mL e completar o volume com água destilada (MORITA; ASSUMPÇÃO, 2001).

#### **4.2.2 Análise dos filtros solares utilizados como padrões de trabalho**

##### **4.2.2.1 Determinação do ponto de fusão (PF) da BZ-3**

Uma pequena quantidade do filtro foi colocada em um capilar de vidro fechado em uma das pontas e este é colocado no suporte da amostra do aparelho Büchi B-540 para a determinação do PF.

##### **4.2.2.2 Determinação do índice de refração do MCO**

Uma gota do filtro solar MCO, líquido oleoso, foi aplicada no local apropriado do refratômetro Carl Zeiss 120540, este índice mede quanto há de desvio da luz polarizada que passa pela substância opticamente ativa, sendo um valor único para cada substância.

##### **4.2.2.3 Análise do espectro de absorção na região ultravioleta**

Utilizando o espectrofotômetro SHIMADZU UV-2401PC, os espectros no ultravioleta foram obtidos realizando a leitura em triplicata de soluções etanólicas de 5mg/L e 6mg/L, para determinação do comprimento de onda máximo ( $\lambda$  máx) e cálculo do coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ). Os parâmetros utilizados foram: varredura de 450 a 220 nm, fenda 2,0 cm e intervalo de amostragem 1,0 nm.

#### 4.2.2.4 Análise do espectro de absorção na região infravermelha

Foi realizada a comparação entre os espectros existentes na literatura e aqueles obtidos no aparelho SHIMADZU FTIR-8300, utilizando a BZ-3 a 1% em pastilhas de KBr. Para o MCO, uma gota foi espalhada entre placas de cristal de cloreto de sódio.

#### 4.2.3 Construção da Curva de Ringbom para a BZ-3

A curva de Ringbom permite determinar qual faixa de concentração da BZ-3 produzirá uma resposta linear em relação à absorbância (Abs.), ou seja, qual faixa de concentração da BZ-3 irá responder a lei de Lambert-Beer (Ringbom, 1939; Yakabe *et al.*, 2005).

Para sua construção foram preparadas 12 soluções com concentrações crescentes na faixa de 0,4µg/mL a 60,0µg/mL, etanol P.A. foi escolhido como solvente. Foi registrado o espectro de absorção na faixa de 220,0nm a 450,0nm de cada uma das soluções. Os valores de absorção máximos serviram de base para a determinação do comprimento de onda máximo ( $\lambda$  máx) e para os cálculos dos percentuais de transmitância que formam os valores do eixo Y no gráfico. Os valores de logaritmo das concentrações foram calculados e fazem parte do eixo X do gráfico.

#### **4.2.4 Construção da curva-padrão para a determinação da equação da reta da BZ-3**

Com as concentrações escolhidas (05 pontos) a partir da curva de Ringbom, foram construídas três curvas-padrão (Abs. x Concentração.) para a BZ-3. Essas análises permitiram a construção da curva-padrão média e o cálculo da equação da reta com a determinação do coeficiente de correlação (r). (ANVISA, 2003)

#### **4.2.5 Construção da curva-padrão para a determinação da equação da reta do MCO**

Para o MCO, estudos anteriores já determinaram os valores de concentração que respondem linearmente a lei de Beer e o  $\lambda$  máx, tendo o etanol como solvente. Utilizando esses valores, foram construídas 3 curvas padrão e calculada a equação da reta.

#### **4.2.6 Preparação dos lipossomas contendo a Benzofenona-3**

De forma a obter vesículas multilamelares que possuem uma maior capacidade de incorporar substâncias lipofílicas, como a BZ-3, foram avaliados dois métodos: o de hidratação do filme fosfolipídico (Phospholipon<sup>®</sup> 90NG) e o que utiliza o pré-lipossoma (Phosal<sup>®</sup> 75 AS). Pesquisa anterior já demonstrou que para um outro ativo sólido lipofílico o método de preparo utilizando o pré-lipossoma demonstrou menor percentual de inclusão, quando comparado ao da hidratação do filme lipídico (HENRIQUES *et al.*, 2005). Portanto, iniciaram-se os cálculos

envolvidos para a obtenção dos lipossomas pelo método de hidratação do filme lipídico.

O melhor percentual de incorporação encontra-se entre 10 e 20% de ativo em relação aos constituintes lipídicos do lipossoma (NEW, 1997). Assim sendo, foram escolhidos os valores de 10% e 15% de BZ-3 como guias para alcançar a melhor quantidade de BZ-3 a ser incorporada. Foi utilizada a mesma proporção dos constituintes já descritas como tendo um bom rendimento e fácil manipulação, formada por: 42,0 mM de fosfatidilcolina (PC); 12,0mM de colesterol e 5,4 mM para BZ-3 (10% em relação ao total de lipídios) ou 8,1 mM para BZ-3 (15% em relação ao total de lipídios).

Para os ensaios preliminares foi preparado 25 mL da suspensão de lipossoma. Dessa forma foram calculadas as massas dos constituintes, sendo a PC e o colesterol pesado diretamente no balão de fundo redondo de 1,0 litro. A BZ-3 foi pesada separadamente e transferida quantitativamente para o balão com o auxílio de até 20 mL de clorofórmio P.A..

Agitou-se a mistura até completa solubilização dos constituintes, quando então o balão foi levado ao evaporador rotatório, onde permaneceu sob aquecimento até 40 °C, rotação lenta por 2 horas e inclinação do balão de forma a obter um filme fino e homogêneo na parede interna. Para garantir que todo solvente foi retirado, o balão permaneceu 24 horas no dessecador a vácuo.

Após este tempo, adicionaram-se algumas pérolas de vidro e 25 mL de tampão TRIS pH 6,8 para realizar a hidratação do filme fosfolipídico. A mistura foi levada a um agitador de tubos até observar o completo desprendimento do filme. Com a hidratação do filme fosfolipídico, as vesículas desprendidas irão se fechar, formando as primeiras vesículas (FIGURA 17). Este processo é demorado, portanto

em publicações anteriores o balão era deixado em repouso por 48 ou 96 horas sob refrigeração (4 °C) (GARCIA, 1998).

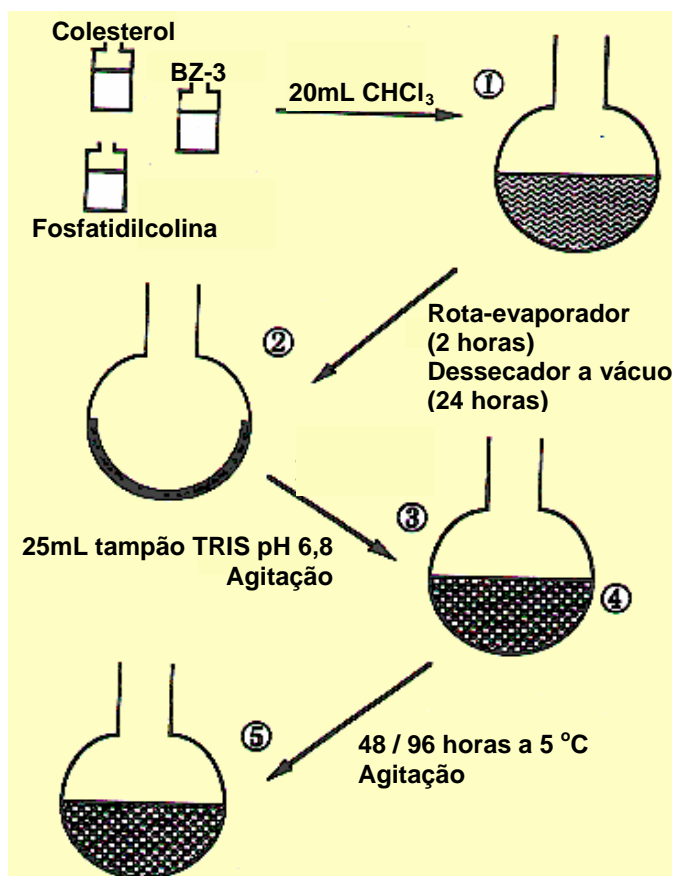


FIGURA 17: Formação de lipossomas por hidratação de filme lipídico.

#### 4.2.7 Preparação dos lipossomas contendo o *p*-Metoxinamato de octila

Por ser um filtro líquido oleoso, o MCO pôde ser incorporado nos lipossomas pelo método do pré-lipossoma. A concentração de 8,4 mM de MCO (20% em relação ao total de lipídios) foi utilizada por já ter sido eleita a melhor em pesquisa anterior (GARCIA, 1998). Neste procedimento, o lipossoma é formado a partir de uma mistura comercial de PC com outros adjuvantes (Phosal<sup>®</sup> 75 AS) utilizada na concentração de 42 mM. Foram calculadas as massas de Phosal<sup>®</sup> e de MCO a serem utilizadas para obter 25 mL da suspensão lipossomal. Os dois constituintes

foram pesados diretamente em um becher de 100 mL, misturados por 15 minutos com o auxílio de um bastão de vidro, e por fim adicionou-se 25 mL do tampão TRIS pH 6,8. A mistura foi deixada sob agitação mecânica por 2 horas (FIGURA 18).



FIGURA 18: Formação de lipossomas pelo método de agitação mecânica utilizando um pré-lipossoma.

#### 4.2.8 Normalização dos lipossomas

Para normalização do tamanho, os lipossomas preparados foram filtrados utilizando seringa descartável de 5,0 mL Beckton & Dickson acoplada em suporte de filtração Swinex<sup>®</sup> em polipropileno com 25 mm de diâmetro, contendo membrana de policarbonato (Isopore<sup>®</sup>) com poros de 0,4  $\mu\text{m}$  ou de 0,2  $\mu\text{m}$ . Após a passagem pela membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ , uma fração do lipossoma era separada para análise (FIGURA 19). A filtração em cada membrana deveria ser realizada duas vezes, porém como esse processo era manual, preparações mais concentradas exerciam uma pressão muito grande no sistema impedindo que se fizesse a filtração duas vezes.



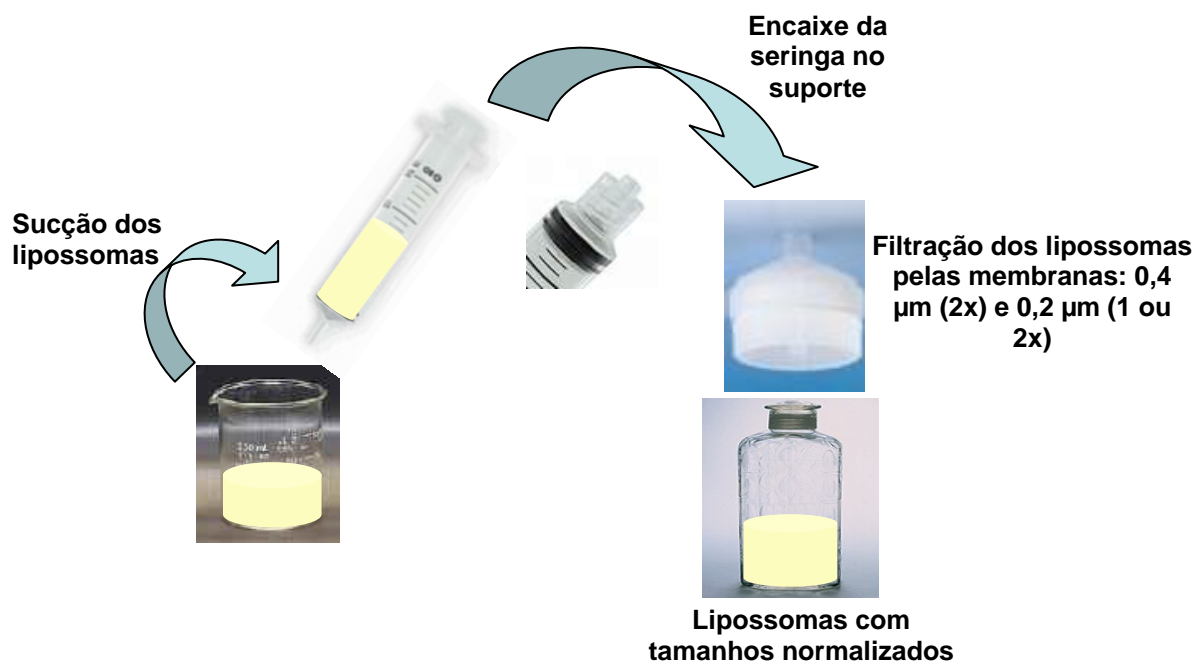


FIGURA 19: Processo de normalização do tamanho dos lipossomas.

#### 4.2.9 Avaliação do percentual de filtro incorporado no lipossoma

Nesta etapa final, separou-se 3,5 mL da fração após filtração na membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ , para que fossem passados em uma coluna PD-10 contendo Sephadex<sup>®</sup> G-50. Desta forma, o material que não estava incorporado no lipossoma ficaria retido na coluna, e a fração que passava por toda coluna era recolhida para análise (FIGURA 20).

Ao final de todo processo, para cada lipossoma preparado, tinham-se três frações da suspensão lipossomal para análise: inicial, após filtração na membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  e após passagem pela coluna Sephadex<sup>®</sup> G-50.

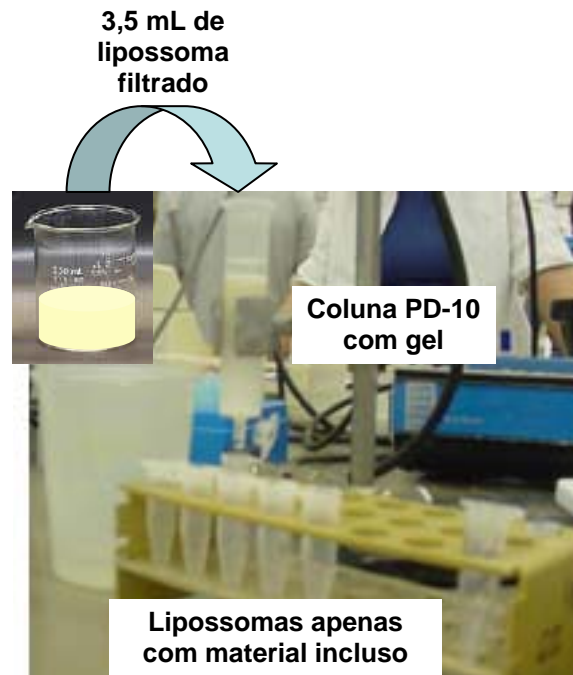


FIGURA 20: Passagem dos lipossomas por coluna de gel de Sephadex<sup>®</sup> G-50.

#### 4.2.10 Determinação da quantidade de filtro solar incorporado nas frações da suspensão lipossomal

Utilizando a massa de filtro inicialmente pesada para o preparo do lipossoma, calculou-se a diluição necessária das amostras para obter soluções com concentrações próximas a do ponto central da curva-padrão.

Para cada fração eram preparadas três diluições. Estas foram lidas no espectrofotômetro e seus valores de absorbância determinados no  $\lambda$  máx característico de cada filtro solar. A concentração do filtro solar em cada fração foi determinado pela equação da reta obtida da curva-padrão correspondente.

#### 4.2.11 **Determinação da quantidade de fosfolipídio nas frações pelo método de Bartlett**

Foi realizada a determinação indireta da concentração de fosfolipídios, avaliando-se o conteúdo de fósforo (P) em cada amostra. Por se tratar de um método com muitas variáveis, sempre que era realizado, havia a necessidade da construção de uma curva-padrão de fósforo. As amostras foram diluídas, baseando-se na massa inicial de fosfolipídio presente, para obter as soluções finais com concentração de aproximadamente 2 µg de fósforo / mL. Foi pipetado 1,0 mL de cada solução diluída para um tubo de ensaio, em três tubos foram pipetados 1,0 mL de água destilada que serviram de brancos e quatro tubos continham volumes crescentes de solução padrão de fósforo para construção da curva-padrão.

Neste método (FIGURA 21), primeiro as amostras sofrem uma hidrólise ácida, os fosfolipídios passam a fosfato inorgânico. Adiciona-se solução de molibdato de amônio que reage com o fosfato inorgânico formando o ácido fosfomolibdico. Este por sua vez forma um complexo azul, na presença de ácido ascórbico como agente redutor. A intensidade da cor azul é diretamente proporcional à quantidade de fósforo presente e é medida espectrofotometricamente (BARTLETT, 1959; GARCIA, 1998). A quantidade de fósforo encontrada é diretamente proporcional a quantidade de PC presente na amostra (1,0 mg de P ---- 25,0 mg de PC).

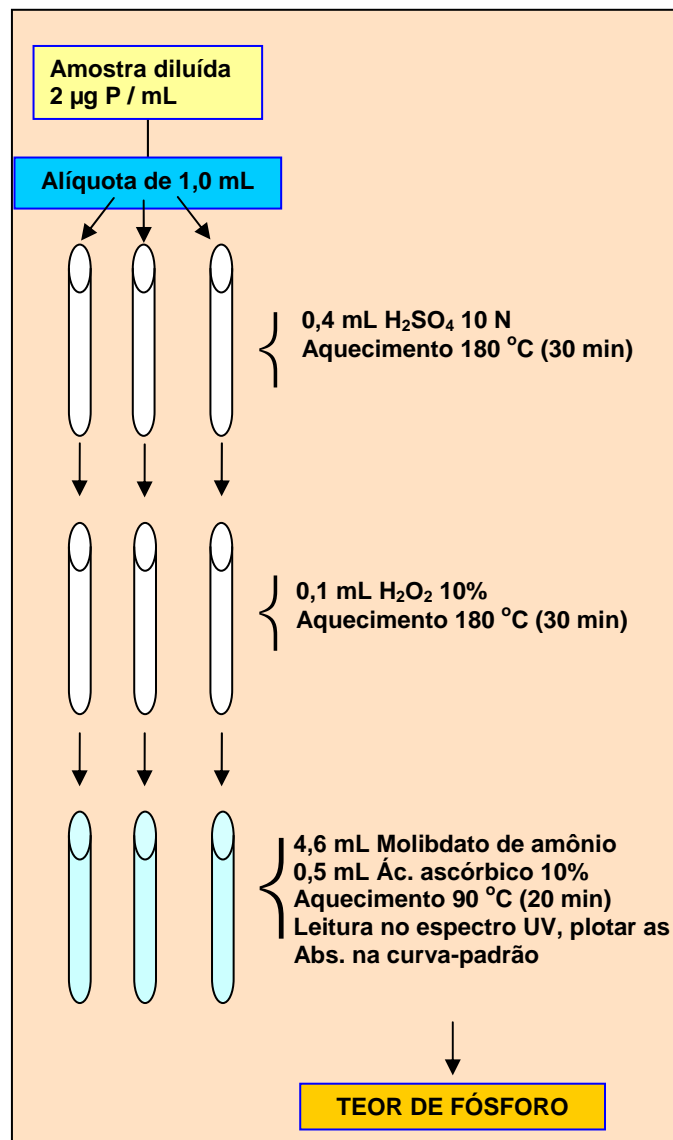


FIGURA 21: Método de Bartlett para determinação do teor de fósforo.

#### 4.2.12 Visualização dos lipossomas por microscopia óptica

As diferentes frações dos lipossomas preparadas com BZ-3 a 5,4 mM e a 7,0 mM foram observadas em microscópio óptico para verificar a formação das vesículas, seus tamanhos, formas e verificar a existência de cristais insolúveis do filtro. Cada fração foi diluída no momento da visualização com água destilada, conforme necessário. Uma gota foi colocada sobre lâmina e coberta com lamínula,

aplicando uma pequena pressão para imobilizar o maior número possível de vesículas e assim permitir a visualização.

#### 4.2.13 Visualização dos lipossomas por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Amostras dos lipossomas preparados com BZ-3 a 7,0 mM foram feitas por coloração negativa pelo método da gota utilizando solução de fosfotungstato de potássio (PTK) a 2% como corante. O método utilizado está representado no esquema da FIGURA 22.

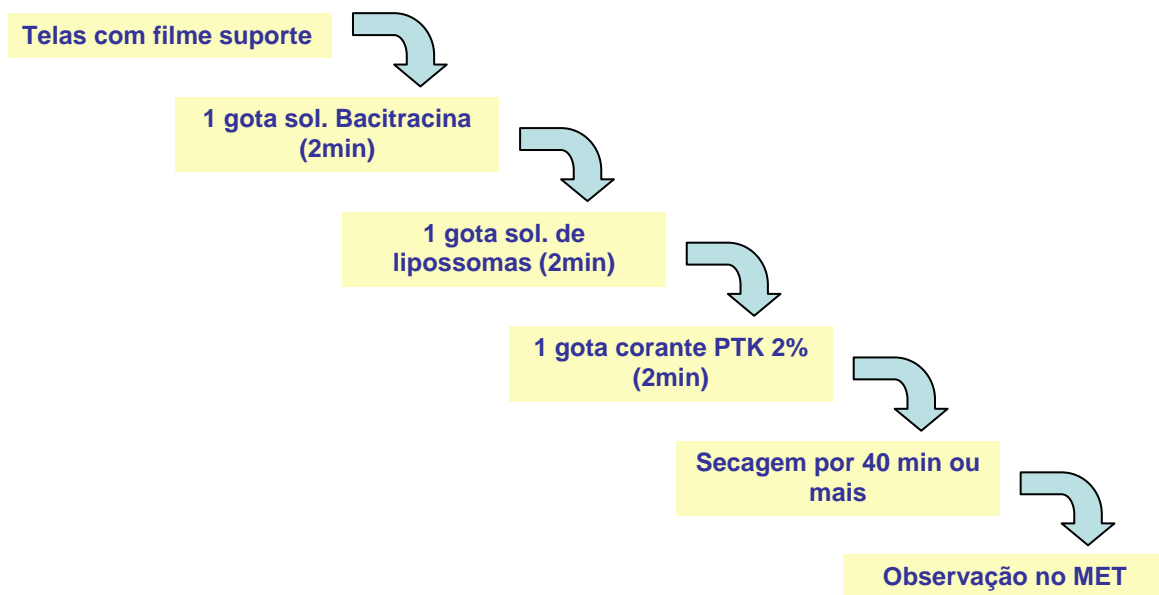


FIGURA 22: Preparo das amostras para MET.

#### **4.2.14 Determinação do tamanho dos lipossomas por espalhamento da luz laser**

Amostras dos lipossomas preparados com BZ-3 a 7,0 mM. Foram preparadas por diluição com água destilada para leitura no aparelho ZETASEIZER, o método de leitura utilizado foi o multimodal.

#### **4.2.15 Determinação do teor dos filtros recebidos como matérias-primas**

Para a formulação dos geles, a BZ-3 e o MCO foram doados pelo Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LADEG) da Faculdade de Farmácia - UFRJ. Antes de serem utilizados, foi necessário determinar seus teores, fazendo-se a diluição de cada filtro na concentração próxima ao ponto central da curva-padrão correspondente. As curvas-padrão utilizadas foram aquelas construídas a partir das amostras utilizadas como padrão de trabalho.

#### **4.2.16 Formulação do gel contendo os filtros não incorporados em lipossomas**

Para comparação dos resultados das análises do gel contendo os lipossomas, foi necessário preparar uma formulação contendo os filtros solares não inclusos, o mais próximo possível da formulação contendo os lipossomas. A formulação escolhida foi o gel de natrosol, por ser compatível com os lipossomas. A formulação preparada encontra-se na TABELA 2.

TABELA 2: Formulação em gel contendo os filtros solares BZ-3 e MCO livres.

	Componentes	Quantidade (g)
Fase A	Natrosol	1,0
	Metilparabeno	0,2
	Água destilada	q.s.p. --- 100
Fase B	<i>p</i> -metoxinamato de octila	8,0
	Benzofenona-3	5,0
	Eumulgin <sup>®</sup> VL 75 *	0,5 (gotejar)

\* Emulgin<sup>®</sup> VL 75: lauril glucósido, poligliceril 2-dipolihidroxiestearato e glicerina.

O metilparabeno foi dissolvido completamente na metade da quantidade de água previamente aquecida, adicionou-se o restante da água fria e a seguir o natrosol, sob agitação. Separadamente, foi preparada a fase B, solubilizando a BZ-3 no MCO com o auxílio de gotas de Eumulgin<sup>®</sup> VL75. A fase A foi vertida na fase B e mantida sob vigorosa agitação até formação da rede do polímero e homogeneização das fases.

#### 4.2.17 Desenvolvimento da formulação em gel contendo os filtros solares inclusos nos lipossomas

Para a formulação, os lipossomas contendo o MCO e os lipossomas com BZ-3 foram preparados utilizando uma concentração de 168mM de PC e com aumento proporcional da concentração dos filtros em relação aos fosfolipídios. Esse aumento na concentração dos fosfolipídios teve por objetivo aumentar a quantidade na

formulação de lipossomas com os filtros solares inclusos, diminuindo a necessidade da adição de filtros solares externos aos lipossomas.

Para atingir um FPS 20, foi formulado um gel de natrosol a 1% contendo 8% de MCO e 5% de BZ-3 (TABELA 3), onde parte desses filtros solares estavam inclusos no lipossomas.

TABELA 3: Formulação em gel contendo os filtros solares BZ-3 e MCO inclusos em lipossomas.

	Componentes	Quantidade
Fase A	Natrosol	1,0g
	Metilparabeno	0,2g
	Água destilada	q.s.p. --- 100g
Fase B	Suspensão lipossomal com MCO a 43,2 mM	40,0 mL
	Suspensão lipossomal com BZ-3 a 28 mM	40,0 mL
	<i>p</i> -metoxinamato de octila	7,5g
	Benzofenona-3	4,75g

O metilparabeno foi dissolvido completamente em 10 mL de água previamente aquecida, adicionou-se o restante da água fria e depois o natrosol, sob agitação. A fase B foi preparada adicionando o filtro solar não incluído em sua suspensão lipossomal correspondente e por fim misturando-se as suspensões. A fase A foi vertida na fase B e mantida sob vigorosa agitação até formação da rede do polímero e homogeneização das fases.



#### 4.2.18 Formulação do gel contendo os filtros não incorporados e com os fosfolipídios dispersos

Para comparação dos resultados principalmente nas análises *in vivo* do gel contendo os lipossomas, foi necessário preparar uma formulação contendo os filtros solares não inclusos e os fosfolipídios dispersos no meio. A formulação preparada encontra-se descrita na TABELA 4.

TABELA 4: Formulação em gel contendo os filtros solares BZ-3 e MCO livres e fosfolipídios dispersos.

	Componentes	Quantidade (g)
Fase A	Natrosol	1,0
	Metilparabeno	0,2
	Água destilada	q.s.p. --- 100
Fase B	Fosfatidilcolina	13,0
	Colesterol	2,0
	<i>p</i> -metoxinamato de octila	8,0
	Benzofenona-3	5,0

O metilparabeno foi dissolvido completamente na metade da quantidade de água previamente aquecida, adicionou-se o restante da água fria e a seguir o natrosol, sob agitação. Separadamente, foi preparada a fase B, solubilizando a BZ-3 no MCO e com a adição da fosfatidilcolina e do colesterol. A fase A foi vertida na fase B e mantida sob vigorosa agitação até formação da rede do polímero e homogeneização das fases.

#### 4.2.19 Determinação *in vitro* do FPS das formulações

O FPS das formulações preparadas foi medido pelo método de Mansur (MANSUR, 1986). É um método *in vitro* simples no qual a formulação foi diluída em etanol P.A. de forma a obter uma concentração de 0,2 mg/mL da formulação e não do ativo, condição esta estabelecida pelo autor de forma a criar uma correlação com o método *in vivo*. Através da fórmula matemática desenvolvida com valores de correção, é possível relacionar os valores de Abs. obtidos com o FPS da amostra (MANSUR *et al*, 1986; SANTOS *et al*, 1999; RIBEIRO *et al*, 2004).

$$\text{FPS} = \text{FC}_{10} \cdot \Sigma_{320}^{290} \cdot \text{EE}_{\lambda} \cdot I_{\lambda} \cdot \text{Abs} \quad (\text{conc} = 0,2\mu\text{L/mL ou } 0,2\text{mg/mL})$$

EQUAÇÃO 2: Cálculo do FPS segundo Mansur

#### 4.2.20 Determinação do FPS *in vivo* das formulações

As formulações tiveram seu FPS *in vivo* determinados usando o protocolo da FDA 99 DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – Sunscreen Drug Products for Over the Counter Human Use; Final Monograph; Final Rule; Subpart D Testing Procedure, section 352.70 a 352.72, May 21, 1999 (FDA, 1999).

Foi realizado ensaio clínico mono-cego, aleatorizado, com controle paralelo. Foram avaliados voluntários, do sexo feminino, de fototipos I, II e III, (TABELA 5) com idades de 18 a 60 anos.

TABELA 5: Avaliação do fototipo da pele através do histórico. Adaptado de FDA, 1999.

Fototipo	Histórico de resposta à exposição solar
I	Sempre queima facilmente, nunca bronzeia
II	Sempre queima facilmente, bronzeia ao mínimo
III	Queima moderadamente, bronzeia gradualmente

Foram critérios de exclusão: gravidez ou aleitamento; indivíduos com história anterior de reações fototóxicas ou fotoalérgicas; indivíduos em uso de medicamentos passíveis de produzir resposta cutânea anormal; presença de queimadura solar, bronzeado, tom de pele desigual, manchas, nevus, queratose seborréica ou excesso de pêlos no local do teste.

Os voluntários foram submetidos à entrevista (ANEXO A) e exame dermatológico (ANEXO B). Todos foram esclarecidos e orientados sobre os objetivos e métodos da pesquisa, receberam instruções (ANEXO C) e assinaram um termo de consentimento de participação (ANEXO D) elaborado segundo a declaração de Helsinque e aprovado por um comitê de Ética em Pesquisa (CNS, 1996).

Antes da fase de teste, a DME de cada voluntário foi determinada por uma seqüência de progressão geométrica de exposição à luz ultravioleta (DME / minuto), sendo cada uma graduada com um aumento aproximado de 25% acima do anterior. 24 horas após a irradiação, os locais de teste foram avaliados pelo eritema de acordo com a TABELA 6.

TABELA 6: Determinação da DME na pele. Adaptado de FDA, 1999.

Reação	Resultado
0 – ausente	negativo (-)
1 – eritema mínimo	duvidoso (+/-)
2 – eritema definido	positivo (+)
3 – eritema moderado	positivo (++)
4 – eritema intenso	positivo (+++)

Após a demarcação de áreas medindo 50 cm<sup>2</sup> no dorso (região infra-escapular), aplicou-se a preparação controle (octildimetil PABA 7,0% e BZ-3 3,0%) e a formulação a ser avaliada em áreas adjacentes, na quantidade de 0,1g (equivalente a 2mg/cm<sup>2</sup>), de maneira uniforme com o uso de dedeira. Após 15 minutos da aplicação, iniciou-se a irradiação. Os tempos de exposição foram calculados para cada área individualmente, baseados na DME previamente determinada da pele não protegida e no FPS estimado da formulação avaliada.

O FPS foi calculado pela razão entre o tempo necessário para produzir uma DME na pele protegida (com a formulação) e o tempo necessário para produzir uma DME na pele não protegida. Para cada um dos voluntários foi calculado o valor do FPS, para a amostra total dos voluntários foi calculado o FPS médio e o desvio padrão. Na tabela de distribuição de t de Student, verificou-se o valor de (t) com n-1 graus de liberdade e nível de probabilidade p = 0,05. O intervalo de confiança de 95% para o FPS médio baseado na distribuição t de Student foi calculado através da seguinte fórmula:

$$IC\ 95\% \text{ FPS médio} = x \pm A$$

EQUAÇÃO 3: Cálculo do intervalo de confiança de 95% para o FPS médio.

Onde,

x = valor médio do FPS

$$A = t \frac{s}{\sqrt{n}}$$

t = valor de t da tabela de distribuição bilateral t de Student com p = 0,05

s = desvio padrão

n = número de voluntários utilizados

#### **4.2.21 Determinação do FPS *in vivo* após imersão em água – “Resistência à água”**

Após a irradiação da radiação ultravioleta nos locais de ensaio, tanto para a formulação testada como para o controle, aplicou-se o produto novamente em área intacta, aguardou-se 15 minutos e cada voluntário entrou em banheira de hidromassagem, com água na temperatura entre 23 °C e 32 °C por um período inicial de 20 minutos de agitação moderada da água. A seguir, 20 minutos de repouso fora da banheira. Repetiu-se, a seguir o procedimento de agitação por mais 20 minutos. Os voluntários foram acompanhados durante a imersão para assegurar que as áreas de testes não fossem tocadas. Após totalizar 40 minutos em contato com a água, o voluntário foi seco com secador elétrico nas áreas de teste e com toalha macia nas demais áreas. Os locais de teste foram expostos à luz ultravioleta, utilizando-se o mesmo método aplicado antes da imersão.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS PADRÕES DE TRABALHO (BZ-3 E MCO)

Amostras de BZ-3 e MCO foram doadas pela empresa SPECTRUM, com os respectivos laudos de análise constando o teor de cada filtro solar. Como não existe padrão farmacopeico dos filtros solares, foi necessário comprovar a identidade e pureza permitindo o uso das amostras como padrões de trabalho. A seguir estão os testes executados para estas avaliações:

#### 5.1.1 Determinação do ponto de fusão (PF) da BZ-3

O ponto de fusão é característico para uma substância e variações no seu valor podem indicar a presença de impurezas e/ou degradação da amostra. A sua determinação foi realizada em triplicata e o resultado médio está apresentado na TABELA 7. A amostra apresentou uma faixa próxima daquela apresentada na literatura.

TABELA 7: Valores de Ponto de Fusão da BZ-3.

Ponto de Fusão	
Análise (n = 3) (°C)	Literatura* (°C)
64,4 ± 0,26 - 65,3 ± 0,36	62 - 64

\*(SHAAT, 1995)

### 5.1.2 Determinação do índice de refração do MCO

A refratometria é um método empregado para identificação de substâncias e detecção de impurezas. A lei da refração de Snell-Descartes relaciona os índices de refração de dois meios e foi empregada no refratômetro CARL ZEISS onde a amostra é colocada entre os prismas que o compõe. A alteração do ângulo de incidência dos raios de luz que passam pela amostra e pelos prismas é traduzida no índice de refração. Este valor é específico para cada substância. A TABELA 8 apresenta os resultados referentes ao índice de refração do MCO, média de três determinações. O valor encontrado para amostra ficou dentro da faixa indicada pela literatura.

TABELA 8: Valores de Índice de refração do MCO.

Índice de refração	
Análise (n = 3)	Literatura*
1,543 ± 0,001	1,542 - 1,548

\*(SHAAT, 1995)

### 5.1.3 Determinação dos parâmetros de absorção na região ultravioleta

O espectro de absorção na região do UV é muito rico para a avaliação dos filtros solares. É possível determinar diversos parâmetros que identifica a substância e a sua pureza. Na avaliação de cada espectro pôde-se determinar o  $\lambda$  máximo e a absorbância máxima, valores que contribuem para a identificação dos filtros utilizados. Também foi possível calcular o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ), valor indicativo do poder de absorção da radiação UV pela molécula. A TABELA 9

apresenta os parâmetros utilizados e os valores encontrados na análise da BZ-3 e do MCO. Os resultados obtidos estão em concordância com os valores da literatura.

TABELA 9: Parâmetros observados na análise por ultravioleta dos filtros solares.

	BZ-3	MCO
Teor	102,7%	100%
Solvente	Etanol P.A	Etanol P.A
Concentração	4,99 mg/L	8,22 mg/L
$\lambda$ máximo	287 nm	311 nm
$\lambda$ máximo literatura*	288 nm	311 nm
Abs. máx.	0,3095	0,7033
$\epsilon$	14460	24810
$\epsilon$ literatura*	14000	23300

\*(SHAAT, 1995)

#### 5.1.4 Espectro da BZ-3 e MCO na região do infravermelho

Os espectros de infravermelho são provocados pelos diferentes modos de interação da radiação eletromagnética com a molécula (vibração e rotação). Pode ser considerado como uma “impressão digital” do composto. Nas FIGURAS 23 e 24 apresentam-se os espectros na região do infravermelho obtidos com as amostras de BZ-3 e MCO, respectivamente. De cada espectro foram selecionadas as principais bandas de absorção e comparadas com os valores encontrados na literatura (TABELAS 10 e 11). Como visto, ambas amostras tiveram bandas de absorção com valores bem próximos aos seus padrões da literatura, sendo um indicativo da similaridade entre as estruturas químicas de cada amostra e seus respectivos padrões.



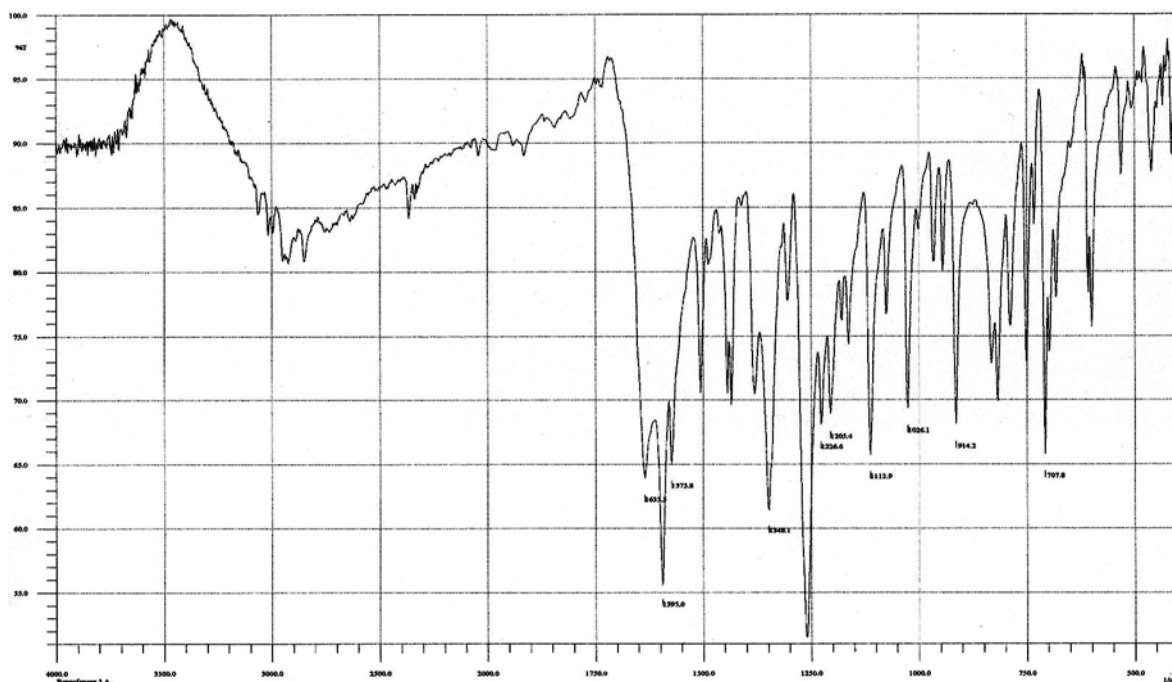


FIGURA 23: Espectro no infravermelho da BZ-3 (1% em KBr)

TABELA 10: Comparação das principais bandas de absorção do espectro infravermelho da BZ-3.

Principais bandas de absorção	
Amostra	Literatura (CTFA, 1990)
2950 $\text{cm}^{-1}$	2900 $\text{cm}^{-1}$
1636 $\text{cm}^{-1}$	1650 $\text{cm}^{-1}$
1595 $\text{cm}^{-1}$	1600 $\text{cm}^{-1}$
1260 $\text{cm}^{-1}$	1270 $\text{cm}^{-1}$

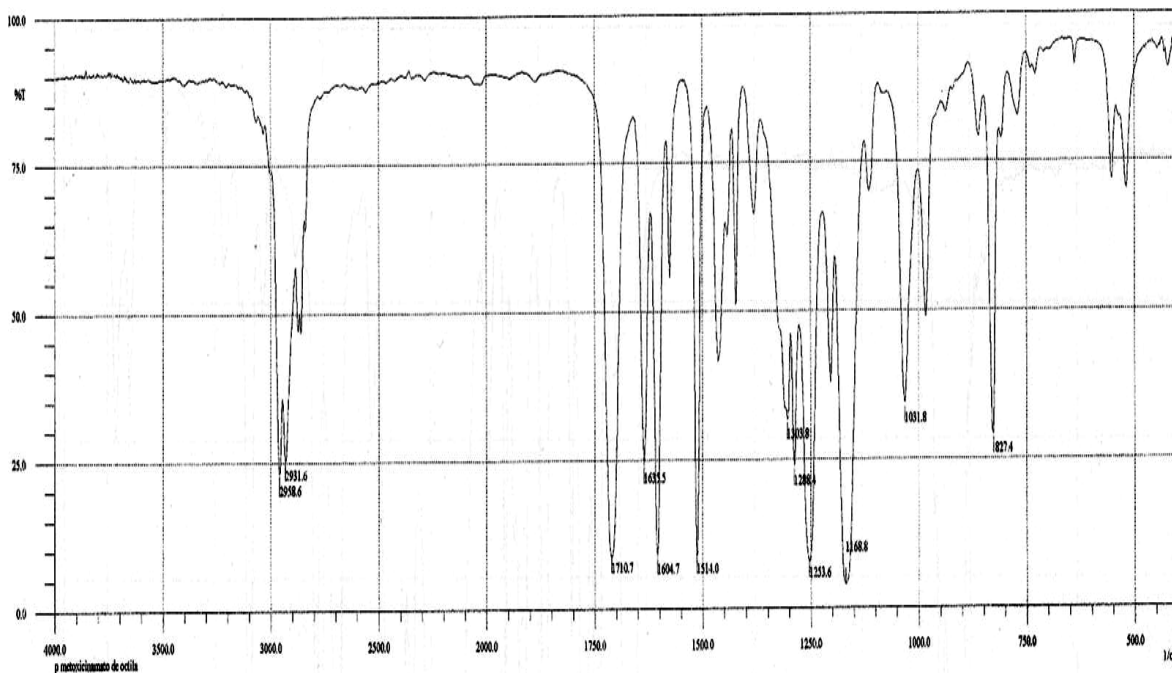


FIGURA 24: Espectro no infravermelho do MCO (filme entre cristais de NaCl).

TABELA 11: Comparação das principais bandas de absorção do espectro infravermelho do MCO.

Principais bandas de absorção	
Amostra	Literatura (BP, 2004)
1710 cm <sup>-1</sup>	1700 cm <sup>-1</sup>
1604 cm <sup>-1</sup>	1610 cm <sup>-1</sup>
1254 cm <sup>-1</sup>	1200 cm <sup>-1</sup>

A dificuldade em se obter padrões farmacopeicos e a pouca literatura existente indicando especificações para as características físico-químicas dos filtros solares dificulta sua padronização. Contudo, a realização dos testes descritos e a análise dos resultados permitiram a utilização dos filtros doados como padrões de trabalho nas etapas seguintes.

## 5.2 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE RINGBOM PARA A BZ-3

A determinação da curva de Ringbom para uma substância permite observar a faixa total de concentração que possui uma resposta linear a absorvância. Como não foi encontrada tal curva na literatura para a BZ-3, mostrou-se necessária a sua construção. A faixa lida foi de 0,4 a 50 µg/mL. O uso de concentrações menores que 0,4 µg/mL não era indicado pelo fabricante do aparelho espectrofotômetro e concentrações acima de 60 µg/mL causaram distorções na leitura ocorrendo o “estouro” dos picos de absorvância. Para a construção da curva de Ringbom (FIGURA 25) os valores de absorvância foram utilizados para o cálculo dos percentuais de transmitância (%T) pela relação:  $\%T = 1/10^{Abs} \times 100$ , também foram calculados os logaritmos de cada concentração(logC). Os valores estão apresentados na TABELA 12.

TABELA 12: Valores utilizados para a construção da curva de Ringbom.

Concentração (µg/mL)	Absorvância	LogC	% T
0,4	0,0313	-0,3979	93,0
0,8	0,0587	-0,0969	87,4
2,0	0,1391	0,3010	72,59
4,0	0,2744	0,6021	53,16
6,0	0,4086	0,7782	39,03
8,0	0,5450	0,9031	28,51
10,0	0,6803	1,000	20,88
20,0	1,3482	1,3010	4,4854
30,0	2,0271	1,4771	0,93951
40,0	2,6983	1,6021	0,20031
50,0	3,4557	1,6990	0,035019

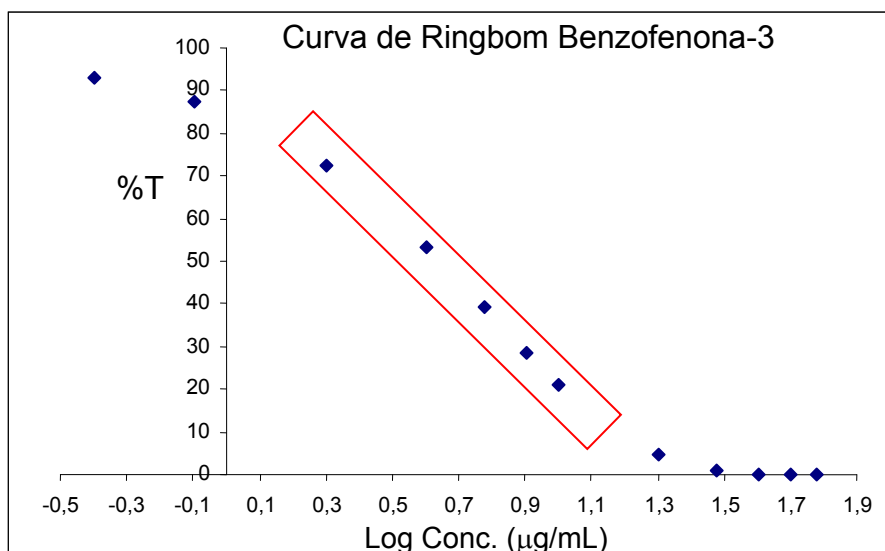


FIGURA 25: Curva de Ringbom para a BZ-3, eixo X: Log das concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) e eixo Y: % de transmitância.

O retângulo na FIGURA 25 indica a região onde se observa a linearidade, correspondendo ao intervalo de 2,0 a 10  $\mu\text{g/mL}$ . Desta forma, escolheu-se trabalhar com os cinco pontos a seguir: 2,0  $\mu\text{g/mL}$ , 4,0  $\mu\text{g/mL}$ , 6,0  $\mu\text{g/mL}$ , 8,0  $\mu\text{g/mL}$  e 10,0  $\mu\text{g/mL}$ , que foram utilizadas para a construção da curva-padrão da BZ-3.

### 5.3 CONSTRUÇÃO DA CURVA-PADRÃO E DETERMINAÇÃO DA EQUAÇÃO DA RETA PARA A BZ-3

Para a análise do teor de BZ-3 presente nos lipossomas e nas formulações preparadas, foi construída uma curva-padrão em triplicata de pesadas para cada ponto e calculada a equação da reta (FIGURA 26). A utilização de soluções da BZ-3 nas concentrações estabelecidas pela curva de Ringbom permitiu a obtenção de uma curva com ótima linearidade possuindo um coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,9998. O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,9996 demonstra uma relação linear

para as concentrações escolhidas e que a proposta feita foi verificada com 99,96% de confiança (NETO *et al.*, 2002).

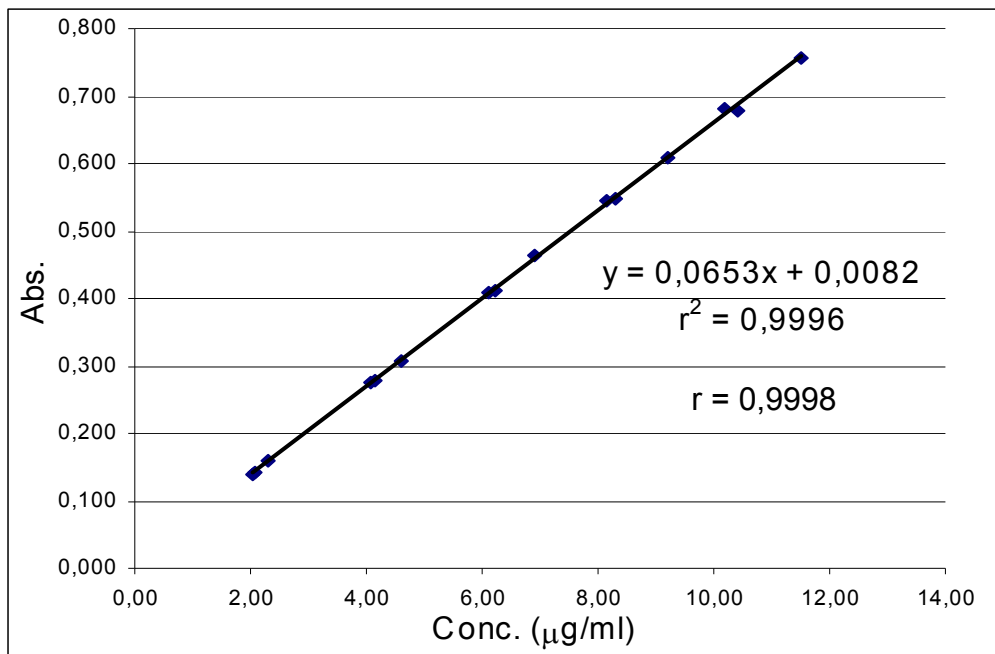


FIGURA 26: Curva-padrão da BZ-3. Eixo X: concentração de BZ-3 em µg/mL; eixo Y: Absorbância.

#### 5.4 CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO E DETERMINAÇÃO DA EQUAÇÃO DA RETA PARA O MCO

Para a construção da curva-padrão do MCO foram utilizadas as concentrações determinadas pela curva de Ringbom do MCO em um estudo anterior (GARCIA, 1998). As concentrações foram: 2,0 µg/mL, 4,0 µg/mL, 6,0 µg/mL, 8,0 µg/mL e 10,0 µg/mL. Com estes valores foram construídas três curvas-padrão e delas resultou a curva-padrão média (FIGURA 27) da qual foi calculada a equação da reta. O coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,9995 indica uma ótima linearidade. O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,9989 demonstra uma relação linear para as

concentrações escolhidas e que a proposta feita foi verificada com 99,89% de confiança (NETO *et al.*, 2002).

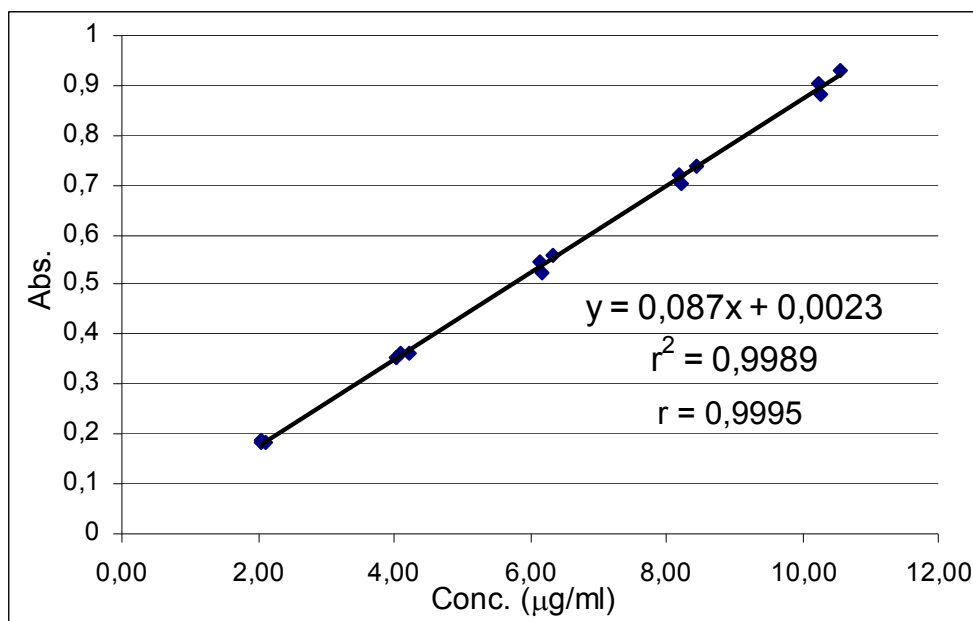


FIGURA 27: curva-padrão média do MCO. Eixo X: concentração de MCO em µg/mL; eixo Y: Absorbância.

## 5.5 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE BZ-3 E MCO (MATÉRIAS-PRIMAS)

Para o preparo das formulações fotoprotetoras, foi necessária a utilização de grandes quantidades de filtros solares. As amostras doadas pela *Spectrum* que foram padronizadas não eram suficientes. O LADEG – UFRJ forneceu amostras de BZ-3 e MCO para o preparo das formulações. Como tais amostras não possuíam teor declarado, a determinação foi realizada baseando-se nas curvas-padrão já determinadas. As análises foram realizadas em triplicata, os filtros tiveram teor próximo a 100% (TABELA 13), permitindo a utilização como matérias-primas no preparo das formulações.

TABELA 13: Valores de teor das amostras de BZ-3 e MCO recebidas como matérias-primas para as formulações.

	BZ-3	MCO
Teor	100,1% ± 3,7	96,8% ± 1,8

## 5.6 RELAÇÃO DOS TEORES DE BZ-3 E DE FOSFOLIPÍDIOS NOS LIPOSSOMAS COM AS QUANTIDADES INICIAIS

Os lipossomas do tipo VML possuem a capacidade de incorporação de substâncias lipofílicas entre 5 e 20% em relação ao total de lipídios (NEW, 1997). O primeiro passo foi descobrir a proporção de BZ-3 e fosfolipídios que permitisse o maior percentual de inclusão do filtro solar. Assim sendo, os primeiros lipossomas preparados possuíam 8,1mM de BZ-3. Após a retirada do material não encapsulado, ocorreu uma queda em torno de 42% do total de filtro adicionado e uma queda de 15% dos fosfolipídios que indica uma perda do material de formação das lamelas dos lipossomas ou uma diluição do material recolhido da coluna (TABELA 14). A partir daí, optou-se pelo preparo dos lipossomas com duas concentrações de BZ-3: 5,4mM e 10,8mM. Analisando os lipossomas com 10,8mM de BZ-3, a queda da quantidade de BZ-3 inicial ficou em torno de 62% e de fosfolipídios 13%. Os resultados para a concentração de 5,4mM de BZ-3 apontaram uma queda menor de BZ-3 em torno de 30% e uma queda de 54% dos fosfolipídios. Estes resultados indicaram que a quantidade ideal de BZ-3 a ser incorporada nos lipossomas estava entre 5,4mM e 8,1mM. Assim sendo, foi preparado um lipossoma com 7,0mM de BZ-3. Os resultados para esta preparação indicaram uma queda de 45% na quantidade

de BZ-3 e sem alterações na quantidade de fosfolipídios. Comparando os lipossomas produzidos com 5,4; 7,0 e 8,1mM, os lipossomas com 5,4mM de BZ-3 tiveram o maior percentual final de filtro em torno de 70% encapsulado, porém transformando o percentual em mg de BZ-3, obtém-se uma quantidade menor de filtro presente que a encontrada para os lipossomas preparados com 7,0mM e com 8,1mM de BZ-3.

TABELA 14: Valores de teor de BZ-3 e fosfolipídios nos lipossomas preparados com 48 h de hidratação do filme lipídico.

Ensaio	Frações separadas	BZ-3 5,4mM (%) (n = 3)	BZ-3 7,0mM (%) (n = 3)	BZ-3 8,1mM (%) (n = 3)	BZ-3 10,8mM (%) (n = 3)
Teor de filtro	Sem filtrar	100 ± 2,7	86,6 ± 2,8	88,7 ± 9,1	97,2 ± 5,1
	Após membrana de 0,2 µm	86,2 ± 0,6	69,5 ± 0,7	61,7 ± 1,4	60,8 ± 1,9
	Após coluna G-50	71,5 ± 0,7	55,7 ± 2,4	57,8 ± 0,9	37,6 ± 2,0
Teor de fosfolipídio	Sem filtrar	87,2 ± 11,7	110 ± 8,7	103 ± 7,1	102 ± 7,2
	Após membrana de 0,2 µm	73,9 ± 10,7	108 ± 10,2	*	100 ± 9,4
	Após coluna G-50	56,1 ± 4,4	103 ± 5,1	86,6 ± 2,9	87,2 ± 3,2

\*Houve perda das amostras durante a análise.

Após obtenção dos resultados, verificou-se que os lipossomas preparados com 8,1mM de BZ-3 apresentaram os melhores resultados seguidos pelos preparados com 7,0mM de BZ-3. Porém, em ambos ocorreram quedas substanciais da quantidade de BZ-3 inicial em torno de 30% em relação a fração sem filtrar. Tal perda poderia inviabilizar a aplicação de lipossomas contendo a BZ-3 em novas



formulações. A decisão sobre qual seria a melhor concentração da BZ-3 ocorreu na relação entre tempo de hidratação do filme lipídico e quantidade de BZ-3 encapsulada.

Quanto aos métodos, a determinação do teor de BZ-3 nas diferentes frações por espectrofotometria no UV e utilizando a curva-padrão preparada, foi rápido, de fácil realização e apresentou boa reprodutibilidade. O método de Bartlett para determinação dos fosfolipídios foi muito mais complexo e susceptível a contaminações. Cada ensaio necessitou do preparo de uma curva-padrão e de 3 amostras em branco para minimizar as variações das condições do ensaio. Além disso, cada fração foi analisada em triplicata. Todas estas precauções tinham o objetivo de tornar os resultados obtidos mais precisos e exatos.

## 5.7 RELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE HIDRATAÇÃO E A QUANTIDADE DE BZ-3 ENCAPSULADA

No preparo dos lipossomas pelo método de hidratação do filme fosfolipídico, a etapa de hidratação onde ocorre a formação das vesículas é a etapa limitante do processo que definirá a incorporação da BZ-3. Não foi descrita até o momento uma comparação que indique qual a melhor maneira de realizar essa hidratação. No presente estudo, a hidratação por 48 horas a 4 °C foi utilizada seguindo estudo anterior de incorporação do MCO em lipossomas (GARCIA, 1998). Foi testado então o aumento do tempo de hidratação passando para 96 horas a 4 °C. Foram preparados lipossomas com 7,0mM e 8,1mM de BZ-3, concentrações nas quais com 48h de hidratação do filme lipídico, se observou uma perda da BZ-3 já na fração sem

filtração. Os resultados indicaram um aumento significativo do percentual de filtro encapsulado nos lipossomas preparados com 7,0mM de BZ-3, enquanto os resultados para 8,1mM se mantiveram (TABELA 15). A perda da quantidade inicial de BZ-3 passou para 10%, após passagem pela coluna e com uma perda de 15% dos fosfolipídios. A preparação dos lipossomas com 7,0mM de BZ-3 foi realizada em triplicata e para cada uma delas os ensaios foram realizados em triplicata.

O aumento do tempo de hidratação pode ter permitido uma formação de um maior número de vesículas, com liberação de todo filme fosfolipídico aderido no balão.

TABELA 15: Comparação entre os valores de teor de BZ-3 e fosfolipídios nos lipossomas preparados com 48h e 96h de hidratação do filme lipídico.

Ensaio	Frações separadas	BZ-3 7,0mM 48h (n = 3)	BZ-3 7,0mM 96h (n = 9)	BZ-3 8,1mM 48h (n = 3)	BZ-3 8,1mM 96h (n = 3)
Teor de filtro	Sem filtrar	86,6% ± 2,8	103% ± 5,2	88,7% ± 9,1	99,0% ± 0,7
	Após membrana de 0,2 µm	69,5% ± 0,7	95,2% ± 4,8	61,7% ± 1,4	61,3% ± 0,7
	Após coluna G-50	55,7% ± 2,4	91,6% ± 4,4	57,8% ± 0,9	54,7% ± 0,7
Teor de fosfolipídio	Sem filtrar	110% ± 8,7	89,2% ± 0,9	103% ± 7,1	109% ± 10,7
	Após membrana de 0,2 µm	108% ± 10,2	80,3% ± 0,3	*	83,9% ± 10,2
	Após coluna G-50	103% ± 5,1	74,4% ± 3,8	86,6% ± 2,9	77,5% ± 0,7

\*Houve perda das amostras durante a análise.

## 5.8 RELAÇÃO ENTRE O MÉTODO DE PREPARO DOS LIPOSSOMAS E A QUANTIDADE DE BZ-3 ENCAPSULADA

O método do pré-lipossoma se mostra inferior ao de hidratação do filme lipídico quando se trabalha com uma substância sólida lipofílica (HENRIQUES, 2005). Para confirmar se isto se aplica também a BZ-3, foi realizada a comparação dos dois métodos para a incorporação da BZ-3. Os resultados obtidos (TABELA 16) confirmaram a indicação de que substâncias sólidas lipofílicas, no caso a BZ-3, possuem uma encapsulação superior com o método de hidratação do filme fosfolipídico do que com o método de pré-lipossoma.

TABELA 16: Comparação entre os valores de teor de BZ-3 e fosfolipídios nos lipossomas obtidos pelo método de hidratação do filme lipídico e pelo método do pré-lipossoma.

Ensaio	Frações separadas	BZ-3 7,0mM hidratação do filme lipídico (n = 9) (%)	BZ-3 7,0mM pré-lipossoma (n = 3) (%)
Teor de filtro	Sem filtrar	103 ± 5,2	75,2 ± 5,5
	Após membrana de 0,2 µm	95,2 ± 4,8	72,5 ± 1,7
	Após coluna G-50	91,6 ± 4,4	65,0 ± 1,3
Teor de fosfolipídios	Sem filtrar	89,2 ± 0,9	94,4 ± 2,6
	Após membrana de 0,2 µm	80,3 ± 0,3	89,3 ± 3,5
	Após coluna G-50	74,4 ± 3,8	77,1 ± 0,6

## 5.9 VISUALIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA

As diferentes frações de lipossomas preparados com a BZ-3 a 7,0mM com 96h de hidratação foram observadas no microscópio óptico.

A fração sem filtrar confirmou a formação e apresentou vesículas de tamanhos variados e de fácil identificação, o que era esperado já que nesta fração as vesículas ainda não passaram por processos de normalização de tamanho. Foi evidente que as vesículas tendem a se agrupar formando grandes aglomerados e possuem uma grande mobilidade na lâmina dificultando a visualização da forma. Nas frações após membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  e após coluna G-50, ocorreu um aumento da população de vesículas que passaram a apresentar um tamanho mais uniforme e muito menor comparando-se à fração sem filtrar. A diminuição do tamanho dos lipossomas dificultou muito a visualização pelo microscópio óptico mesmo em seu maior aumento (1000x com óleo de imersão), além disso os lipossomas passaram a se movimentar intensamente tornando-se difícil a fixação na lâmina e a focalização das imagens.

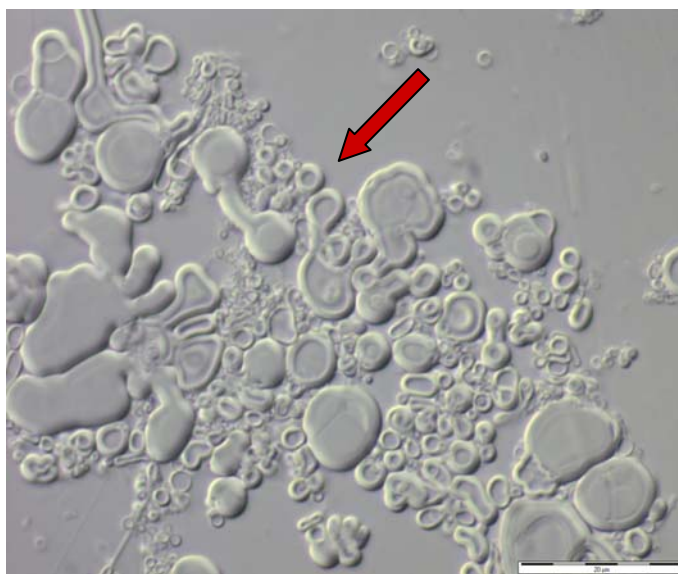


FIGURA 28: Foto microscopia óptica dos lipossomas com BZ-3 a 7,0mM - fração sem filtrar. Aumento 1000x, óleo de imersão, seta vermelha indica as vesículas.



FIGURA 29: Foto microscopia óptica dos lipossomas com BZ-3 a 7,0mM - fração após membrana de 0,2  $\mu\text{m}$ . Aumento 1000x, óleo de imersão, setas vermelhas indicam as vesículas.



FIGURA 30: Foto microscopia óptica dos lipossomas com BZ-3 a 7,0mM - fração após coluna G-50. Aumento 1000x, óleo de imersão, setas vermelhas indicam as vesículas.

## 5.10 VISUALIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Comparada à microscopia óptica, a MET permite aumentos muito maiores e uma fixação superior do material. Essas características tornam a MET ideal para a visualização dos lipossomas nas frações após normalização dos tamanhos e passagem pela coluna G-50. O processo de preparo da amostra, pelo método da gota e coloração negativa usando solução de fosfotungstato de potássio (PTK) a 2% (p/v), foi rápido e de fácil realização. O principal problema encontrado foi a baixa fixação das vesículas na tela de suporte e uma aglomeração das vesículas nas bordas da tela, possivelmente devido a tensão superficial da gota em cima da tela. As imagens demonstraram vesículas levemente deformadas possivelmente devido ao processo de preparo da amostra. Os aumentos maiores propiciaram imagens que demonstram nitidamente as vesículas formadas e uma regularidade nos seus tamanhos.

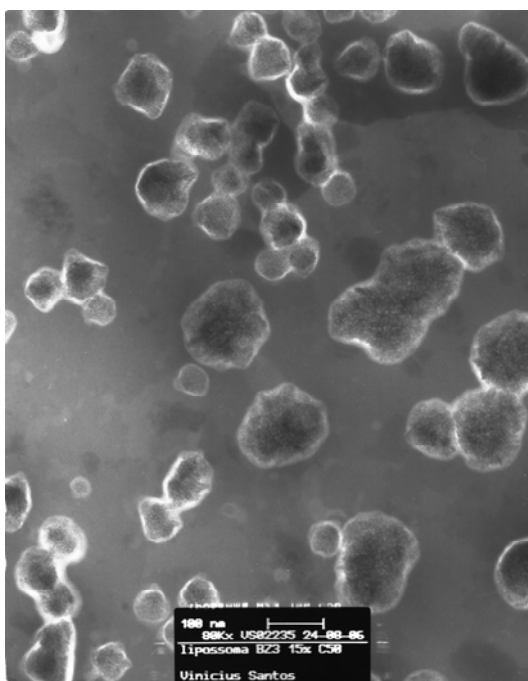


FIGURA 31: Micrografia eletrônica dos lipossomas com BZ-3 a 7,0mM - fração após coluna G-50. (Aumento 80000x)

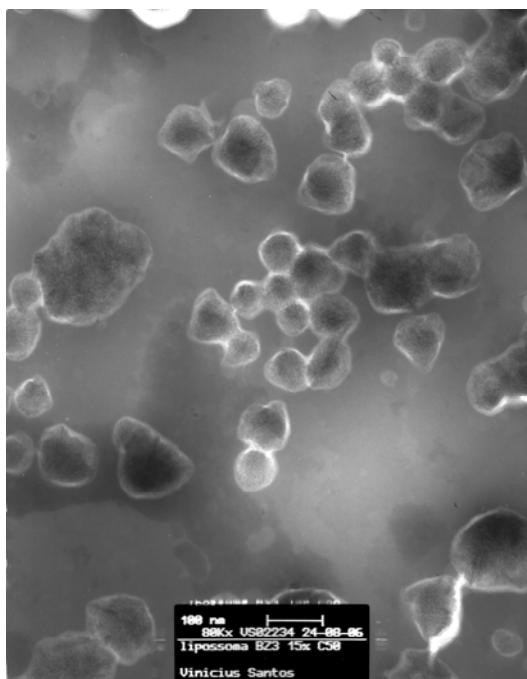


FIGURA 32: Micrografia eletrônica dos lipossomas com BZ-3 a 7,0mM - fração após coluna G-50. (Aumento: 80000x)

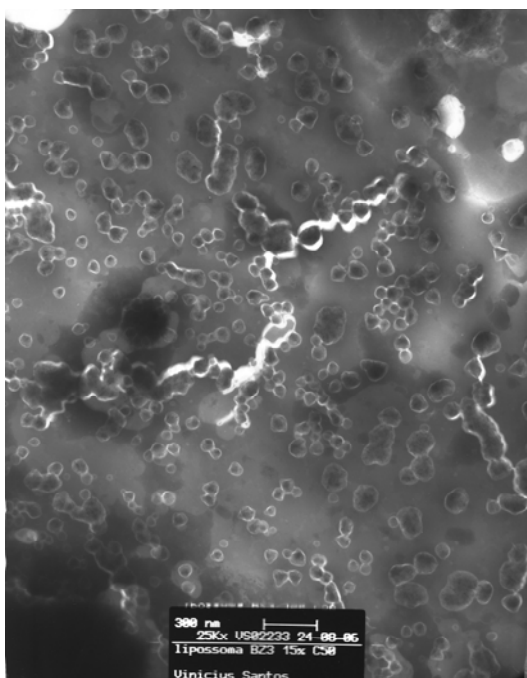


FIGURA 33: Micrografia eletrônica dos lipossomas com BZ-3 a 7,0mM - fração após coluna G-50. (Aumento 25000x)

## 5.11 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DOS LIPOSSOMAS POR ESPALHAMENTO DA LUZ LASER

Os lipossomas preparados com a BZ-3 a 7,0mM e os preparados com MCO a 10,8mM tiveram seus tamanhos determinados utilizando espalhamento da luz laser.

Avaliando os resultados para os lipossomas com a BZ-3 a 7,0mM (FIGURAS 34, 35 e 36), a fração sem filtrar demonstrou partículas com tamanho variando de 3512nm até 22807nm, 69,4% da população com  $6178,4\text{nm} \pm 2667,5$  e 30,6% com  $18390,7\text{nm} \pm 4198,2$ . Para a fração após filtração por membrana de  $0,2\ \mu\text{m}$  a variação de diâmetro ficou entre 165 nm e 1070 nm, bem abaixo da encontrada antes da filtração, 61,5% da população teve  $237,2\text{nm} \pm 116,8$  e 29,2% ficou com  $447,2\text{nm} \pm 157,2$ . Estes valores indicam um bom processo de filtração e colocam as vesículas dentro da faixa ideal de tamanho para lipossomas do tipo VML. Na fração após coluna G-50, a variação de diâmetro ficou entre 149 nm e 942 nm. Cerca de 100% da população ficou com  $367,5\text{nm} \pm 374,7$  indicando que a passagem das vesículas pela coluna de Sephadex<sup>®</sup> G-50 contribui para a normalização do tamanho e não altera de maneira indesejável os lipossomas.



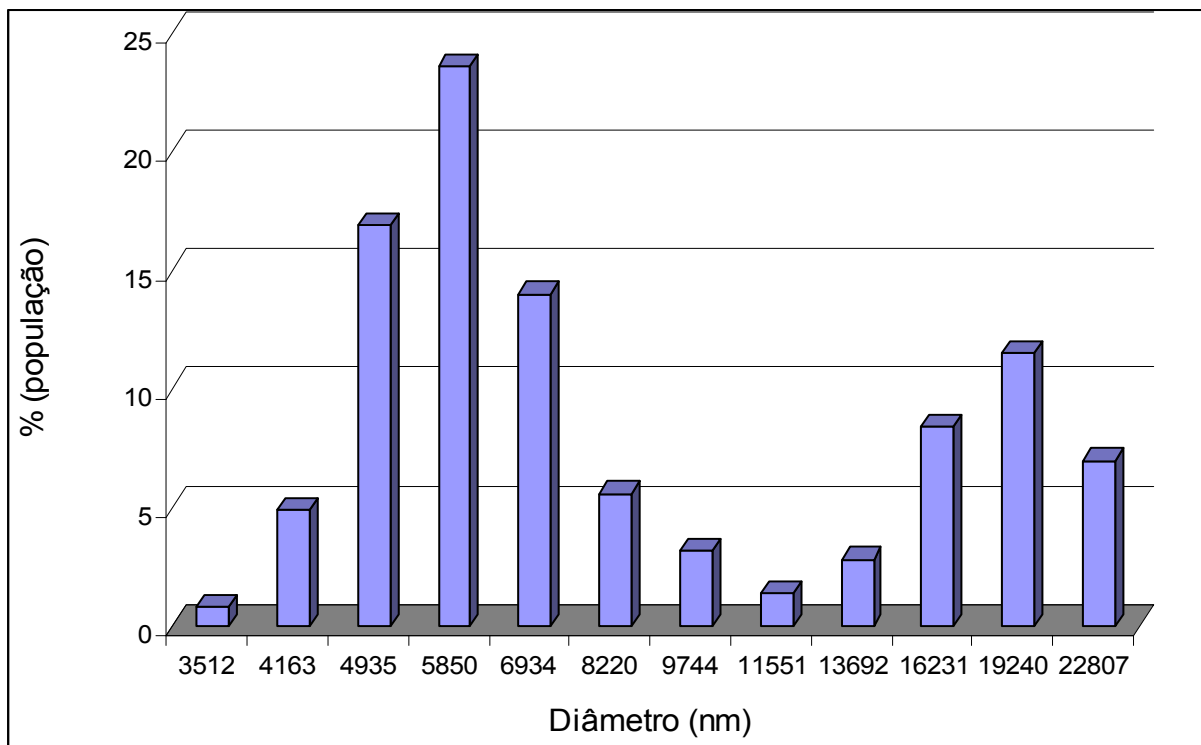


FIGURA 34: Tamanho das partículas nos lipossomas com BZ-3 a 7,0mM - fração sem filtrar.

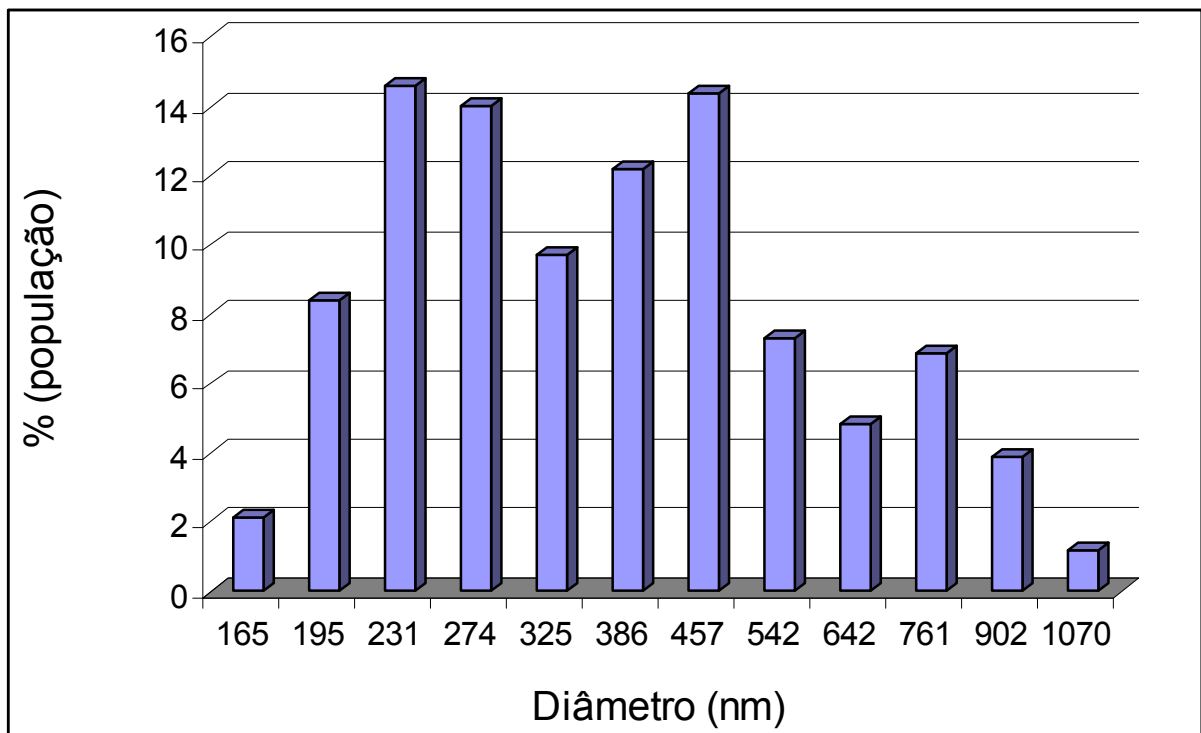


FIGURA 35: Tamanho das partículas nos lipossomas com BZ-3 a 7,0mM - fração após filtrar em membrana de 0,2 µm.

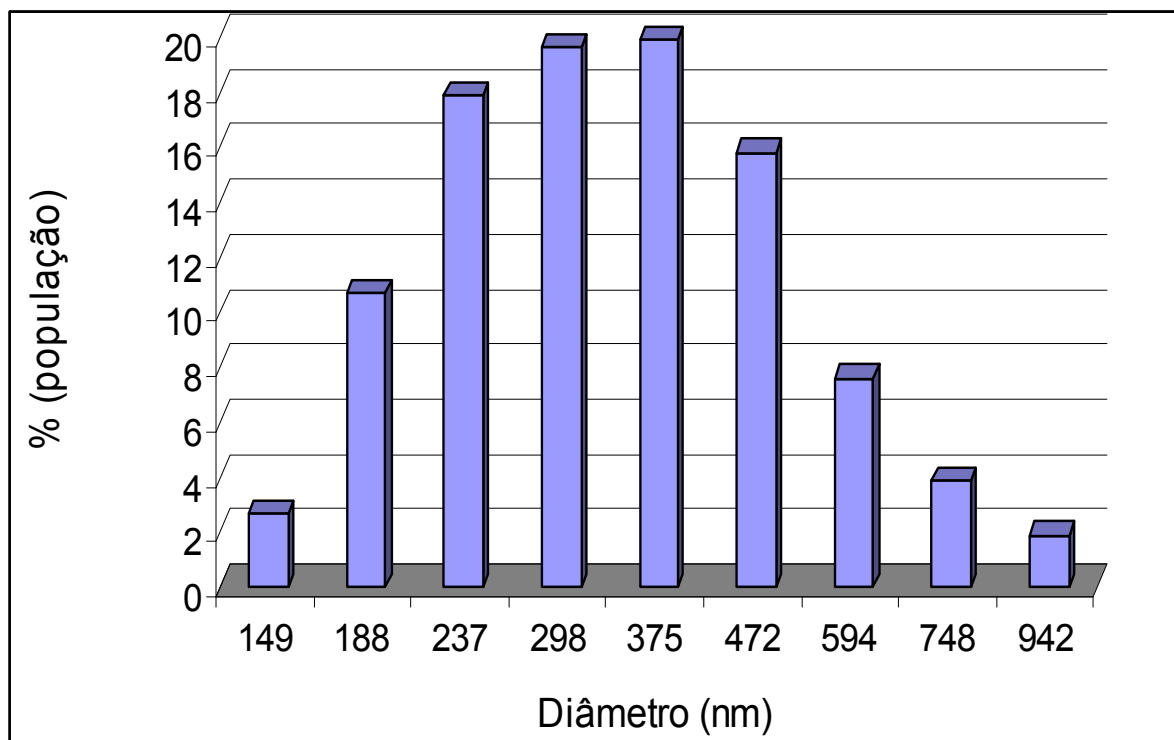


FIGURA 36: Tamanho das partículas nos lipossomas com BZ-3 a 7,0mM - fração após coluna Sephadex® G-50

Para os lipossomas preparados com MCO a 10,8mM (FIGURAS 37, 38 e 39), a fração sem filtrar apresentou vesículas com diâmetro variando de 112 nm a 1124 nm, 67,2% da população teve um diâmetro de  $183,8\text{nm} \pm 114,7$ ; um valor bem abaixo do encontrado para os lipossomas preparados com a BZ-3. Como os lipossomas com BZ-3 foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico e os lipossomas contendo MCO foram preparados pelo método do pré-lipossoma, talvez haja uma relação entre o método de preparo e o tamanho dos lipossomas obtidos. O tamanho menor dos lipossomas formados pelo método do pré-lipossoma poderia ainda explicar o motivo pelo qual a BZ-3 que é sólida teve uma encapsulação menor neste método comparado ao de hidratação do filme lipídico. Novas pesquisas devem ser realizadas para elucidar esta relação. Na fração após filtração pela membrana de  $0,2 \mu\text{m}$ , o diâmetro variou de 146 nm a 799 nm e 64,7% apresentou diâmetro de  $226,5\text{nm} \pm 111,4$ ; indicando que o processo de filtração foi

eficaz, porém não houve uma alteração muito grande comparando-se a fração sem filtrar, pois os lipossomas já estavam com diâmetro bem reduzido. Na fração após coluna, o diâmetro variou entre 146 nm e 802 nm, quase idêntico ao encontrado para a fração após membrana, indicando que a passagem dos lipossomas pela coluna não causa alterações indesejáveis no formato das vesículas, 49,1% da população apresentou diâmetro de  $222,2\text{nm} \pm 76,6$  e 50,9% teve  $426,7\text{nm} \pm 200,9$ ; demonstrando que a grande maioria da população estava com diâmetro na faixa esperada.

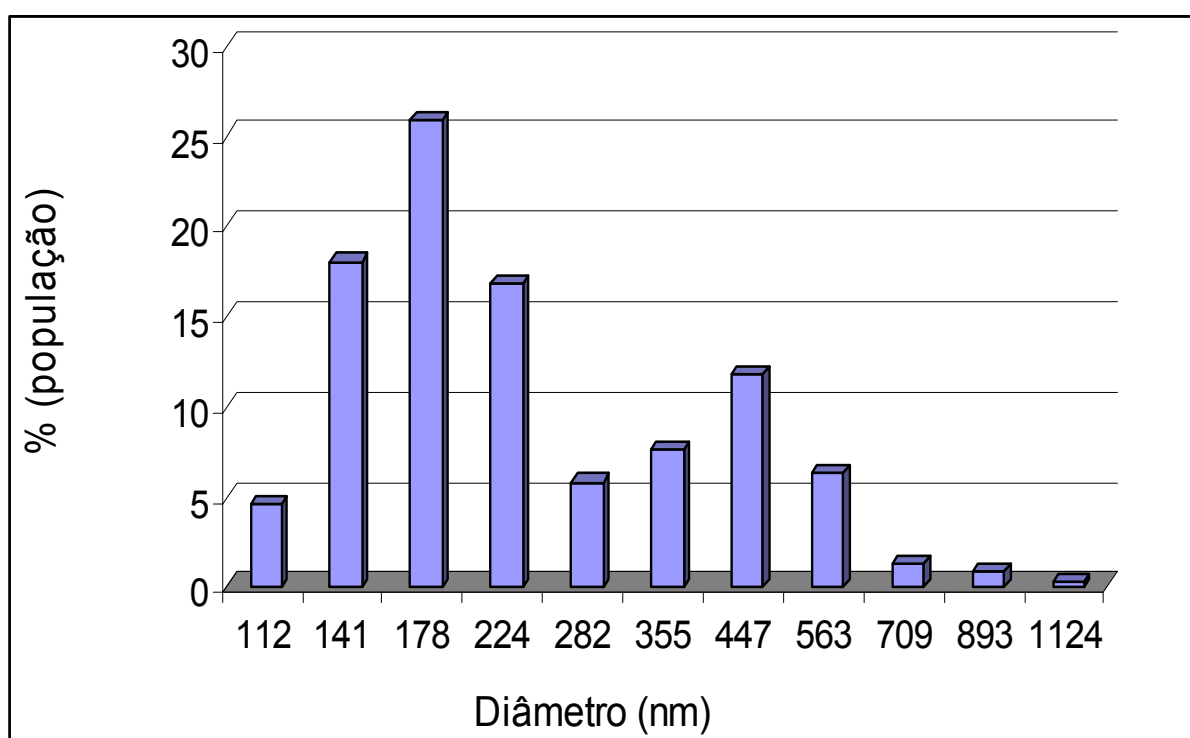


FIGURA 37: Tamanho das partículas nos lipossomas com MCO a 10,8mM - fração sem filtrar.

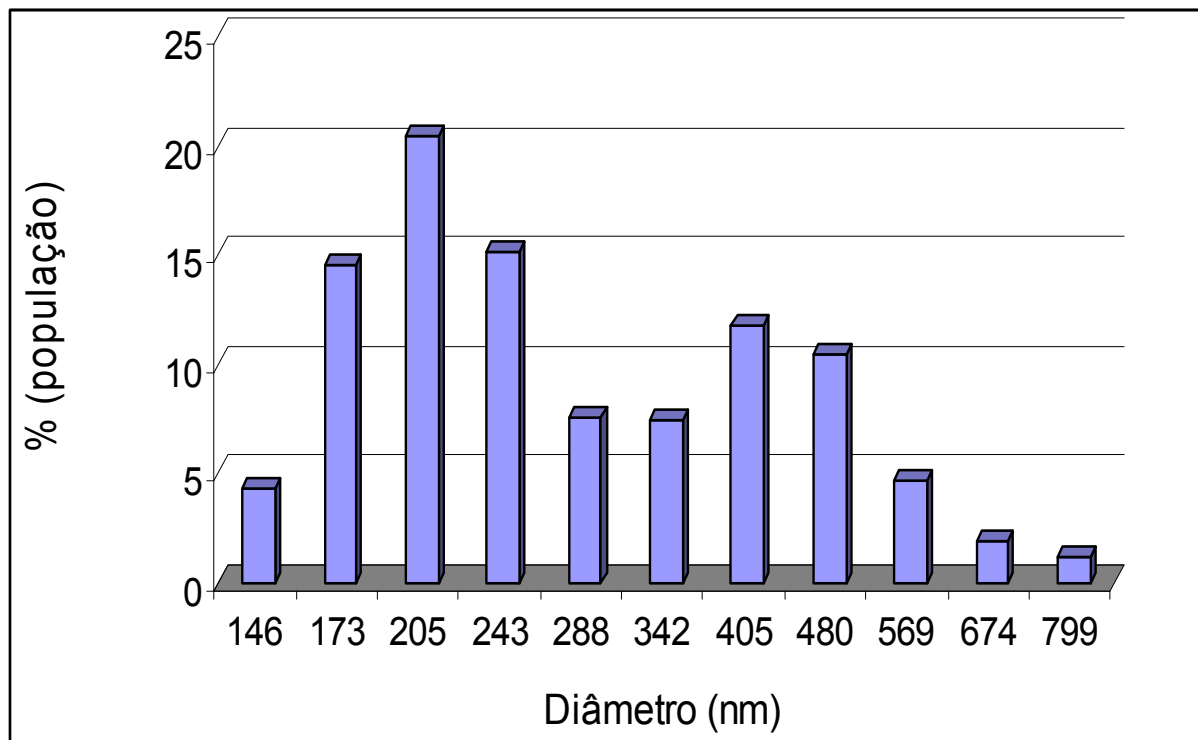


FIGURA 38: Tamanho das partículas nos lipossomas com MCO a 10,8mM - fração após filtrar em membrana de 0,2 μm.

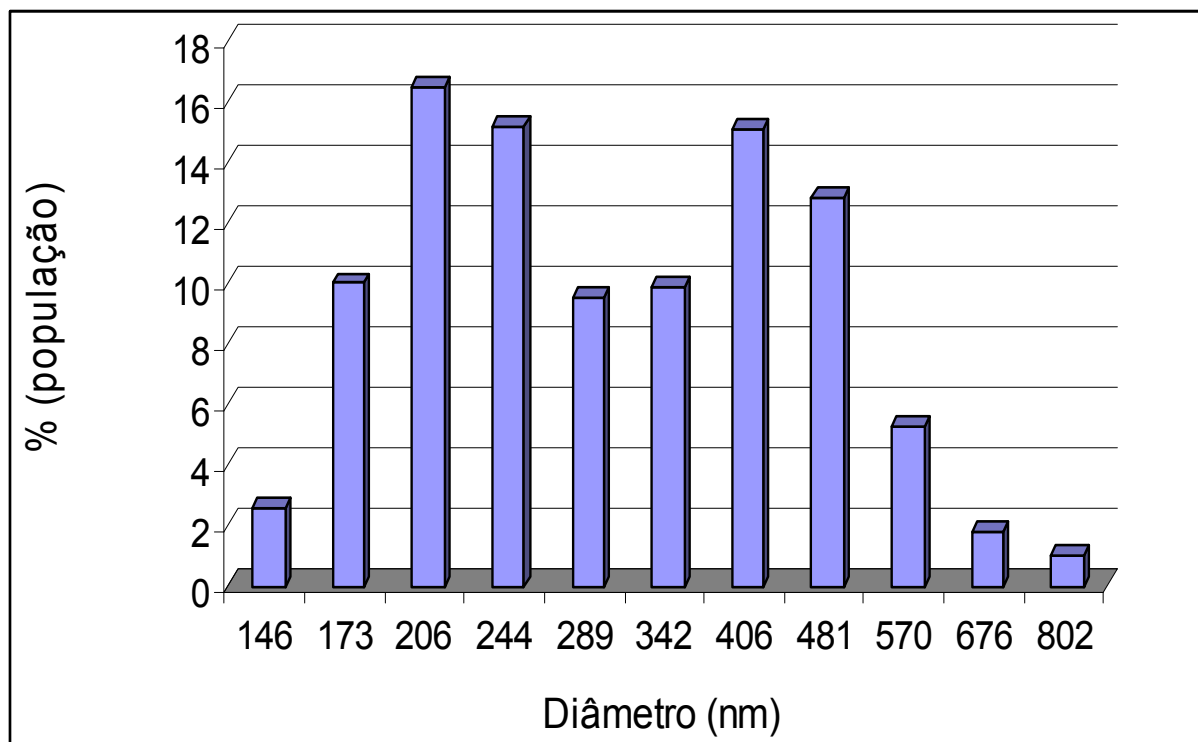


FIGURA 39: Tamanho das partículas nos lipossomas com MCO a 10,8mM - fração após coluna Sephadex® G-50.

## 5.12 AVALIAÇÃO DAS FORMULAÇÕES PREPARADAS

A escolha de uma formulação em gel para incorporação dos lipossomas não foi ao acaso. A trama tridimensional do gel permite uma dispersão melhor dos lipossomas evitando aglomerações. A escolha de um gel aquoso permite equilibrar a constituição óleo : água, tendo uma formulação com menor capacidade oclusiva da pele e melhor espalhamento (ANSEL, 1999). Por não utilizar lipídios além dos fornecidos pelos lipossomas, não haveria interferências causadas por interação dos lipossomas com outros componentes lipídicos. A escolha da hidroxietilcelulose (natrosol) como polímero espessante, permitiu obter um gel não iônico incapaz de interagir com os lipossomas. Durante 3 meses após o preparo, todas as formulações se demonstraram visualmente estáveis.

## 5.13 DETERMINAÇÃO DO FPS *in vitro* DAS FORMULAÇÕES

O FPS *in vitro* das formulações foi determinado pelo método de Mansur. Este método se mostrou rápido, de fácil execução e apresentou resultados com pequeno desvio padrão. Foi realizado um acompanhamento do FPS *in vitro* durante 3 meses (TABELA 17) para avaliar se ocorria alguma variação no FPS que pudesse ser relacionada com a estabilidade, principalmente relacionada ao MCO por ser muito lábil.

TABELA 17: Valores de FPS *in vitro* das três formulações em gel preparadas.

Formulações	FPS no preparo	FPS 1 mês	FPS 2 meses	FPS 3 meses
Gel + filtros livres	18,5 ± 0,3	18,0 ± 0,3	15,5 ± 0,6	15,3 ± 0,7
Gel + filtros lipossomados	19,0 ± 0,02	19,2 ± 0,9	18,9 ± 0,1	18,7 ± 0,5
Gel + filtros + fosfolipídios	18,5 ± 0,2	19,0 ± 0,4	18,8 ± 0,8	19,0 ± 0,3

Os valores de FPS logo após o preparo foram iguais para os 3 geles, demonstrando que o método empregado não detectou diferença entre a incorporação dos filtros nos lipossomas ou deixá-los livres na formulação. Isto pode ser explicado pelo preparo da amostra para leitura no espectrofotômetro, em que a amostra é diluída em etanol P.A. o que levará ao rompimento dos lipossomas. Além disso, todos ficaram próximos de 20 que era o FPS esperado.

Após 1 mês do preparo não houve alterações apreciáveis nos valores de FPS das três formulações, indicando uma manutenção da estabilidade. Após 2 meses de preparo foi observada uma queda no FPS do gel contendo os filtros livres de 16,2%, queda esta que não foi observada nas outras duas formulações. Após 3 meses do preparo, o FPS do gel contendo os filtros livres apresentou uma queda de 17,3% em relação ao inicial e não foi observada queda nos valores de FPS das outras duas formulações, indicando que a presença dos fosfolipídios, mesmo não formando lipossomas, pode contribuir na manutenção da estabilidade da combinação de filtros utilizada. Estes resultados foram confirmados através do Teste t de Student (TABELA 18) utilizado para montar uma comparação entre o FPS no preparo e após 3 meses de todas as formulações (NETO *et al.*, 2002).

TABELA 18: Resultados do Teste t utilizado para comparar o FPS inicial com o FPS após 3 meses das formulações.

Formulações	t calculado ( $t_{calc}$ )	t tabelado ( $t_{tab}$ ) ( $p = 0,05$ )	Situação	Conclusão
Gel + filtros livres	7,098	2,132	$t_{calc} > t_{tab}$	Há diferença
Gel + filtros lipossomados	0,842	2,132	$t_{calc} < t_{tab}$	Não há diferença
Gel + filtros + fosfolipídios	-2,525	2,776	$ t_{calc}  < t_{tab}$	Não há diferença

#### 5.14 DETERMINAÇÃO DO FPS *in vivo* DAS FORMULAÇÕES

A determinação do FPS *in vivo* das formulações poderia demonstrar diferenças entre o gel com os filtros livres e aquele com os filtros inclusos nos lipossomas. Isto porque na determinação *in vivo* do FPS, não há o rompimento dos lipossomas e pode-se verificar a interação entre lipossomas e estrato córneo.

Os valores de FPS a seco (TABELA 19) obtidos para os voluntários não seguiram uma distribuição normal ( $p = 0,05$ ) impedindo o uso do teste t de Student para comparação dos resultados. Para análise estatística foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney (NETO *et al.*, 2002).

O FPS obtido para o gel com os filtros livres demonstrou ser estatisticamente diferente do FPS para o gel com os lipossomas ( $p = <0,001$ ) e também para o gel com fosfolipídios dispersos ( $p = <0,001$ ).

Os valores de FPS a seco obtidos para as formulações contendo fosfolipídios ficaram próximos do valor esperado (FPS 20) e não indicaram diferença estatística entre a presença dos lipossomas e a simples dispersão dos fosfolipídios na formulação ( $p = 0,05$ ).

TABELA 19: Valores de FPS *in vivo* a seco das três formulações em gel preparadas.

Produto	FPS médio	n	Intervalo de confiança	
			Superior	Inferior
Gel + filtros livres	13,5 ± 1,5	20	14,2	12,8
Gel + filtros lipossomados	20 ± 2,4	20	21,1	18,9
Gel + filtros + fosfolípidios	20,5 ± 1,8	20	21,4	19,6

#### 5.15 COMPARAÇÃO DO FPS *in vitro* COM O FPS *in vivo* A SECO

O FPS *in vivo* a seco igual a 13,5 obtido para o gel com os filtros solares livres demonstrou uma queda de 27% em relação ao FPS 18,5 obtido inicialmente pelo método *in vitro*. Também representa uma queda de 11,8% em relação ao FPS 15,3 encontrado após 3 meses de preparo pelo método *in vitro*. Tal queda pode indicar uma degradação maior dos filtros no período entre o preparo da formulação e a realização do teste *in vivo* (1 mês e 20 dias) ou uma degradação causada pela irradiação do método *in vivo*.

A comparação entre os FPS obtidos *in vitro* e *in vivo* a seco foi realizada pelo teste de Mann-Whitney por dois motivos: os valores de FPS *in vivo* não seguem uma distribuição normal de pontos e existe uma diferença muito grande entre o tamanho da amostra dos métodos ( $n = 20$ , *in vivo* e  $n = 3$ , *in vitro*). Os resultados (TABELA 20) indicaram diferença significativa apenas para a formulação com filtros livres, o que possa ser explicado pela rápida degradação dos filtros nesta formulação. Descartando a formulação com filtros livres, pode-se observar uma boa correlação entre os demais resultados *in vitro* e *in vivo*, indicando que o método de determinação de FPS *in vitro* descrito por Mansur (MANSUR *et al.*, 1986) pode ser



utilizado como um ensaio preliminar evitando os complexos procedimentos e custos mais altos do teste *in vivo*.

TABELA 20: Comparação dos valores de FPS *in vivo* e *in vitro* das três formulações.

Produto	FPS <i>in vitro</i> 3 meses	FPS <i>in vivo</i> a seco	Teste de Mann-Whitney
Gel + filtros livres	15,3 ± 0,7	13,5 ± 1,5	Há diferença
Gel + filtros lipossomados	18,7 ± 0,5	20 ± 2,4	Não há diferença
Gel + filtros + fosfolipídios	19,5 ± 0,1	20,5 ± 1,8	Não há diferença

#### 5.16 DETERMINAÇÃO DO FPS *in vivo* APÓS IMERSÃO EM ÁGUA

##### “RESISTÊNCIA À ÁGUA”

A determinação do FPS após imersão em água (TABELA 21) é um dos ensaios que podem demonstrar diferenças entre o gel com os filtros livres, o gel contendo os lipossomas e o gel contendo fosfolipídios dispersos, isto porque espera-se uma capacidade maior dos lipossomas de interagir e penetrar no estrato córneo.

Outra informação que pode ser obtida deste ensaio é a verificação de que os lipossomas e/ou fosfolipídios aumentam a resistência à água dos filtros comparando-se a uma formulação convencional.

TABELA 21: Valores de FPS *in vivo* das três formulações em gel preparadas após imersão na água.

Produto	FPS médio	n	Intervalo de confiança	
			Superior	Inferior
Gel + filtros livres	12,1 ± 1,1	20	12,6	11,5
Gel + filtros lipossomados	17,9 ± 1,9	20	18,8	17,0
Gel + filtros + fosfolipídios	17,7 ± 1,1	20	18,2	17,2

Fazendo a comparação entre o FPS encontrado a seco e após imersão em água (TABELA 22), o gel com filtros livres teve uma queda de 10,4%. As formulações contendo fosfolipídios também tiveram quedas próximas a este valor. Dessa forma, nas formulações testadas a presença de fosfolipídios livres ou como lipossomas teve maior influência na manutenção da estabilidade dos filtros solares do que na resistência da formulação à água.

A análise estatística pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney indicou uma diferença significativa entre o FPS a seco e o FPS após imersão em água nas 3 formulações. Este teste indica se há ou não diferença, porém não mede esta diferença o que impede uma comparação sobre qual produto seria mais resistente à água.

TABELA 22: Comparação entre o FPS *in vivo* a seco e após imersão na água para avaliação da resistência à água.

Produto	FPS a seco	FPS após imersão	Queda (%)
Gel + filtros livres	13,5 ± 1,5	12,1 ± 1,1	10,4
Gel + filtros lipossomados	20 ± 2,4	17,9 ± 1,9	10,5
Gel + filtros + fosfolipídios	20,5 ± 1,8	17,7 ± 1,1	13,6

## 6 CONCLUSÃO

Os lipossomas preparados com BZ-3 a 7,0mM e a 8,1mM apresentaram resultados satisfatórios e semelhantes quando preparados com 48h de hidratação do filme fosfolipídico. Os lipossomas preparados com BZ-3 a 7,0mM e 96h de hidratação do filme fosfolipídico obtiveram os melhores resultados quando comparados aos demais.

O método de hidratação do filme lipídico se mostrou percentual de encapsulação superior ao de agitação do pré-lipossoma para o preparo dos lipossomas contendo BZ-3 a 7,0mM.

A visualização microscópica dos lipossomas confirmou a formação das vesículas, demonstrou a grande diferença de tamanho e forma das frações antes e após filtração e indicou a ausência de cristais insolúveis de BZ-3.

A determinação do tamanho dos lipossomas demonstrou que ao final dos processos de filtração e retirada do material não incluso, os lipossomas obtidos estavam dentro da faixa pretendida (em torno de 300nm).

As formulações em gel escolhidas se mostraram compatíveis com todos os componentes utilizados não havendo alteração do aspecto visual após 3 meses do preparo.

A formulação contendo os filtros solares livres teve uma queda confirmada estatisticamente entre o FPS *in vitro* inicial e o após 3 meses, demonstrando uma degradação dos filtros solares. Esta queda não ocorreu nas formulações contendo fosfolipídios dispersos ou lipossomas, indicando uma ação protetora bastante eficaz da PC contra a degradação dos filtros solares utilizados. Devido a esta degradação, as comparações utilizando o gel com os filtros solares livres tornam-se incertas.

A comparação estatística entre o FPS obtido pelo método *in vivo* e pelo método *in vitro* dos 2 produtos testados que continham fosfolipídios (dispersos ou lipossomas) indicou uma boa correlação entre eles. Desta forma, o emprego do método *in vitro* mostra-se muito interessante principalmente como um ensaio preliminar do desenvolvimento galênico;

A avaliação da resistência à água (40 min de imersão) não indicou diferenças estatisticamente significativas entre as formulações.

## 7 REFERÊNCIAS

ANANTHASWAMY, H.N. *et al.* Sunlight and skin câncer: inhibition of p53 mutations in UV-irradiated mouse skin by sunscreens. *Nat. Med.*, v. 3, p. 510-514, 1997.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN, L.V. Farmacotécnica: Formas farmacêuticas e liberação de fármacos. 6<sup>a</sup> ed., São Paulo: Premier, 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA - BRASIL). Resolução-RDC n<sup>o</sup> 237, de 22 de agosto de 2002. Regulamento técnico sobre protetores solares em cosméticos. Disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=18298&word=>. Acesso em 28 jan. de 2007.

\_\_\_\_\_. Resolução-RE n<sup>o</sup>899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>. Acesso em 28 jan. de 2007.

\_\_\_\_\_. Resolução-RDC n<sup>o</sup> 47, de 16 de março de 2006. Lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=21264&word=>. Acesso em 28 jan. de 2007.

ARMSTRONG, B.K.; KRICKER, A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J. Photochem. Photobiol. B.*, v. 63, p. 8-18, 2001.

BARTH, A. L; Fator de proteção solar versus coeficiente de carga de filtros solares químicos: avaliação fotobiológica de uma mistura de filtros solares químicos. 2000. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.

BARTLETT, G. R. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, v. 234, n. 3, p. 466-468, 1959.

BEAR, M. F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. 2<sup>a</sup> ed., Porto Alegre: Artmed, 2002.

BILLHIMER, W. L. Avaliação de filtros solares em seres humanos: proteção contra queimadura solar. *Cosmet. Toilet.*, v. 1, p. 41-44, 1989.

BRITISH PHARMACOPEIA (BP, Farmacopéia Britânica), v. 2, p. 109, 1998.

CEVC, G.; BLUME, G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 1104, p. 226-232, 1992.

CEVC, G. *et al.* Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 1368, p. 201-215, 1998.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE – Resolução 196/96 do Ministério da Saúde. Diário Oficial, 16 de outubro de 1996.

COLLINS, P.; FERGUSON, J. Photoallergic contact dermatitis to oxybenzone. *Br. J. Dermatol.* v. 131, p. 124-129, 1994.

CTFA, Cosmetic Ingredient Dictionary. 5<sup>a</sup> ed., ed.: NIKITAKIS, J. M.; Mcwen Junior, G. N., Washington DC, 1991.

DIFFEY, B.L. Indices of protection from in vitro assay of sunscreens. In: LOWE, N. J.; SHAATH, M. A.; PATHAK, M. A. Sunscreens Development, Evaluation, and Regulatory Aspects. New York: Marcel Dekker, p. 589-600, 1997.

DIFFEY, B.L. Human exposure to solar ultraviolet radiation. *J Cosmet. Dermatol.*, v. 1, p. 124-130, 2002.

ELIAS, P.M.; GOERKE J.; FRIEND, D.S. Mammalian epidermal barrier layer lipids: composition and influence on structure. *J. Invest. Dermatol.*, v. 69, p. 535-546, 1977.

ELIAS, P.M.; LEVENTHAL, M.E. Intercellular volume changes and cell surface area expansion during cornification. *Clin. Res.*, v. 27, p. 525, 1979.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA - Estados Unidos). Department of Health & Human Services. Sunscreens drug products for over the counter human use: final monograph. *Federal Register*, v. 64, n. 98, p. 27666-27693, 1999. Disponível em <http://www.fda.gov/cder/fdama/fedreg/sunscreen.pdf>. Acesso em 28 jan. de 2007.

GALLAGHER, R.P. *et al.* Broad-spectrum sunscreen use and the development of new nevi in white children: a randomized controlled trial. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v. 283, p. 2955-2960, 2000.

GARCIA, S. Lipossomas com filtro solar: preparação e controle de qualidade. 1998. 161f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

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

GASPARRO, F.P. Sunscreens, skin photobiology, and skin cancer: the need for UVA protection and evaluation of efficacy. *Environ. Health Perspect.*, v. 108, n. 1, p. 71-78, 2000.

GÓMEZ-HENZ, A.; FERNÁNDEZ-ROMERO, J.M. Analytical methods for the control of liposomal delivery systems. *Trends Anal. Chem.*, v. 25, n. 2, p. 167-178, 2006.

GREEN, A. *et al.* Daily sunscreen application and betacarotene supplementation in prevention of basal-cell and squamous-cell carcinomas of the skin: a randomized controlled trial. *Lancet*, v. 354, p. 723-729, 1999.

HAYDEN, C.G.J. *et al.* Systemic absorption of sunscreen after topical administration. *Lancet*. v. 350, p. 863-864, 1997.

HAYWOOD, R. Relevance of Sunscreen Application Method, Visible Light and Sunlight Intensity to Free-radical Protection: A Study of *ex vivo* Human Skin. *Photochem. Photobiol.*, v. 82, p. 1123-1131, 2006.

HENRIQUES, B.G.; SANTOS, E. P.; GARCIA, S. Inclusão de 3-4 Metilbenzilideno cânfora em lipossomas. In: 17. COLAMIQC - Congresso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos, 2005, Cusco - Peru. 17. COLAMIQC - Congresso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos, 2005.

HONEYWELL-NGUYEN, P.L. *et al.* Interaction between elastic and rigid vesicles with human skin in vivo. *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.*, v. 27, p. 237-238, 2000.

HUONG, S.P. The photoisomerization of the sunscreen ethylhexyl p-methoxy cinnamate and its influence on the sun protection factor. *J. Photochem. Photobiol A Chem.*, v. 186, n. 1, p. 65-70, 2007.

IMBERT, D.; WICKETT, R. R. Topical delivery with liposomes. *Cosmet. Toilet.* v. 110, p. 32-45, 1995.

INUI, M. *et al.* Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicology*, v. 194, n. 1-2, p. 43-50, 2003.

JANJUA, N. R. *et al.* Systemic absorption of the sunscreens Benzophenone-3, Octyl-Metoxynamate, and 3-(4-Methyl-Benzylidene) Camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. *J. Invest. Dermatol.*, v. 61, p. 57-61, 2004.

JANOUSEK, A. Regulatory aspects of sunscreens in Europe. In: LOWE, N. J.; SHAATH, M. A.; PATHAK, M. A. Sunscreens Development, Evaluation, and Regulatory Aspects. New York: Marcel Dekker, p. 589-600, 1997.

JIMÉNEZ, M.M. *et al.* Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. *Int. J. Pharm.*, v. 272, p. 45-55, 2004.

KIRCHOFF, V. W. J. H. Ozônio e radiação UVB. São José dos Campos, São Paulo: Transtec, 1995.

KLIGMAN, L.H.; AKIN, F.J.; KLIGMAN, A.M. Prevention of ultraviolet damage to the dermis of hairless mice by sunscreens. *J. Invest. Dermatol.*, v. 78, p. 181-189, 1982.

KNOX, J.M.; GUIN, J.; COCKERELL E.G. Benzophenones: ultraviolet light absorbing agents. *J. Invest. Dermatol.*, v. 27, p. 435-444, 1958.

KODA T. *et al.* Uterotrophic effects of benzophenone derivatives and a p-hydroxybenzoate used in ultraviolet screens. *Environ. Res.* v. 98, n. 1, p. 40-45, 2005.



KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H.W. Photoprotection. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v. 52, p. 937-958, 2005.

LÉPORI, L.R. Miniatlas: a pele. 1ª ed., São Paulo: Soriak, 2002.

LEWERENZ, H. J. *et al.* Acute and subacute toxicity studies of the UV absorber MOB in rats. *Food Cosmet. Toxicol.*, v. 10, p. 41-50, 1972.

LOTT, D.L. Uniformity of sunscreen product application: a problem in testing, a problem for consumers. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, v. 19, p. 17-20, 2003.

MA, R. *et al.* UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. *Toxicol. Sci.*, v. 74, p. 43-50, 2003.

MANCEK, B.; PECAR, S. Radicals and protection against radical damage in biological systems. *Farm. Vestn.*, v. 52, p. 133-144, 2001.

MANSUR, J.S. *et al.* Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *Anal. Bras. Dermatol.* v. 61, p. 121-124, 1986.

MELO, A.L. *et al.* Enhanced schistosomicidal efficacy of tartar emetic encapsulated in pegylated liposomes. *Int. J. Pharm.*, v. 255, p. 227-230, 2003.

MEZEI, M.; GULASEKHARAM, V. Liposomes – a selective drug delivery system for the topical route of administration: lotion dosage form. *Life. Sci.* v. 26, p. 1473-1477, 1980.

MEZEI, M.; GULASEKHARAM, V. Liposomes – a selective drug delivery system for the topical route of administration: gel dosage form. *J. Pharm. Pharmacol.* v. 34, p. 473-474, 1982.

MIRANDA, M. C. Desenvolvimento de lipossoma com produto repelente de insetos e metodologia analítica. 2005. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, M.V. Manual de soluções, reagentes e solventes. 11ª ed., [s.l.]: Edgard Blücher, 2001.

MORTELMANS, K. *et al.* Salmonella mutagenesis tests II: results from the testing of 270 chemicals. *Environ. Mutagen.*, v. 8, n. 7, p. 1-119, 1986.

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

NACHT, S. Encapsulation and other topical delivery systems. *Advanced Polymer. Abs.*, v. 110, p. 25-30, 1995.

NAKAGAWA, Y.; TAYAMA, K. Estrogenic potency of benzophenone and its metabolites in juvenile female rats. *Mol. Toxicol.* v. 75, p. 74-79, 2001.

NAYLOR, M. *et al.* High sun protection factor sunscreens in the suppression of actinic neoplasia. *Arch. Dermatol.*, v. 131, p. 170-175, 1995.

National Toxicology Program (NTP). Reproductive toxicity of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in CD-1 swiss mice. Report number T 0195, Research triangle Park, N. C., 1991.

NEDOROST, S.T. Facial erythema as a result of benzophenone allergy. *J. Am. Acad. Dermatol.* v. 49, p. 259-261, 2003.

NETO, B.B; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como fazer experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na ciência e na indústria. 2<sup>a</sup> ed., Campinas: UNICAMP, 2002.

NEW, R. R. C. Liposomes: a practical approach. Oxford: Oxford University, 1997.

NING, M. *et al.* Preparation and in vitro evaluation of liposomal/niosomal delivery systems for antifungal drug clotrimazole. *Indian. J. Exp. Biol.* v. 43, n. 3, p. 208, 2005.

ODLAND, G.F. Structure of the skin In: GOLDSMITH, L.A. Biochemistry and physiology of the skin. New York: Oxford University, p. 3-63, 1983.

OKEREKE, C.S. *et al.* Disposition of benzophenone-3 in rats after dermal administration. *Drug Metab. Dispos.*, v. 21, n. 5, p. 788-791, 1993.

OKEREKE, C.S. *et al.* Metabolism of benzophenone-3 in rats. *Toxicol. Lett.*, v. 73, p. 113-122, 1994.

OKEREKE, C.S. *et al.* Safety evaluation of benzophenone-3 after dermal administration in rats. *Toxicol. Lett.* v. 80, p. 61-67, 1995.

PLASTOW, S.R.; HARRISON, J.A.; YOUNG, A.R. Early changes in dermal collagen of mice exposed to chronic UVB irradiation and the effects of a UVB sunscreen. *J. Invest. Dermatol.*, v. 91, p. 590-592, 1988.

PODDA, M. *et al.* UV irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 24, p. 55-65, 1998

POTTS, R.O.; FRANCOEUR, M.L. The influence of stratum corneum morphology on water permeability. *J. Invest. Dermatol.*, v. 96, p. 495-499, 1991.

PUGLIA, C. *et al.* Evaluation of in vivo topical anti-inflammatory activity of indometacin from liposomal vesicles. *J. Pharm. Pharmacol.* v. 56, n. 10, p. 1225-1232, 2004.

RIBEIRO, R. P. *et al.* Avaliação do fator de proteção solar (FPS) *in vitro* de produtos comerciais e em fase de desenvolvimento. *Infarma*, v. 16, n. 7-8, p. 85-88, 2004.

RIBEIRO, R.P. Desenvolvimento e validação da metodologia de análise do teor de filtros solares e determinação do FPS *in vitro* em formulações fotoprotetoras comerciais. 2004. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 2004.

RIEGER, M. M. Efeito protetor dos filtros solares contra patologias da pele. *Cosmet. Toilet.*, v. 1, p. 33-44, 1989.

RIEGER, M. M. Photostability of cosmetic ingredients on the skin. *Cosmet. Toilet.* v. 112, n. 6, p. 65-72, 1997.

RINGBOM, A. *Zeitschrift fur Anal. Chem.*, v. 115, p. 332-343, 1939.

ROONEY, J.F.; BRYSON, Y.; MANNIX, M.L. Prevention of ultraviolet-light-induced herpes labialis by sunscreen. *Lancet*, v. 338, p. 1419-1422, 1991.

ROSEN, C. F.; Topical and systemic photoprotection. *Dermatol. Ther.*, v. 16, p. 8-15, 2003.

ROY, C.R. *et al.* The measurement of solar ultraviolet radiation. *Mutation Res.*, v. 422, p. 7-14, 1998.

SANTOS, E. P. *et al.* *In vitro* and *in vivo* determinations of sun protection factors of sunscreen lotions with octylmethoxycinnamate. *Int. J. Cosmetol. Scie.*, v. 21, p. 1-5, 1999.

SCHLUMPF, M. *et al.* Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters – an update. *Toxicology*. v. 205, p. 113-122, 2004.

SCHNEIDER, S. *et al.* Octyl methoxycinnamate: Two generation reproduction toxicity in Wistar rats by dietary administration. *Food Chem. Toxicol.*, v. 43, p. 1083-1092, 2005.

SCHURER, N.Y.; ELIAS, P.M. The biochemistry and function of stratum corneum lipids. *Adv. Lipid. Res.*, v. 24, p. 27-56, 1991.

SHAATH, N.A. On the theory of ultraviolet absorption by sunscreen chemicals. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, v. 82, p. 193-207, May/June, 1987.

SHAATH, N.A. Enciclopédia de Absorvedores de UV para produtos com filtro solar. *Cosmet. Toilet.*, v. 7, p. 47-58, 1995.

SHAATH, N.A. Evolution of moderns sunscreen Chemicals. In: LOWE, N. J.; SHAATH, M. A.; PATHAK, M. A. Sunscreens Development, Evaluation, and Regulatory Aspects. New York: Marcel Dekker, p. 589-600, 1997.

SKOOG, D.A.; LEARY, J.J. Principles of instrumental analysis. 4<sup>th</sup> ed., Philadelphia: Saunders College, 1992.

SQUIER, C.A.; COX, P.; WERTZ, P.W. Lipid content and water permeability of skin and oral mucosa. *J. Invest. Dermatol.*, v. 96, p. 123-126, 1991.

STECHER, H. Ultraviolet-absorptive additives in adhesives lacquers and plastics. *Adhesion*, v. 2, p. 243-244, 1958.

SUHONEN, M.T.; BOUWSTRA, J.A.; URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. *J. Control. Release*, v. 59, p. 149-161, 1999.

SUZUKI, T. *et al.* Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* v. 203, n. 1, p. 9-17, 2005.

TALSMA, H.; CROMMELIN, D. J. A. Liposomes as drug delivery systems, Part I: preparation. *Pharm. Technol. Int.*, nov., p. 24-36, 1992.

TRAN, C. *et al.* A new model using liposomes that allow to distinguish between absorption and oxidative properties of sunscreens. *Photochem. Photobiol.*, v. 75, n. 1, p. 1-5, 2002.

URBACH, F. The historical aspects of sunscreens. *J. Photoch. Photobio. B.*, v. 64, p. 99-104, 2001.

VERMA, D. D. *et al.* Particle size of liposomes influences termal delivery of substances into skin. *Int. J. Pharmac.* v. 258, p. 141-151, 2003.

YAKABE, C.; HONDA, A. M.; MAGALHÃES, J. F. Determinação do 17b-estradiol nas formas farmacêuticas gel e adesivo transdérmico. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, v. 41, n. 3, p. 359-364, 2005.

WERTZ, P.W.; DOWNING, D.T. Stratum corneum: biological and biochemical considerations. In: HADGRAFT, J.; GUY, R.H. *Transdermal drug delivery Developmental Issues and research initiatives*, New York: Marcel Dekker, p. 1-22, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Ultraviolet radiation: global solar UV index Fact sheet N°271, August, 2002.

WILLIAMS, M.L.; ELIAS, P.M. The extracellular matrix of stratum corneum: Role of lipids in normal and pathological function. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, v. 3, p. 95-122, 1987.

WOLF, P.; YAROSH, D.B.; KRIPKE, M.L. Effects of sunscreens and a DNA excision repair enzyme on ultraviolet radiation induced inflammation, immune suppression, and cyclobutane pyrimidine dimmer formation in mice. *J. Invest. Dermatol.*, v. 101, n. 4, p. 523-527, 1993.

WOLF, P. *et al.* Sunscreens and T4N5 liposomes differ in their ability to protect against ultraviolet-induced sunburn cell formation, alterations of dendritic epidermal cells, and local suppression of contact hypersensitivity. *J. Inv. Dermat.* v. 104, n. 2, p. 287-291, 1995.

ZHU, J. *et al.* Surface modification of liposomes by saccharides: Vesicles and stability of lactosyl liposomes studied by photon correlation spectroscopy. *J. Colloid Inter. Scie.*, v. 289, p. 542-550, 2005.