

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE PREPARAÇÕES
LIPOSSOMAIS CONTENDO FILTROS SOLARES SÓLIDOS
UVA E UVB

Bianca Gonzalez Henriques

Rio de Janeiro
2008

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE PREPARAÇÕES LIPOSSOMAIS
CONTENDO FILTROS SOLARES SÓLIDOS UVA E UVB

Bianca Gonzalez Henriques

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sheila Garcia

Rio de Janeiro
Fevereiro / 2008

H519d Henriques, Bianca Gonzalez.

Desenvolvimento e avaliação de preparações lipossomais contendo filtros solares sólidos UVA e UVB / Bianca Gonzalez Henriques, - Rio de Janeiro: UFRJ/Faculdade de Farmácia, 2008.

xxii, 161f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Sheila Garcia

Dissertação (mestrado) – UFRJ/Faculdade de Farmácia/Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2008.

Referências bibliográficas: f. 162-173.

1. Protetores de raios solares. 2. Lipossomos. 3. Avobenzona. 4.3,4-metilbenzilideno cânfora. 4. Cosméticos. I. Garcia, Sheila. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Desenvolvimento e avaliação de preparações lipossomais contendo filtros solares sólidos UVA e UVB.

CDD 668.55

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE PREPARAÇÕES LIPOSSOMAIS
CONTENDO FILTROS SOLARES SÓLIDOS UVA E UVB

Bianca Gonzalez Henriques

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 em 28 de fevereiro de 2008 por:

Profa. Dra. Sheila Garcia
Faculdade de Farmácia - UFRJ

Profa. Dra. Elisabete Pereira dos Santos
Faculdade de Farmácia – UFRJ

Profa. Dra. Nádia Maria Volpato
Faculdade de Farmácia – UFRGS

Profa. Dra. Valéria Robles Velasco
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP

Rio de Janeiro
Fevereiro / 2008

“Não sou nada. Nunca serei nada.
Não posso querer ser nada.
À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo”.

(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e coragem para nunca desistir dos desafios.

Aos meus pais, Marilene e Célio (*in memorium*), pelos sacrifícios para a minha formação profissional e pelo amor dispensado a mim ao longo desses anos.

À minha avó Marina pela assistência afetiva.

Ao meu namorado, Pedro, pelo carinho, companheirismo, paciência e compreensão. Por todos os momentos que estive ao meu lado.

Aos meus padrinhos, Bete e Quirino que sempre me acompanharam bem de pertinho ajudando e incentivando, sem eles tudo seria muito mais difícil.

À minha orientadora Sheila Garcia pela amizade e todos os ensinamentos científicos e profissionais. Agradeço por me incentivar e confiar sempre no meu trabalho.

À minha banca de acompanhamento, professoras Gisela Dellamora Ortiz e Valéria Pereira de Sousa, pelo grande incentivo, ensinamentos e por auxiliarem na conclusão deste trabalho.

À professora Elisabete Pereira e ao LADEG por todo o suporte e carinho dado ao meu trabalho, contribuindo com seu vasto conhecimento na área para enriquecer este trabalho.

Ao Venício Feo da Veiga e ao Instituto de Microbiologia Paulo Góes da UFRJ pelo apoio e inestimável ajuda na microscopia ótica e eletrônica.

À Juliana Maldonado Marchetti e ao Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica (FCFRP – USP) por toda colaboração nas análises para determinação do tamanho dos lipossomas, por espalhamento dinâmico da luz, fundamental para a avaliação dos lipossomas preparados.

Ao Daniel Vieira pela colaboração nas análises do infravermelho.

Aos professores do LabCQ: Luís Maurício e Valéria Pereira de Sousa por toda a colaboração e pelo suporte.

As minhas “amiguinhas” Laís, Tailane e Vivian, amigas para todos os momentos... pelas ‘muitas conversas... pelas ajudas nas etapas mais difíceis desse trabalho.

A Zaida Maria de Freitas e ao Professor Eduardo Ricci pelas colaborações e troca de idéias.

Aos amigos do LabCQ: Eliane, Maria do Socorro, Renatinha, Yara, Adriana, Maria, Clara, Guilherme, Vinícius...

Aos amigos do mestrado: Ana Karla, Daniela, Gláucia, Michele, Mariana Sato e Vânia.

Ao João Alexandre e Ana Cláudia pelo incentivo e grande apoio.

Ao LabCQ que disponibilizou todos os equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos na elaboração da presente dissertação.

Aos professores que sempre me incentivaram desde a graduação, em especial, a Prof. Carla e a Prof. Nádia Maria Volpato.

Aos professores da Pós-Graduação pelos grandes ensinamentos e contribuição na minha formação.

Aos funcionários da Pós-Graduação Marilene e Tiago pela assistência.

À Indústria Farmacêutica Spectrum Química e Cosmotec, pela doação das amostras de filtros solares.

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

RESUMO

HENRIQUES, Bianca Gonzalez. **Desenvolvimento e avaliação de preparações lipossomais contendo filtros solares sólidos UVA e UVB**. Rio de Janeiro. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

Lipossomas são vesículas fosfolipídicas que circundam um compartimento aquoso e hoje, apresentam um grande potencial na terapia tópica. A depleção da camada de ozônio causa o aumento da incidência da radiação UV e a exposição excessiva a esta radiação pode promover vários efeitos indesejáveis, tais como o eritema e o câncer de pele. Na literatura, estudos recentes *in vitro* e *in vivo* descrevem que alguns filtros solares possuem atividade estrogênica, evidenciando uma absorção sistêmica dessas substâncias. Portanto, com o intuito de diminuir os efeitos tóxicos de alguns desses filtros solares, propõem-se neste trabalho avaliar a inclusão de dois filtros solares, o 3,4-metilbenzilideno cânfora (3,4-MBC) - UVB e o butil metóxidibenzoilmetano (BMDM) - UVA em lipossomas e desenvolver uma formulação com ambos os filtros inclusos nos lipossomas. As formulações lipossomais foram preparadas pelo método de hidratação do filme fosfolipídico utilizando a concentração fosfolipídica de 42 mM, porém variando a concentração do 3,4-MBC em 6,3 mM, 8,4 mM, 9,6 mM e 10,5 mM e a do BMDM em 4,2 mM, 6,3 mM e 8,4 mM. Após obter os lipossomas foi realizada uma filtração através de membranas de polycarbonato (0,4 e 0,2 μm). O material não incluído foi eliminado por filtração em coluna gel Sephadex[®] G-50. Os lipossomas foram avaliados em relação ao teor de filtros solares encapsulados, conteúdo de fosfolipídios, morfologia das vesículas por microscopia ótica e eletrônica de transmissão e tamanho das vesículas lipossomais por espalhamento dinâmico da luz laser. A relação de aprisionamento mais adequada foi obtida com 8,4 mM de 3,4-MBC e 6,3 mM de BMDM. O percentual de inclusão foi 74,65% para o 3,4-MBC e 88,02% de BMDM. Nessa proporção as perdas de fosfolipídios e do filtro solar foram proporcionais, resultando em bom rendimento de inclusão. A seguir foram preparadas as formulações gel de Natrosol[®] contendo o 3,4-MBC e o BMDM, inclusos ou não nos lipossomas. Os geles foram avaliados em relação ao FPS por método *in vitro*, teor dos filtros solares por método validado por CLAE e ensaio de liberação *in vitro* utilizando o sistema bicompartimental clássico conhecido como célula de Franz. As formulações gel de natrosol[®] com os filtros solares livres e inclusos em lipossomas apresentaram um FPS 11. O percentual de filtros solares em ambas as formulações encontra-se de acordo com a faixa de 90,0% a 110,0% da quantidade declarada de ativos. Para o ensaio de liberação *in vitro*, foi

necessário escolher o meio receptor mais adequado, a solução receptora escolhida foi tampão fosfato pH 7,4 contendo 4% de polissorbato 80 devido a maior concentração de saturação encontrada 1482,9 µg/mL para o 3,4-MBC e 677,9 µg/mL para o BMDM, obedecendo desta forma a condição *sink*. O estudo de liberação *in vitro* indicou que formulações contendo os filtros solares inclusos em sistemas de liberação, como os lipossomas, são promissoras, já que oferecem uma menor cedência dos filtros solares sólidos 3,4-MBC e BMDM da formulação para a solução receptora, possibilitando uma menor absorção percutânea.

ABSTRACT

HENRIQUES, Bianca Gonzalez. **Desenvolvimento e avaliação de preparações lipossomais contendo filtros solares sólidos UVA e UVB**. Rio de Janeiro. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

Liposomes are phospholipid vesicles that fully enclose an aqueous volume and today show potential for topical drug delivery. The ozone depletion on Earth could cause the increase in UV radiation and the excessive exposure to sunlight could be the cause of several harmful effects as erythema and skin cancer. However, recent *in vitro* and animal studies have reported estrogen-like activity for some sunscreens, showing systemic absorption for these molecules. Thus, to diminish the toxic effects of sunscreens, this study evaluated the inclusion of the sunscreens: 3,4-methylbenzylidene camphor (3,4-MBC) - UVB and butyl methoxydibenzoylmethane (BMDM) - UVA in liposomes and development of a new ideal liposomal gel sunscreen formulation. The advantage of encapsulating sunscreens in liposomes is that it enhances significantly the sunscreen accumulation in the administration site, as a result of the high substantivity on the corneous layer. The liposomal sunscreen formulations were prepared by drying the phospholipid film. Phospholipids were used at 42 mM to 6,3 mM, 8,4 mM, 9,6 mM and 10,5 mM of 3,4-MBC and to 4,2 mM, 6,3 mM and 8,4 mM of BMDM. After obtaining the liposomes, a sequential extrusion through polycarbonate membranes (0,4 and 0,2 μm) was performed. The non-included material was eliminated by gel filtration on a Sephadex[®] G-50 column. And then, the sunscreens and the phospholipids were assayed, the vesicles morphology was analysed by optical and by transmission electron microscopy (negative stain) and the size of the vesicles was measured by dynamic light scattering in the liposomal formulations. The best relationship between 3,4-MBC and the lipids was 8,4 mM, whereas to BMDM it was 6,3 mM. The entrapment yield was 74,65% of 3,4-MBC and 88,02% of BMDM after gel filtration. The loss of phospholipids was proportional to the sunscreens, resulting in a good entrapment yield. After the establishment of the best relationship between sunscreens and phospholipids, Natrosol[®] gel formulations were developed containing 3,4-MBC and BMDM encapsulated in liposomes or free in the gel formulation. The gel evaluations to determine the SFP were carried out *in vitro*, by validating the percentage of entrapped sunscreen using the CLAE methodology as well as release studies of the sunscreens, using Franz cells diffusion. The gel formulation containing sunscreens and gel formulation with sunscreens entrapped in liposomes showed SPF 11. The percentage of

encapsulated sunscreens in gel formulations was in the range of 90,0% -110,0% of the declared quantity. The receptor solution chosen was phosphate buffer with 4% of polysorbate 80 (pH 7,4) as it reached the major saturation concentration 1482,4 µg/mL to the 3,4-MBC and 677,9 µg/mL to the BMDM obeyed the *sink* conditions. As expected, the formulation with sunscreens included in liposomes showed smaller release rate of sunscreens compared to gel sunscreen formulations. The use of liposomes as a delivery system seems to be promising, given the smaller diffusion of solid sunscreens for formulation to solution receptor, given a possible lower systemic absorption of the sunscreens.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1: Ilustração esquemática do espectro eletromagnético.	28
FIGURA 2: As três camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme.	31
FIGURA 3: Representação esquemática do mecanismo de ação de filtros solares.	35
FIGURA 4: Esquema demonstrativo das rotas de penetração pela pele.	41
FIGURA 5: Estrutura molecular do 3,4-MBC.	46
FIGURA 6: Equilíbrio ceto-enólico para BMDM.	48
FIGURA 7: Ilustração esquemática da estrutura de um lipossoma.	51
FIGURA 8: Tipos de lipossomas dependendo do tamanho e número de lamelas.	54
FIGURA 9: Representação esquemática do preparo de lipossomas pelo método de hidratação do filme fosfolipídico.	73
FIGURA 10: Esquema do processo de normalização dos lipossomas.	75
FIGURA 11: Representação esquemática de uma célula de Franz.	97
FIGURA 12: Espectros de absorção na região do ultravioleta para os filtros solares em estudo.	100
FIGURA 13: Espectro de IV do 3,4-MBC avaliado como padrão de trabalho.	102
FIGURA 14: Espectro de IV do BMDM avaliado como padrão de trabalho.	103
FIGURA 15: Curva de Ringbom obtida a partir da solução de 3,4-MBC em etanol nas concentrações de 0,39 a 49,95 µg/mL, determinadas no UV a 300nm.	105
FIGURA 16: Curva de Ringbom obtida a partir da solução de BMDM em etanol nas concentrações de 0,41 a 41,28 µg/mL, determinadas no UV a 358nm.	106
FIGURA 17: Representação da curva de calibração do 3,4-MBC por espectrofotometria de ultravioleta (UV) utilizando como solvente etanol P.A.	107
FIGURA 18: Representação da curva de calibração do BMDM por espectrofotometria de ultravioleta (UV) utilizando como solvente etanol P.A.	108
FIGURA 19: Espectro de varredura das frações sem filtrar e filtrada em coluna Sephadex [®] G-50 das suspensões lipossomais diluídas em etanol P.A. para a análise quantitativa do 3,4-MBC em lipossomas 42 mM com inclusão de 8,4 mM do 3,4-MBC.	110

FIGURA 20: Representação de uma das curvas de calibração de fósforo utilizada para a determinação do teor de fosfolipídios nas frações de lipossomas por espectroscopia no UV/VIS.	111
FIGURA 21: Fotomicroscopia ótica da fração sem filtrar de lipossomas 42 mM com 8,4 mM de 3,4-MBC (campo claro). Aumento de 100x, óleo de imersão.	120
FIGURA 22: Fotomicroscopia ótica da fração filtrada em membrana 0,2 µm de Lipossomas 42 mM com 8,4 mM de 3,4-MBC (DIC). Aumento de 100x, óleo de imersão.	120
FIGURA 23: Distribuição do tamanho de lipossomas 42mM com 8,4mM de 3,4-MBC, fração sem filtração.	121
FIGURA 24: Distribuição do tamanho de lipossomas 42 mM com 8,4 mM de 3,4-MBC, fração filtrada em membrana 0,2 µm.	122
FIGURA 25: Fotomicroscopia ótica da fração sem filtrar de lipossomas 42 mM com 6,3 mM de BMDM (campo claro). Aumento de 100x, óleo de imersão.	123
FIGURA 26: Fotomicroscopia ótica da fração filtrada em membrana 0,2 µm de lipossomas 42 mM com 6,3 mM de BMDM (DIC). Aumento de 100x, óleo de imersão.	123
FIGURA 27: Distribuição do tamanho de lipossomas 42 mM com 6,3 mM de BMDM, fração sem filtrar.	124
FIGURA 28: Distribuição do tamanho de lipossomas 42 mM com 6,3 mM de BMDM, fração filtrada em membrana 0,2 µm.	124
FIGURA 29: Avaliação da influência do tempo de contato de lipossoma 42 mM com 8,4 mM de 3,4-MBC, fração sem filtrar, em etanol 25% (v/v) quanto à distribuição do tamanho das vesículas.	127
FIGURA 30: Avaliação da influência do tempo de exposição de lipossoma 42 mM com 8,4 mM de 3,4-MBC, fração sem filtrar, em etanol 25% (v/v) quanto à esfericidade das vesículas.	128
FIGURA 31: Fotomicroscopia eletrônica do lipossoma 42mM com 8,4mM de 3,4-MBC, após a passagem por coluna de Sephadex® G-50, pelo método da gota. Aumento de 80 Kx.	129
FIGURA 32: Fotomicroscopia eletrônica do lipossoma 42 mM com 6,3mM de BMDM, após a normalização por membrana 0,2µm, pelo método da gota. Aumento de 80 Kx.	130
FIGURA 33: Tamanho das partículas nos lipossomas 42 mM com 8,4 mM de 3,4-MBC – fração filtrada em membrana de 0,2 µm.	131
FIGURA 34: Tamanho das partículas nos lipossomas 42 mM com 6,3 mM de BMDM – fração filtrada em membrana de 0,2 µm.	132

FIGURA 35: Cromatograma tridimensional obtido através do detector UV-PDA para amostra dos filtros solares nas concentrações: 40 µg/mL para o 3,4-MBC e 50 µg/mL para o BMDM.	134
FIGURA 36: Cromatograma da formulação gel base	136
FIGURA 37: Representação das curvas de calibração obtidas para as cinco concentrações de 3,4-MBC, preparadas em triplicata, em cada dia de análise.	137
FIGURA 38: Representação das curvas de calibração obtidas para as cinco concentrações de BMDM, preparadas em triplicata, em cada dia de análise.	138
FIGURA 39: Cromatogramas obtidos para fluxo de fase móvel de 1,5 mL/min para o 3,4-MBC na concentração de 40 µg/mL e o BMDM na concentração de 50 µg/mL.	144
FIGURA 40: Cromatogramas obtidos para fluxo de fase móvel de 0,5 mL/min para o 3,4-MBC na concentração de 40 µg/mL e o BMDM na concentração de 50 µg/mL.	144
FIGURA 41: Cromatogramas obtidos para cromatógrafo modelo Waters, fluxo de fase móvel de 1,0 mL/min e volume de injeção de 10 µL.	146
FIGURA 42: Cromatograma da formulação gel de Natrosol® com filtros solares livres.	149
FIGURA 43: Cromatograma da formulação gel de Natrosol® com filtros solares inclusos nos lipossomas.	149
FIGURA 44: Massa de 3,4-MBC acumulada na solução receptora normalizada pela área de contato em função do tempo na formulação gel de Natrosol® com filtros solares livres.	158
FIGURA 45: Massa de 3,4-MBC acumulada na solução receptora normalizada pela área de contato em função do tempo na formulação gel de Natrosol® com filtros solares inclusos em lipossomas.	158
FIGURA 46: Massa de BMDM acumulada na solução receptora normalizada pela área de contato em função do tempo na formulação gel de Natrosol® com filtros solares livres.	161
FIGURA 47: Massa de BMDM acumulada na solução receptora normalizada pela área de contato em função do tempo na formulação gel de Natrosol® com filtros solares inclusos em lipossomas.	161
FIGURA 48: Estudo da cedência do 3,4-MBC nas duas formulações desenvolvidas.	164
FIGURA 49: Estudo da cedência do BMDM nas duas formulações desenvolvidas.	164

LISTA DE QUADROS

Pág.

QUADRO 1: Valores do efeito eritematogênico e intensidade de radiação na faixa do UVB, normalizados para a determinação de FPS por espectrofotometria.	93
--	----

LISTA DE EQUAÇÕES

	Pág.
EQUAÇÃO 1: Cálculo do FPS segundo Mansur	93

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1: Composição das preparações lipossomais obtidas pelo método de hidratação do filme fosfolípido para a incorporação do 3,4-MBC.	71
TABELA 2: Composição das preparações lipossomais obtidas pelo método de hidratação do filme fosfolípido para a incorporação do BMDM.	72
TABELA 3: Condições cromatográficas para a metodologia proposta para a avaliação dos filtros solares 3,4-MBC e BMDM.	87
TABELA 4: Determinação do ponto de fusão dos filtros solares em estudo	99
TABELA 5: Caracterização dos filtros solares em estudo.	101
TABELA 6: Valores utilizados para a construção da curva de Ringbom para o 3,4-MBC.	104
TABELA 7: Valores utilizados para a construção da curva de Ringbom para o BMDM.	105
TABELA 8: Respostas obtidas pelas curvas de calibração do 3,4-MBC em cada dia de análise.	106
TABELA 9: Respostas obtidas pelas curvas de calibração do BMDM em cada dia de análise.	107
TABELA 10: Determinação do teor de fósforo, teor de 3,4-MBC e FPS nos lipossomas com Phospholipon [®] 90 a 42mM variando-se a concentração de 3,4-MBC.	112
TABELA 11: Determinação em triplicata do teor de fósforo, do filtro solar 3,4-MBC e do FPS <i>in vitro</i> para avaliar a sua inclusão nos lipossomas com Phospholipon [®] 90 a 42 mM e com 8,4 mM de 3,4-MBC.	114

TABELA 12: Determinação do teor de fósforo e teor do BMDM nos lipossomas com Phospholipon® 90 a 42 mM variando-se a concentração de BMDM.	115
TABELA 13: Determinação em triplicata do teor de fósforo e do filtro solar BMDM para avaliar a sua inclusão nos lipossomas com Phospholipon® 90 a 42 mM com 6,3 mM do filtro solar.	117
TABELA 14: Valores médios para os diâmetros mínimo, médio e máximo obtidos por MO para os lipossomas nas diferentes frações.	125
TABELA 15: Parâmetros de conformidade do sistema.	135
TABELA 16: Respostas obtidas pelas curvas de calibração do 3,4-MBC em cada dia de análise.	137
TABELA 17: Respostas obtidas pelas curvas de calibração de BMDM em cada dia de análise.	138
TABELA 18: Determinação da repetibilidade e da precisão intermediária para o 3,4-MBC na formulação	139
TABELA 19: Determinação da repetibilidade e da precisão intermediária para o BMDM na formulação.	140
TABELA 20: Resultados do teste de precisão do volume de injeção	141
TABELA 21: Resultados do ensaio de recuperação para o 3,4-MBC.	142
TABELA 22: Resultados do ensaio de recuperação para BMDM	142
TABELA 23: Determinação em triplicata do teor de fósforo e dos filtros solares para avaliar a inclusão nos lipossomas com Phospholipon® 90 a 168 mM.	147
TABELA 24: Avaliação físico-química das formulações desenvolvidas.	150
TABELA 25: Avaliação das formulações em relação FPS <i>in vitro</i> .	151
TABELA 26: Estudo de solubilidade para o 3,4-MBC e o BMDM.	154
TABELA 27: Massa cedida de 3,4-MBC em cada tempo de coleta por área, da formulação contendo gel de Natrosol® com os filtros solares livres, utilizando membrana sintética de acetato de celulose (n = 6).	156

TABELA 28: Massa cedida de 3,4-MBC em cada tempo de coleta por área, da formulação contendo gel de Natrosol® com os filtros solares inclusos em lipossomas, utilizando membrana sintética de acetato de celulose (n = 6). 157

TABELA 29: Massa cedida de BMDM em cada tempo de coleta por área, da formulação contendo gel de Natrosol® com os filtros solares livres, utilizando membrana sintética de acetato de celulose (n = 6). 159

TABELA 30: Massa cedida de BMDM em cada tempo de coleta por área, da formulação contendo gel de Natrosol® com os filtros solares inclusos em lipossomas, utilizando membrana sintética de acetato de celulose (n = 6). 160

TABELA 31: Coeficientes de correlação (r) observados a partir de 60 minutos utilizando o modelo de Higuchi. 162

TABELA 32: Comparação das massas cedidas de 3,4-MBC e BMDM em cada tempo de coleta por área, entre as duas formulações, utilizando membrana sintética de acetato de celulose. 163

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Abs.	Absorbância
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BMDM	Butilmetóxidibenzoil metano
r	Coeficiente de correlação
R ²	Coeficiente de determinação
ϵ	Coeficiente de extinção molar
COLIPA	Comitee de la Liasion des Associations Europeans de L'Industries de la Parfumerie, de Produits Cosmetiques et de Toilette (Comitê das Associações Européias das Indústrias de Perfumaria, Cosméticos e produtos de Toucador)
λ	Comprimento de onda
λ máx	Comprimento de onda em que ocorre a maior absorbância
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
dp	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DL	Difração à laser
DME	Dose mínima de eritema
ECF	Espectroscopia de correlação de fótons
EC	Estrato córneo
FPS	Fator de proteção solar
FDA	Food and Drug Administration
IV	Infravermelho
3,4-MBC	3-(4-metilbenzilideno) cânfora
MFA	Microscopia de Força Atômica
MV	Microscopia de varredura
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MO	Microscopia óptica
mM	Milimolar (milimoles / litro)
min.	Minuto(s)
n	Número de réplicas

OTC	Over The Counter (denominação para medicamentos de venda livre)
P.A.	Para análise
pH	Potencial de Hidrogênio iônico
q.s.p	Quantidade suficiente para
%	Percentual
% (p/v)	Percentual peso / volume
% (v/v)	Percentual volume / volume
PDA	arranjo de fotodiodos
PTK	Fosfotungstato de potássio
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
TRIS	Tris-hidroximetilaminometano
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
VML	Vesículas multilamelares
VUG	Vesículas unilamelares grandes
VUP	Vesículas unilamelares pequenas

SUMÁRIO

	Página
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
1.1 RADIAÇÃO SOLAR	28
1.2 1 Radiação UVA	29
1.1.2 Radiação UVB	29
1.1.3 Radiação UVC	30
1.2 PELE	31
1.2.1 Epiderme	31
1.2.2 Derme	34
1.2.3 Hipoderme	34
1.3 FOTOPROTETORES	35
1.3.1 Propriedade dos fotoprotetores	37
1.3.2 Eficácia dos fotoprotetores	39
1.3.3 Absorção Percutânea dos filtros solares	41
1.3.3.1 Estudos de liberação e permeação cutânea <i>in vitro</i>	44
1.3.3.2 Estudos de permeação cutânea <i>in vivo</i>	45
1.3.4 Filtros solares em estudo	46
1.3.4.1 3-(4-Metilbenzilideno) cânfora	46
1.3.4.2 Butil metóxi-dibenzoilmetano	48
1.4 LIPOSSOMAS	51
1.4.1 Estrutura	51
1.4.2 Métodos de preparação	54
1.4.3 Limitações no desenvolvimento dos lipossomas	56

1.4.4 Caracterização dos lipossomas	57
1.4.5 Interação dos lipossomas com a pele e sua penetração	59
2. OBJETIVOS	
2.1 OBJETIVO GERAL	62
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 MATERIAL	64
3.1.1 Matérias-primas	64
3.1.2 Reagentes	64
3.1.3 Equipamentos	65
3.1.4 Outros materiais	66
3.2 MÉTODOS	67
3.2.1 Padrões de trabalho	67
3.2.2 Caracterização físico-química dos filtros solares usados como padrões de trabalho	67
3.2.2.1 Determinação do ponto de fusão	67
3.2.2.2 Análise do espectro de absorção na região ultravioleta	68
3.2.2.3 Análise do espectro de absorção na região infravermelha	68
3.2.3 Desenvolvimento das curvas de calibração	69
3.2.3.1 Curva de Ringbom	69
3.2.3.2 Curva de calibração por espectrofotometria na região do UV	69
3.2.4 Obtenção e caracterização dos lipossomas contendo filtros solares	70
3.2.4.1 Obtenção	70

3.2.4.2 Normalização dos lipossomas	74
3.2.4.3 Análise das frações de lipossomas	76
3.2.4.3.1 Determinação da quantidade de filtros solares incorporados nas frações dos lipossomas	76
3.2.4.3.2 Determinação da quantidade de fosfolípido nas frações dos lipossomas pelo método de Bartlett	76
3.2.4.3.3 Microscopia ótica	78
3.2.4.3.4 Microscopia eletrônica de transmissão	79
3.2.4.3.5 Espalhamento dinâmico da luz laser	80
3.2.5 Desenvolvimento das Formulações	81
3.2.5.1 Formulação gel de Natrosol [®] contendo 3,4-MBC e BMDM	81
3.2.5.2 Formulação gel de Natrosol [®]	83
3.2.5.3 Formulação gel de Natrosol [®] contendo 3,4-MBC e BMDM inclusos em lipossomas	84
3.2.6 Padronização da metodologia de análise das formulações por CLAE	86
3.2.6.1 Estabelecimento das condições cromatográficas	86
3.2.6.2 Preparo dos padrões de trabalho	87
3.2.6.3 Preparo das amostras	87
3.2.6.4 Validação da metodologia analítica por CLAE	88
3.2.6.4.1 Especificidade	89
3.2.6.4.2 Linearidade	89
3.2.6.4.3 Precisão	90
3.2.6.4.4 Precisão do volume de injeção	91
3.2.6.4.5 Exatidão	91
3.2.6.4.6 Robustez	92

3.2.7 Determinação do FPS <i>in vitro</i> das formulações desenvolvidas	93
3.2.8 Determinação da solubilidade dos filtros solares em diferentes meios	95
3.2.9 Liberação <i>in vitro</i> através de membrana sintética	96
3.2.9.1 Preparo da membrana sintética	96
3.2.9.2 Montagem da célula de difusão tipo Franz	96
 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILTROS SOLARES USADOS COMO PADRÃO	99
4.1.1 Determinação do ponto de fusão	99
4.1.2 Análise do espectro de absorção na região ultravioleta	99
4.1.3 Análise do espectro de absorção na região do infravermelho	101
4.2 DESENVOLVIMENTO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO	104
4.2.1 Curva de Ringbom	104
4.2.2 Curvas de calibração	106
4.3 ANÁLISE DOS LIPOSSOMAS COM 42 mM DE FOSFOLIPÍDIO PREPARADOS PELO MÉTODO DE HIDRATAÇÃO DO FILME LIPÍDICO	109
4.3.1 Determinação da quantidade de filtros solares e fosfolipídio nas preparações lipossomais	109
4.3.2 Caracterização das preparações lipossomais em relação ao tamanho e morfologia das vesículas	118
4.4 PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE POR CLAE	134
4.4.1 Especificidade	136
4.4.2 Linearidade	137
4.4.3 Repetibilidade e Precisão Intermediária	139
4.4.4 Precisão do volume de injeção	141

4.4.5 Exatidão	142
4.4.6. Robustez	143
4.5 AVALIAÇÃO DAS FORMULAÇÕES PREPARADAS	144
4.6 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DOS FILTROS SOLARES EM DIFERENTES MEIOS	153
4.7 ESTUDO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS FORMULAÇÕES	156
5. CONCLUSÕES	166
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	168

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 RADIAÇÃO SOLAR

O sol é capaz de emitir radiações corpusculares (prótons, partículas, elétrons) e radiações eletromagnéticas, formando um espectro contínuo que vai do raio X até as ondas de rádio (**FIGURA 1**). O espectro eletromagnético emitido pelo sol envolvido nas reações cutâneas consiste das radiações ultravioleta (UV) (100 a 400 nm), visível (400 a 780 nm) e infravermelha (780 a 5000 nm), sendo que a radiação UV é a que apresenta a maior tendência para ocasionar danos à pele (PETRAZZUOLI, 2000).

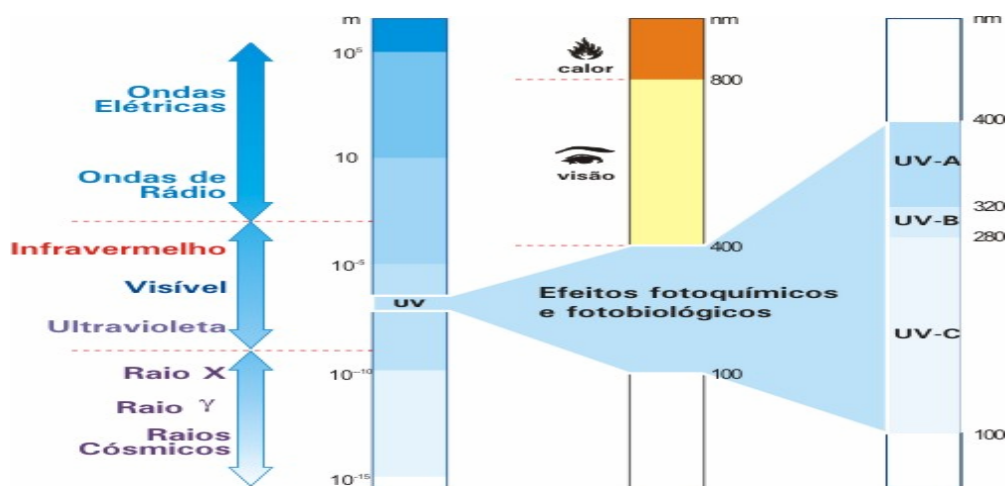


FIGURA 1: Ilustração esquemática do espectro eletromagnético.

Disponível em <<http://www.cptec.inpe.br/glossario/fotos/035g.jpg>>

Os efeitos bioquímicos da radiação solar sobre a pele são causados, principalmente, pelas radiações UVA e UVB. Exposições repetidas a estes raios levam a alterações quase irreversíveis à estrutura e função dos tecidos e células na epiderme e na derme (GILCHREST *et al.*, 1996). A radiação UV pode ser subdividida de acordo com o comprimento de onda, sendo seus efeitos apresentados a seguir.

1.1.1 Radiação UVA

Apresenta comprimento de onda compreendido entre 320 a 400 nm. Proporciona um bronzeamento direto, porém seu acúmulo, ao longo dos anos, provoca alterações das fibras colágenas e elásticas, favorecendo o envelhecimento precoce (BILLHIMER, 1989). Já foi descrito que a radiação UVA pode ser absorvida por outras moléculas além do DNA, como a flavina mononucleotídeo, a nicotinamida adenina dinucleotídeo, certas quinonas, a riboflavina, o triptofano entre outras que podem transferir, em seguida, sua energia do estado excitado para o DNA, conduzindo à alterações e destruições do DNA (WOLF, TÜZÜN & TÜZÜN, 2001).

A radiação UVA é capaz de produzir espécies reativas de oxigênio que atacam lipídios de membrana dos queratinócitos, conduzindo à oxidação lipídica e à inativação de enzimas, despigmentação, desnaturação de proteínas e prejuízo das organelas celulares que são essenciais para a sobrevivência celular (WOLF, TÜZÜN & TÜZÜN, 2001; KULLAVANIJAYA & LIM, 2005).

Os raios UVA, menos energéticos, são menos lesivos do que os UVB, sendo antigamente tidos como inócuos. A quantidade de raios UVA que chega na superfície terrestre é dez vezes maior que a de raios UVB (BARGOIL & ERDMAN, 1993).

1.1.2 Radiação UVB

Exibe comprimento de onda compreendido entre 280 a 320 nm. Os efeitos a curto prazo são em sua maior parte devidos à exposição a esta radiação. Pode acarretar queimadura solar, também chamado de eritema, que pode ser agravado pela exposição conjunta à radiação UVA e ao infravermelho. Hiperqueratinização, espessamento da epiderme e da derme, inflamação cutânea, síntese de vitamina D entre outros efeitos são relatados. Sabe-se ainda que como

efeitos a longo prazo incluem-se o câncer cutâneo, a fotocarcinogênese e a imunossupressão (BARGOIL & ERDMAN, 1993; KULLAVANIJAYA & LIM, 2005).

1.1.3 Radiação UVC

O comprimento de onda desta radiação varia entre 200 a 280 nm. Apresenta efeito germicida, e devido a essa ação esterilizante, torna-se prejudicial ao tecido cutâneo (RUVOLO, 1997). Esta radiação é bloqueada pela camada de ozônio, agente fotoprotetor formado na estratosfera, não permitindo que os raios UVC atinjam a superfície terrestre.

A radiação UV sofre influências que podem aumentar ou diminuir sua intensidade ao atingir a superfície terrestre, como por exemplo, a latitude, a altitude, o horário de exposição, entre outros fatores. Quanto menor a latitude, distância a partir da linha do equador, maior a intensidade desta radiação. Além disso, altas altitudes recebem maior incidência da radiação UV em comparação com altitudes menores. A radiação UVB é mais forte entre 10 h e 16 h, enquanto que a radiação UVA é menos afetada pela altitude e condições atmosféricas (KULLAVANIJAYA; LIM, 2005).

A maioria dos efeitos prejudiciais da radiação solar resulta de eventos primários que seguem da absorção da radiação UV pelo DNA, RNA, proteínas, enzimas e lipídios presentes nas membranas celulares da epiderme e da derme (WOLF, TÜZÜN & TÜZÜN, 2001). Estudos recentes mostram que a radiação UV produz destruição gênica no DNA das células da pele. Essas lesões no DNA resultam em dímeros de pirimidina, isto é, produtos das reações fotoquímicas do DNA destruído por UV. Em adição à destruição do DNA, a radiação UV induz a imunossupressão que é responsável pela ocorrência de *herpes simples* ou outras infecções virais que freqüentemente seguem exposição prolongada ao sol ou queimaduras (NOHYNEK & SCHAEFER, 2001).

1.2 PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a aproximadamente 15% do peso corporal do homem. É constituída basicamente de três camadas que, de fora para dentro são: epiderme, derme e hipoderme (AZULAY & AZULAY, 1997), conforme ilustrado na **FIGURA 2**.

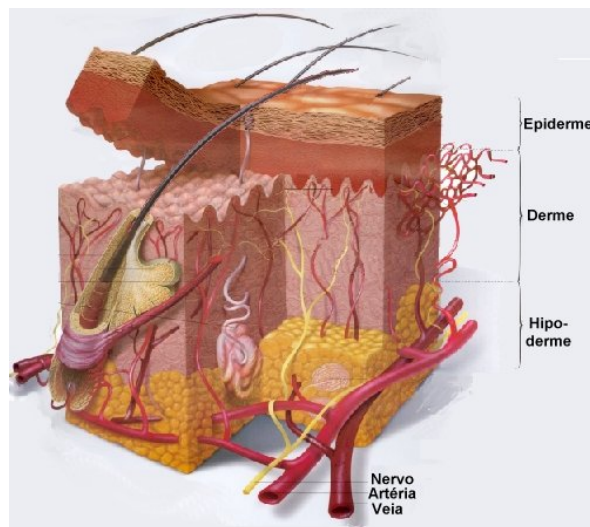


FIGURA 2: As três camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme.

Disponível em< <http://www.saudeparavoce.com.br/pintanapele/anatomia.htm>>

O principal papel da pele é proteger o organismo, de um lado impedindo a entrada de corpos e substâncias nocivas, de outro evitando a evaporação excessiva que levaria a desidratação, exercendo, desse modo, a função de barreira eficiente à penetração da água e de outras substâncias (LEONARDI & CAMPOS, 1997).

1.2.1 Epiderme

A epiderme é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, apresentando três tipos de células: os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995). É constituída de células epiteliais dispostas em

camadas, as quais de dentro para fora recebem, respectivamente o nome de camada germinativa ou basal, espinhosa, granulosa e córnea (LEONARDI & CAMPOS, 1997).

A camada basal é formada por células mais jovens, colunares, justapostas umas às outras e apresenta uma intensa atividade mitótica, sendo responsável pela constante renovação da epiderme. Há, assim, um deslocamento permanente e repetido de células que, da camada basal atingem, gradualmente, a superfície da epiderme, se desprendendo já mortas (AZULAY & AZULAY, 1997; LEONARDI & CAMPOS, 1997). Acima da camada basal encontra-se a espinhosa, formada por várias fileiras de células sendo as mais profundas poliédricas e as superficiais mais achatadas. As células dessa camada encontram-se coesas entre si pelos desmossomas (RIBEIRO, 2006).

A camada granulosa situa-se entre a camada córnea e a espinhosa, constituída por células achatadas com abundantes grânulos querato-hialínicos (AZULAY & AZULAY, 1997).

A porção menos permeável da epiderme é a mais superficial, conhecida como estrato córneo (EC), onde as células são mais queratinizadas e o teor de lipídios é mais elevado (LEONARDI & CAMPOS, 1997). Exerce funções de proteção contra agressões físicas, químicas e biológicas.

O espaço entre as células do EC é preenchido com lipídios. Os lipídios intercelulares são os responsáveis pela impermeabilidade à água do EC. É possível observar na barreira da pele dois componentes: o componente hidrofílico, a queratina e o componente hidrofóbico, os lipídios. Elias descreveu a estrutura do EC como “parede de tijolos”. Os corneócitos repletos de queratina seriam os tijolos hidrofílicos, enquanto os lipídios intercelulares seriam o cimento hidrofóbico. (ELIAS, 1991).

A maior classe de lipídios no EC são as ceramidas, seguido pelo colesterol e os ácidos graxos livres. O comprimento da cadeia acila nas ceramidas varia entre 16 e 33 carbonos,

enquanto que o tamanho da cadeia carbônica para os ácidos graxos livres varia de 22 a 24 carbonos. Existem oito classes de ceramidas presentes no EC humano que diferem cada uma pela arquitetura do grupo cabeça do lipídio e o tamanho da cadeia de hidrocarbonetos (BOUWSTRA & HONEYWELL-NGUYEN, 2002).

Durante a passagem da camada basal para o estrato córneo, os corneócitos sintetizam grande número de proteínas e lipídios. O ciclo de queratinização, ou corneificação, consiste nessa transformação das células epiteliais em células córneas mortas. Nesse processo, há a formação da queratina (proteína insolúvel produzida pela epiderme), com progressiva desidratação celular, com decomposição gradual do citoplasma e do núcleo (LEONARDI & CAMPOS, 1997).

A síntese de melanina, pigmento de cor marrom-escuro, ocorre no interior dos melanócitos, pelos melanosomas e a enzima tirosinase tem importante participação nesse processo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995). A melanina é capaz de absorver a radiação na faixa do visível e do UV, sendo sua função proteger a pele por meio de um bloqueio químico. O grau de fotoproteção para a epiderme varia em função da espessura e do grau de pigmentação da pele. Essa é a razão pela qual a queimadura tende a ser severa na face, por exemplo, onde a pele é mais fina, e o fotoenvelhecimento é mais proeminente em indivíduos com a pele fototipo I e fototipo II, a qual queima facilmente e o bronzeamento é mínimo (KULLAVANIJAYA & LIM, 2005; RIBEIRO, 2006).

O isômero trans do ácido urocânico (histidina deaminada) é a substância naturalmente encontrada no EC e é um dos muitos alvos potenciais para a pele irradiada por UV, a partir da qual respostas imunomodulatórias podem ser geradas. A radiação UV na pele resulta na formação do isômero cis e essa última molécula é por ela mesma imunomoduladora, em contraste com o isômero trans. Outras hipóteses afirmam que a formação do isômero cis do ácido urocânico no EC da pele irradiada por UV não é por ela mesma suficiente para induzir a

imunossupressão. Uma dose de 5 kJ/ m² de radiação UV é suficiente para induzir a isomerização do ácido urocânico para mais de 50% do isômero cis na pele irradiada, mas isso é insuficiente para promover a imunossupressão (FINLAY-JONES & HART, 1998).

1.2.2 Derme

A derme consiste em um tecido resistente e elástico que proporciona resistência física ao corpo frente as agressões mecânicas e fornece nutrientes à epiderme (RIBEIRO, 2006).

É uma camada com estruturas próprias, sendo constituída de substância fundamental (gel composto principalmente por mucopolissacarídeos ácidos), fibras, vasos e nervos, além dos folículos polissebáceos e das glândulas sudoríparas. As células da derme são representadas por células mesenquimais primitivas, fibroblastos, histiócitos e mastócitos (AZULAY & AZULAY, 1997).

As fibras colágenas representam 70% da derme, sendo detectados pelo menos sete tipos de colágeno. Há ainda, as fibras reticulares e elásticas, sendo estas últimas presentes em pequeno número e mais finas (AZULAY & AZULAY, 1997).

1.2.3 Hipoderme

É a camada mais profunda da pele, constituída de células adiposas delimitadas por septos de colágeno com vasos sanguíneos. As células adiposas são arredondadas e grandes, das quais os lipídios constituintes são fundamentalmente triglicerídeos, mas encontram-se também colesterol, vitaminas e água. Além de ser um depósito de calorías, apresenta a função de proteger o organismo de traumas e da perda de calor (AZULAY & AZULAY, 1997).

1.3 FOTOPROTETORES

A estrutura química dos filtros solares permite que absorvam os raios UV nocivos ao ser humano, ou seja, a radiação com alta energia, convertendo-a numa radiação inócua com baixa energia. Em outras palavras, a radiação UV excita a molécula do filtro solar que entra em um estado de ressonância e, em seguida, volta a sua forma original liberando a energia absorvida em um comprimento de onda maior e menos energético, na faixa do visível ou do infravermelho (WOLF, TÜZÜN & TÜZÜN, 2001; FILHO, SENA & PIRES, 2003; RIBEIRO, 2006).

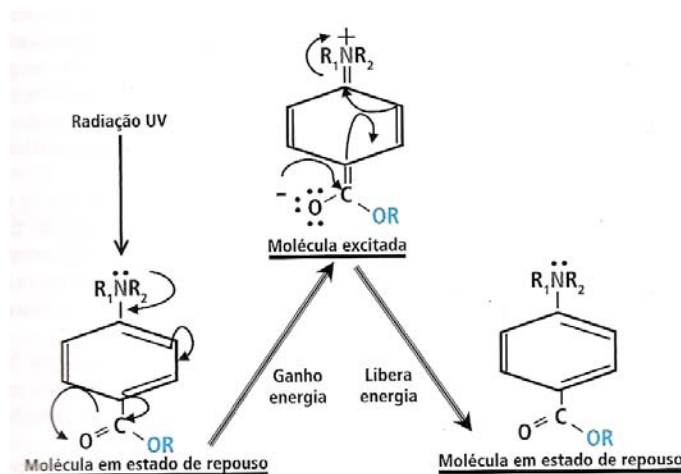


FIGURA 3: Representação esquemática do mecanismo de ação de filtros solares (RIBEIRO, 2006).

Os filtros solares apresentam uma similaridade molecular, já que são compostos aromáticos dissustituídos que possuem um grupamento carbonila, cetona ou éster e um substituinte com par de elétrons livres (amina ou metoxila) doadores de elétrons, usualmente em posição orto ou para ao grupamento carboxila (FILHO, SENA & PIRES, 2003).

Os filtros orgânicos são agentes que promovem uma atenuação da transmissão da energia solar para a pele por serem capazes de absorver a radiação UV, evitando assim seu

efeito nocivo (IANNUCCELLI *et al.*, 2006). As classes que mais se destacam na indústria cosmética e farmacêutica são as benzofenonas, os cinamatos e os dibenzoilmetanos.

Os filtros inorgânicos consistem de micropartículas minerais, tais como, o óxido de zinco e o dióxido de titânio, os quais são considerados substâncias biologicamente inertes e não tóxicas. Os filtros inorgânicos quando suspensos em uma formulação cosmética apresentam a propriedade de refletir ou dispersar a luz do sol. Devido ao fato dessas partículas não serem capazes de penetrarem na pele, foi alegado que esses filtros deveriam ser mais seguros que os filtros orgânicos. Entretanto, não há nenhuma evidência de que os filtros inorgânicos são mais seguros ou ofereçam uma proteção superior contra a radiação UV quando comparado aos filtros orgânicos (NOHYNEK & SCHAEFER, 2001). As vantagens desses compostos são: o baixo potencial fotoalergênico, o amplo espectro de proteção, a fotoestabilidade e a aplicabilidade em adultos e crianças (PETRAZZUOLI, 2000).

O primeiro filtro solar comercializado foi o ácido para-aminobenzóico (PABA), patenteado em 1940. Seus derivados se tornaram disponíveis somente nos anos 60 e 70 (PETRAZZUOLI, 2000). Com o aumento da demanda de fotoprotetores que apresentassem um menor potencial alergênico e um perfil menos irritante, os cinamatos aumentaram a prevalência, sendo, hoje, o p-metoxicinamato de octila, o filtro mais comumente utilizado. Vários estudos abordam os perigos da exposição à radiação UVA e seus efeitos deletérios, o que culmina com o desenvolvimento de uma variedade de filtros químicos dispondo de uma boa proteção, estendendo inclusive para a faixa da radiação UVA. Os derivados do dibenzoilmetano, os antranilatos e os derivados triazoles têm sido recentemente adicionados na classe das substâncias químicas que absorvem na faixa UVA (MURPHY, 2002).

Um filtro solar deve proteger contra a radiação UVB, responsável pelo eritema e queimadura, como também deve defender contra a radiação UVA. Isto porque esta última causa o efeito bronzeante, participa da fotodestruição crônica da pele, do fotoenvelhecimento,

das fotodermatoses agudas e crônicas e da imunossupressão. Uma proteção completa sobre toda a faixa do UVA e UVB é raramente possível com um único filtro UV. Portanto, as formulações modernas usam a combinação de vários filtros orgânicos e inorgânicos a fim de cobrir todo o espectro do UV (NOHYNEK & SCHAEFER, 2001).

1.3.1 Propriedades dos fotoprotetores

Uma formulação contendo filtros solares deve ser termoestável e fotoestável, resistente à água, não tóxica e de fácil incorporação (NOHYNEK & SCHAEFER, 2001). Deve ainda apresentar um amplo espectro de proteção ao longo de toda a faixa do UV (280-400 nm) (WOLF, TÜZÜN & TÜZÜN, 2001). No entanto, a eficácia de um fotoprotetor não depende apenas dos tipos e quantidades de filtros solares envolvidos, mas das características do produto final, sendo de importância decisiva a escolha adequada de todos os componentes da formulação, incluindo veículos, emulsionantes, coadjuvantes, entre outros (AZZELLINI, 1995).

Após a aplicação do protetor solar na pele, fatores ligados ao próprio usuário, às condições de uso e ao ambiente irão alterar o nível de proteção. Destes, um dos mais importantes a ser considerado é a resistência à água.

Os filtros hidrossolúveis perdem sua atividade na formulação ou são eliminados com a água. Com o intuito de evitar esta perda, os fabricantes de cosméticos procuraram desenvolver protetores solares que possuam maior resistência à água, quando submetidos a condições como a pele imersa (MASSON & SCOTTI, 2003). Para conseguir a resistência à água devem ser adicionados às formulações agentes filmógenos que fixam os filtros na pele, impedindo a sua retirada ao entrarem em contato com a água.

Hoje, no mercado, as formulações fotoprotetoras contêm resinas hidrorrepelentes ou polímeros. Os silicones apresentam propriedades lubrificantes, protetoras, filmógenas e

hidrofóbicas, o que tem permitido sua utilização nas preparações fotoprotetoras, conferindo à formulação maior insolubilidade em água e aumento no tempo de permanência do produto na pele (AZZELLINI, 1995). O cetil dimeticone, estearil dimeticone, polidimetilsiloxano de alta viscosidade, elastômero de silicone, alquil meticone entre outros, dependendo das concentrações usadas, contribuem para este efeito (RIBEIRO, 2006).

Os formadores de filme que conferem resistência à água são os copolímeros de polivinilpirrolidona (PVP) eicosano, hexadeceno e tricotanol. Como filmógeno pode-se usar, ainda, os perfluoropoliéteres, que são totalmente insolúveis em água (RIBEIRO, 2006).

Um fator relevante na avaliação da efetividade fotoprotetora de um filtro solar diz respeito a sua absorvidade molar ou coeficiente de extinção. O valor da absorvidade molar é a medida da interação da radiação eletromagnética com a substância em um determinado solvente. Valores de coeficiente de extinção que excedem 20.000 são considerados efetivos e algumas substâncias apresentam esse alto coeficiente, tais como butilmetoxidibenzoil metano (BMDM) (31.000), octildimetil PABA (28.400) e etilhexil-p-metoxicinamato (24.200) (WOLF, TÜZÜN & TÜZÜN, 2001).

A fotoestabilidade refere-se à capacidade da molécula de permanecer intacta sob a radiação. Vários filtros orgânicos sofrem fotólise significativa e, portanto, perdem o seu valor protetor quando expostos à radiação solar (WOLF, TÜZÜN & TÜZÜN, 2001). O BMDM, os cinamatos e os derivados salicilatos são considerados filtros fotoestáveis (PETRAZZUOLI, 2000).

Diferentes sistemas são estudados com o intuito de melhorar a fotoestabilidade das preparações solares incluindo a combinação de moléculas fotoprotetoras, o uso de ciclodextrinas, microsferas poliméricas e nanosferas (IANNUCCELLI *et al.*, 2006). Pode-se citar como exemplo a combinação da oxibenzona e da avobenzona com o octocrileno, o

metilbenzilideno cânfora, óxido de zinco e/ ou o titânio micronizado a fim de reduzir a fotodegradação (KULLAVANIJAYA & LIM, 2005).

A substantividade é um outro fator que contribui para a eficácia de um filtro solar. Reflete a capacidade de um composto aderir ou combinar com um substrato queratinizado e, com isso, ser capaz de manter seu fator de proteção solar (FPS) original sob as condições de uso (WOLF, TÜZÜN & TÜZÜN, 2001).

Algumas agências estão envolvidas na regulação dos filtros solares, incluindo The Standards Association of Austrália, the U.S. Food and Drug Administration (FDA) e o Comitê de Liaison des Associations Europeenes de l'Industrie de la Parfumerie, des Produits Cosmetiques et de Toilette (COLIPA). Em alguns países, como nos Estados Unidos, os filtros solares são considerados medicamentos – OTC (over the counter), enquanto que em outros países, como o Brasil, são classificados como cosméticos (ROSEN, 2003).

1.3.2 Eficácia dos Fotoprotetores

O controle analítico dos cosméticos contendo filtros solares é necessário visto que o conteúdo de filtros UV no produto final está relacionado a sua eficácia de proteção solar, que é usualmente rotulada pelo FPS (SALVADOR & CHISVERT, 2005).

O FPS mede o grau de proteção na pele que um produto oferece contra os raios UV, indicando quanto tempo uma pessoa pode ficar exposta ao sol usando uma formulação com filtro solar sem desenvolver eritema (RIBEIRO, 2006). O FPS determinado *in vivo* representa a relação entre a dose UV mínima requerida para produzir o eritema (DME) na pele protegida (após a aplicação de 2 mg/cm² do produto) e a dose UV mínima requerida para produzir o mesmo eritema na pele não protegida (RUVOLO, 1997). Desta forma, é possível afirmar que quanto maior o valor do FPS utilizado, maior será o tempo de resistência da pele exposta à radiação UV ao surgimento do eritema solar (AZZELLINI, 1995).

Tendo em vista uma maior rapidez e uma forma de se poder controlar a qualidade das preparações farmacêuticas contendo filtros solares, encontra-se na literatura o método *in vitro* que tem como princípio a espectrofotometria (MANSUR *et al.*, 1986). Este método utiliza a equação matemática desenvolvida por Mansur e colaboradores que verifica o comportamento da preparação fotoprotetora na faixa de 290 a 320nm. Estudos posteriores avaliaram uma boa correlação entre os métodos *in vivo* e *in vitro* na determinação do FPS em loções fotoprotetoras (SANTOS *et al.*, 1998).

Entretanto, o método *in vivo* não é capaz de mensurar outros efeitos induzidos pela radiação UV tais como os danos ao DNA, o fotoenvelhecimento, a imunossupressão e, até mesmo, a indução de melanoma, efeitos observados na exposição à radiação UVA (PETRAZZUOLI, 2000). Ademais, esse método preconizado pelas agências regulatórias internacionais tem como fundamento a resposta eritematosa, que é um efeito observado na exposição da pele à radiação UVB, não sendo indicado para a avaliação de filtros que absorvem na região UVA.

As recentes descobertas de lesões causadas pela radiação UVA acarretam em um crescente número de trabalhos que disponibilizam métodos capazes de determinar o FPS frente a esta radiação. Atualmente, os métodos *in vivo* mais utilizados são baseados na medida do eritema ou da pigmentação imediata ou permanente da pele induzida pela radiação UVA (KAIDBEY & BARNES, 1991; MOYAL, CHARDON & KOLLIAS, 2000), enquanto que os métodos *in vitro* consistem em determinar o espectro de absorção de uma camada constante do produto aplicada sobre um substrato inerte, com auxílio de um espectrofotômetro com esfera de reflectância (DIFFEY *et al.*, 2000).

No Brasil, a regulamentação RDC nº 237 de 2002 define normas para a avaliação de FPS, mas não regulamenta um protocolo específico para a avaliação de produtos e elaboração

de rotulagem específica para a proteção UVA, referindo-se apenas que deve ser realizada através de metodologias reconhecidas e devidamente validadas (BRASIL, 2002).

1.3.3 Absorção Percutânea dos Filtros Solares

A absorção de uma substância pela pele, que penetra até as estruturas mais profundas, estando inclusive na corrente sanguínea, é denominada absorção percutânea (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000). A permeação na pele, de acordo com a **FIGURA 4** pode ocorrer por difusão através de penetração transcelular, intercelular e a transanexal por meio dos folículos pilosos, glândulas sebáceas, sudoríparas e dispositivo pilosebáceo.

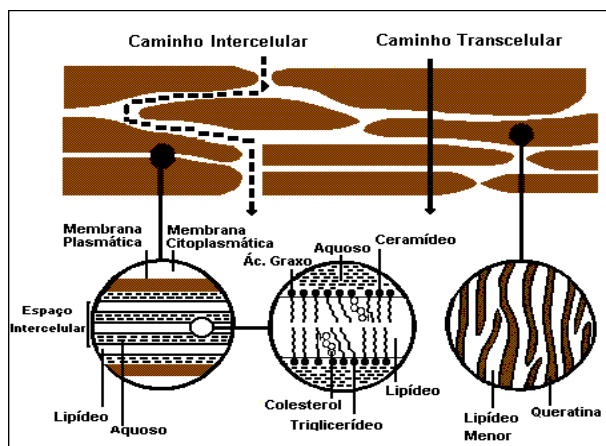


FIGURA 4: Esquema demonstrativo das rotas de penetração pela pele (BARRY, 1987).

O EC sendo um tecido queratinizado comporta-se como uma membrana artificial semipermeável e as moléculas penetram por difusão passiva (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000). Assim, a penetração através do EC depende de muitos parâmetros, tais como o peso molecular, a lipofilicidade, a polaridade, a capacidade de formar ponte de hidrogênio, a solubilidade, e, para moléculas ácidas ou básicas, o valor de pKa (NOHYNEK &

SCHAEFER, 2001). Moléculas que apresentam uma lipofilicidade moderada são vantajosas visto que promovem a partição do ativo a partir da formulação para o interior da pele, enquanto que moléculas muito lipofílicas não são transferidas com a mesma facilidade da camada lipídica do estrato córneo para os espaços aquosos da epiderme viável e, conseqüentemente, não apresentam uma eficiente permeação percutânea (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2001).

Não só as propriedades do EC são de grande importância no controle da penetração de compostos ativos na pele, como também o veículo empregado. Estudos recentes apontam a importância da escolha do veículo para a incorporação de filtros solares, não só com o intuito de aprimorar a eficácia farmacológica, mas também reduzir os riscos tóxicos potenciais associados com a penetração cutânea (RAMÓN *et al.*, 2005). A natureza do veículo pode promover modificação nas propriedades do EC, uma vez que o mesmo pode ocluir a pele, aumentando a hidratação do EC e a permeação do ativo veiculado. Além disso, o veículo pode conter alguns agentes específicos que interagem com o EC, alterando a sua resistência natural, retendo ou liberando a substância ativa para a pele (LEONARDI & CAMPOS, 1997). Vários agentes já foram descritos por aumentar a penetração na pele incluindo tensoativos, azona, dimetilsulfóxido, dimetilacetamida, dimetilformamida, álcool, acetona, propilenoglicol e polietilenoglicol (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000).

Um filtro solar deve permanecer onde ele é mais efetivo, ou seja, na superfície da pele. Idealmente, um filtro deve impregnar o EC, criar uma barreira contra a radiação UV e resistir à absorção pela pele mantendo sua eficácia nas camadas mais externas da pele (NOHYNEK & SCHAEFER, 2001; RAMÓN *et al.*, 2005).

A absorção sistêmica é um fator a ser considerado nos filtros solares, já que estudos *in vitro* e *in vivo* publicados mostraram que certos filtros são absorvidos através da pele humana após aplicação tópica. Janjua e colaboradores (2004) evidenciaram que quando aplicado

2mg/cm² de uma formulação creme contendo três filtros solares, p-metoxicinamato de octila, benzofenona-3 e 3-(4-metilbenzilideno) cânfora a 10% (p/p) cada, na pele de humanos, os três compostos eram absorvidos pela pele e excretados na urina.

Desse modo, é necessário o desenvolvimento de novos sistemas de liberação que atuem permitindo a retenção dos filtros solares nas camadas mais externas da pele, a fim de alcançar o efeito máximo de proteção e minimizar os efeitos toxicológicos. Lipossomas, microesferas, lipoesferas, nanocápsulas e inclusão em complexos são os sistemas mais usados para controlar a liberação de filtros solares da formulação (SCALIA, VILLANI & CASOLARI, 1999; ALVAREZ-ROMAN *et al.*, 2001).

Yener e colaboradores (2003) demonstraram que as microesferas podem ser sugeridas como carreadores para o p-metoxicinamato de octila por diminuir a sua taxa de liberação e penetração, além de aumentar a fotoestabilidade desta substância

Segundo Wissing e Muller (2001), as nanopartículas sólidas-lipídicas (NSL) formam um filme após aplicação na pele. A evaporação da água conduz à fusão das partículas e à formação de um filme, fixando as moléculas do filtro solar no filme e mantendo o filtro por mais tempo na superfície da pele, local onde deve atuar. Experimentos de liberação e permeação *in vitro* e *in vivo* mostraram que a penetração de oxibenzona é significativamente diminuída ao incorporá-la em NSL quando comparado com uma emulsão (WISSING & MÜLLER, 2002).

1.3.3.1 Estudos de liberação e permeação cutânea *in vitro*

Na literatura, vários métodos estão sendo descritos para o estudo e quantificação da penetração cutânea. A dinâmica da liberação da substância da formulação pode ser avaliada por meio de métodos *in vitro*, sendo hoje o modelo mais utilizado a célula de difusão de Franz. Este modelo consiste de dois compartimentos, doador e receptor, separados por uma membrana (sintética ou natural) e dispostos verticalmente. A formulação é colocada no compartimento doador e ocluída, caracterizando a condição de dose infinita. O compartimento inferior possui uma saída lateral para coleta do meio receptor, em tempos adequados, suficientes para determinação da taxa de liberação do fármaco da formulação (FRIEND, 1992; DIEMBECK *et al.*, 1999; VARVARESOU, 2006).

Para os estudos de liberação *in vitro* é preconizado o uso de membranas sintéticas como a polissulfona, acetato/nitrato de celulose e politetrafluoretileno. Elas servem como um suporte, separando o produto de aplicação tópica do meio receptor. Devem ser quimicamente inertes nas condições experimentais, livremente permeáveis aos fármacos e não funcionarem como um fator limitante no processo de liberação (SHAH, ELKINS & WILLIAMS, 1999).

O estudo da permeação cutânea *in vitro* é realizado pelo uso de membranas naturais de fontes animais ou humanas, sendo que o tecido humano seria a membrana mais apropriada para utilização nesses estudos. No entanto, o tecido humano apresenta problemas como baixa disponibilidade, questões éticas e legais, variações quanto ao sexo, idade e região anatômica. Desse modo, o uso de pele de animais torna-se indicado, visto que são mais fáceis de serem obtidas e a idade e o sexo podem ser controlados, sendo a pele suína considerada a mais semelhante à pele humana anatômica e histologicamente (HAIGH & SMITH, 1994; GUPTA, ZATZ & REREK, 1999).

O fármaco deve ser suficientemente solúvel no meio receptor com o objetivo de manter a condição *sink*, que preconiza a utilização de um volume não inferior a três vezes o

necessário para formar uma solução saturada do fármaco. Isto se faz necessário, visto que um excesso de meio permite que o fármaco se dissolva continuamente. A solução receptora é selecionada baseada na solubilidade do fármaco e, ainda, de tal forma que seja compatível com os métodos analíticos. Para fármacos hidrossolúveis podem ser utilizados como meio uma solução tampão ou salina, enquanto que para as moléculas lipofílicas, pode ser feita a adição de soro albumina ou outros solubilizantes apropriados tais como os tensoativos não iônicos, porém a integridade da membrana não deve ser afetada (DIEMBECK *et al.*, 1999). O uso de tensoativos pode resultar na formação de bolhas de ar, durante a agitação do meio, que interferem com o contato uniforme requerido entre o meio receptor e o suporte de membrana, devendo ser feito de forma criteriosa (SHAH, ELKINS & WILLIAMS, 1999). Além disso, o agente solubilizante não deve alterar as propriedades de permeabilidade inerentes à pele (FRIEND, 1992).

O controle da temperatura do meio receptor é importante durante o ensaio e esta deve ser mantida próxima às condições encontradas na pele *in vivo* (30 - 32°C). Os procedimentos analíticos quantitativos mais usados são a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (CG) (DIEMBECK *et al.*, 1999).

1.3.3.2 Estudos de permeação cutânea *in vivo*

Testes para avaliação da penetração e permeação de produtos de aplicação tópica realizados em humanos são os mais relevantes. Como todo teste envolvendo voluntários, esses estudos devem ser submetidos à avaliação ética para aprovação.

Para avaliar a concentração do ativo no EC *in vivo* pode ser utilizada a técnica de tape-stripping. Esta técnica consiste em avaliar a quantidade de ativo no EC após a aplicação das formulações em tempos pré-determinados. As formulações são aplicadas em áreas

determinadas da superfície da pele de voluntários sadios e a remoção ou coleta de EC desses voluntários é realizada por meio de fitas adesivas (SHAH, 2001; VARVARESOU, 2006).

Alguns estudos já foram realizados utilizando a técnica de tape-stripping com o objetivo de medir a quantidade de filtro solar remanescente no estrato córneo após aplicação das formulações contendo filtros solares na pele de voluntários (MARGINEANLAZAR *et al.*, 1997; COUTEAU *et al.*, 2001; RAMÓN *et al.*, 2005).

A principal diferença entre os métodos de penetração *in vivo* e *in vitro* é que os métodos *in vitro* revelam o potencial da substância para penetrar a pele, enquanto que os métodos *in vivo* indicam a real penetração, excreção e distribuição corporal (VARVARESOU, 2006).

1.3.4 Filtros solares em estudo

1.3.4.1 3-(4-metilbenzilideno) cânfora

O 3-(4-metilbenzilideno) cânfora (3,4-MBC) pertence ao grupo dos derivados da cânfora, sendo um filtro solar lipofílico com coeficiente de partilha ($\log P_{o/a}$) de 5,8 (SASSON, 2006). É um composto sólido, cristalino, cor branca e peso molecular de 254,37 (**FIGURA 5**). Absorve na região UVB, no comprimento de onda máximo de 300 nm em etanol e apresenta uma alta absorvidade molar.

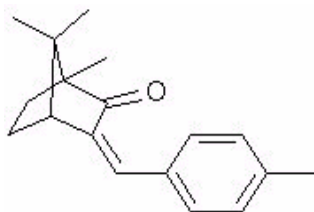


FIGURA 5: Estrutura molecular do 3,4-MBC.

Os compostos derivados do metilbenzilideno cânfora dispõem de uma fraca, mas rápida modificação de absorbância, até que o equilíbrio fotoestacionário seja alcançado (isomerização). Estes compostos apresentam excelente fotoestabilidade, resultante da sua capacidade de isomerizar reversivelmente, tanto em solução, quanto em emulsão espalhada sobre a pele (DEFLANDRE & LANG, 1988). A isomerização é um importante mecanismo para dissipar a energia do estado excitado e quando é reversível, sempre representa uma dissipação de energia que contribui para a fotoestabilidade. Também são capazes de desativar sensibilizadores através da transferência de energia, levando à isomerização do aceptor, podendo inibir fotoreações induzidas por sensibilizadores de nível tripleto de energia maior que 197 kJ (DEFLANDRE & LANG, 1988).

Os derivados da cânfora são aprovados para serem usados na União Européia, assim como no Brasil, entretanto, não estão listados na monografia do FDA de 1999 (KULLAVANIJAYA & LIM, 2005). No Brasil, de acordo com a RDC nº 47 de 2006, a concentração máxima permitida para o 3,4-MBC é de 4% (BRASIL, 2006).

É descrito na literatura que a combinação de metilbenzilideno cânfora ou octocrileno promove a estabilização da avobenzona (CHATELAIN & GABARD, 2001). Cabe ainda lembrar que o metilbenzilideno cânfora é descrito como um filtro que causa média sobrecarga sobre a pele, ou seja, deve ser combinado com outros filtros a fim de serem obtidas formulações com baixas concentrações de filtros e um alto FPS (BARTH *et al.*, 2000).

Vários estudos descrevem que o 3,4-MBC apresenta ação estrogênica que é mediada principalmente por receptores estrogênicos (ER α e ER β). O 3,4-MBC é capaz de interagir diretamente com ER α e de forma mais prolongada com ER β e provocar, portanto, fracos efeitos estrogênicos *in vitro* (MUELLER *et al.*, 2003; SCHLUMPF *et al.*, 2004). Scidlová-Wuttke e colaboradores (2006) compararam os efeitos promovidos por dois filtros orgânicos, 3,4-MBC e o p-metoxicinamato de octila, com os efeitos do estradiol, em alguns órgãos como

a vagina, o útero e os ossos. Resultados mostraram um pequeno efeito estrogênico do p-metoxicinamato de octila e do 3,4-MBC no útero e na vagina após três meses de tratamento de ratos ovariectomizados quando comparados com o efeito do estradiol, enquanto que nos ossos, o 3,4-MBC apresenta um efeito antiosteoporótico igual ao do estradiol, diferentemente do p-metoxicinamato de octila que não apresenta tal efeito.

1.3.4.2 Butil metóxi-dibenzoilmetano

O butil metóxi-dibenzoilmetano (BMDM) também conhecido como avobenzona é um pó cristalino ligeiramente castanho com odor aromático fraco, peso molecular 310 e característica lipofílica com coeficiente de partilha ($\log P_{o/a}$) 4,5 (SASSON, 2006). Este filtro fornece uma excelente proteção contra a radiação UVA, sendo muito eficiente e amplamente usado, aprovado por agências regulatórias da Europa, Austrália, Estados Unidos e Japão (SIMEONI, SCALIA & BENSON, 2004). Em nosso país, de acordo com a RDC nº 47 de 2006, esse composto é permitido ser utilizado até a concentração de 5% (BRASIL, 2006).

O BMDM é um composto beta dicarbonil que apresenta um equilíbrio ceto-enólico, em que o enol com uma ligação hidrogênio intramolecular é a conformação preferencial (**FIGURA 6**) (BILOTI *et al.*, 1999). A forma enólica exibe uma forte banda de absorção na região UVA por volta de 355 nm, enquanto que a forma cetônica absorve por volta de 260 nm (CANTRELL & MCGARVEY, 2001).

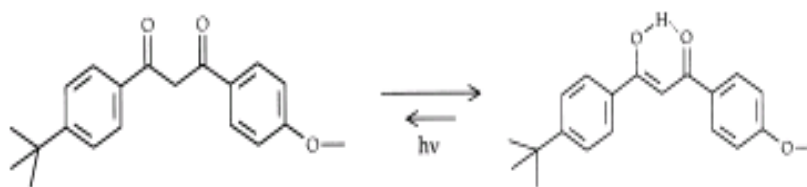


FIGURA 6. Equilíbrio ceto-enólico para BMDM (BILOTI *et al.*, 1999).

O BMDM é utilizado com outros filtros para aumentar a cobertura da formulação na faixa do UVA, assim como o FPS de formulações. Entretanto, este filtro, dependendo da formulação e associação apresenta fotoinstabilidade, especialmente se associado ao p-metoxicinamato de octila. A estabilidade do BMDM em formulações cosméticas, pode ser aumentada associando-se os filtros metilbenzilideno cânfora, octocrileno, ou, ainda, adicionando-se o estabilizante dietilhexil-2,6-naftalato (RIBEIRO, 2006).

A fotoestabilidade do BMDM varia em função da natureza do solvente como também da presença de outros solutos. Schwack e Rudolph (1995) investigaram a cinética de fotodegradação de soluções de BMDM em vários solventes, tais como, ciclohexano, isoctano, isopropanol e metanol sob irradiação solar simulada durante um período de oito horas. O progresso da fotodegradação foi monitorado e os produtos formados foram separados por CLAE e caracterizados usando CG acoplada a um espectrômetro de massas. Em solventes polares, o BMDM mostrou grande fotoestabilidade enquanto que em solventes apolares a fotodegradação cresceu exponencialmente com o aumento do tempo de irradiação, sendo os principais fotoprodutos encontrados o ácido 4-terc-butil-benzóico e o ácido 4-metóxi-benzóico. Uma explicação para a fotoestabilidade em solventes polares é a capacidade do dibenzoilmetano gerar radicais benzoila e fenacila sob luz UVA que podem ser estabilizados por transferência de hidrogênios a partir de compostos doadores de hidrogênio, como é o caso desses solventes.

Estudos mais recentes sugerem que os radicais benzoila e fenacila produzidos pelo BMDM sob irradiação UV podem atacar o DNA diretamente, ou ainda, destruir o DNA *in vitro* via combinação desses radicais com o oxigênio molecular formando radicais peroxila (DAMIANI *et al.*, 1998). O efeito mais crítico da fotoinstabilidade deste composto é a formação de produtos altamente reativos que podem entrar em contato com a epiderme e a

derme seguido da penetração percutânea da substância (SIMEONI, SCALIA & BENSON, 2004).

Com o intuito de diminuir o grau de decomposição e a formação de radicais livres observados quando BMDM é exposto à luz solar simulada foi realizada a complexação deste com a hidroxipropil β -ciclodextrina (SCALIA *et al.*, 1998; 2002). Outro sistema carreador descrito na literatura para promover a estabilidade fotoquímica deste filtro solar foi a lipoesfera, sendo um representante adequado para a redução da fotodecomposição do mesmo (IANNUCCELLI *et al.*, 2006).

Simeoni e colaboradores (2004) investigaram a permeação *in vitro* de BMDM livre e complexado com hidroxipropil e sulfabutiléter β -ciclodextrina. O estudo de permeação foi realizado em pele de tecido humano da região abdominal e da mama de mulheres em células de Franz. A quantidade de filtro presente no estrato córneo, epiderme viável, derme e fluido receptor após 6 horas foi determinada por CLAE. A complexação dessa substância com sulfabutiléter β -ciclodextrina foi a que apresentou melhores resultados, visto que houve uma redução marcante da concentração desse filtro nas frações epidérmicas quando comparado com o BMDM livre e em hidroxipropil β -ciclodextrina.

Logo, limitar o contato direto do filtro solar e seus produtos reativos com tecidos viáveis da pele pelo uso de sistemas de liberação é uma forma de minimizar os efeitos tóxicos.

1.4 LIPOSSOMAS

1.4.1 Estrutura

Lipossomas ou vesículas lipídicas são partículas coloidais que podem ser preparadas com moléculas de fosfolipídios derivados de fontes naturais extraídas e purificadas ou de síntese química (LIAN & HO, 2001) e podem conter outros constituintes da bicamada como o colesterol e os polímeros hidrofílicos (SHARMA & SHARMA, 1997). Como uma célula biológica, o lipossoma é composto por uma fina, porém durável membrana que circunda um compartimento aquoso, protegendo-o do meio externo, conforme ilustrado na **FIGURA 7** (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000). Os fármacos lipofílicos podem ser incorporados na bicamada lipídica, enquanto que os fármacos hidrofílicos são solubilizados no interior do espaço aquoso (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000; MEHNERT & MADER, 2001).

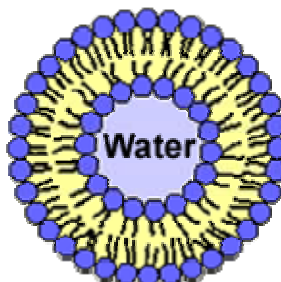


FIGURA 7: Ilustração esquemática da estrutura de um lipossoma.

Os lipossomas foram investigados durante muitos anos como sistemas carreadores de vários ativos farmacológicos para uso parenteral, porém há aproximadamente uma década, eles foram considerados para sistemas de liberação de uso tópico, incluindo tratamento oftalmológico e dérmico (SHARMA & SHARMA, 1997; GLAVAS-DODOV *et al.*, 2002). Os lipossomas têm sido amplamente utilizados como veículo em fórmulas dermocosméticas, em razão de que sua estrutura proporciona a encapsulação de substâncias ativas hidrofílicas e lipofílicas, visto serem constituídos por compostos anfifílicos.

A maior vantagem da formulação lipossômica tópica é o potencial que apresenta para reduzir os efeitos colaterais e as incompatibilidades que podem resultar da alta absorção sistêmica de substâncias indesejáveis. Os lipossomas acumulam a substância ativa no sítio de administração, como resultado da alta afinidade que apresentam com o estrato córneo e, ainda, incorporam uma variedade de substâncias ativas e lipofílicas na pele (SUZUKI & SAKON, 1990). Além disso, como são utilizados lipídios de fontes naturais para formar a membrana lipossômica, os lipossomas são considerados biocompatíveis e biodegradáveis (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000). Estas vesículas promovem uma regeneração da pele quando aplicadas topicamente, já que reabastecem a pele de moléculas lipídicas e suas misturas (BETZ *et al.*, 2005).

Os lipossomas podem ser classificados com base na sua composição, tamanho e número de bicamadas lipídicas (lamelas) (NEW, 1997).

Os fosfolipídios são componentes essenciais na composição dos lipossomas e apresentam como uma das principais vantagens a reduzida toxicidade. A maioria das formulações com lipossomas aprovadas para o uso humano contém fosfatidilcolina (carga neutra), com cadeias de ácidos graxos de vários tamanhos e graus de saturação, como principal estrutura de membrana (NEW, 1997). Além da fosfatidilcolina, outros fosfolipídios de carga neutra também são utilizados, como a esfingomielina e a fosfatidiletanolamina (GÓMEZ-HENS & FERNÁNDEZ-ROMERO, 2005). Existem no mercado uma variedade de fosfolipídios sintéticos que podem ser usados na preparação dos lipossomas (VEMURI & RHODES, 1995).

Os esteróis, principalmente o colesterol, são componentes importantes na maioria das membranas naturais e suas incorporações nas membranas lipossomais causam modificações marcantes em suas propriedades. A presença e a orientação das moléculas de colesterol aumentam a rigidez, reduzem a permeabilidade de moléculas solúveis na água através da

membrana e, dessa forma, melhoram a estabilidade da membrana (VEMURI & RHODES, 1995; LIAN & HO, 2001; GÓMEZ-HENS & FERNÁNDEZ-ROMERO, 2005; ELSAYED *et al.*, 2007). A quantidade ótima de colesterol citada na literatura aparece entre 30% a 50% da massa da membrana do lipossoma (YAROSH, 2001).

O tamanho dos lipossomas pode variar desde vesículas muito pequenas (0,025 μm) até vesículas grandes. Ademais, os lipossomas podem possuir membranas simples ou múltiplas bicamadas. Baseado no tamanho e no número de bicamadas, os lipossomas podem ser classificados em uma das três categorias: vesículas multilamelares (VML), vesículas unilamelares grandes (VUG) e vesículas unilamelares pequenas (VUP) (SHARMA & SHARMA, 1997).

Em geral, os lipossomas formam espontaneamente vesículas multilamelares, e condições especiais do processo ou passos pós-processo são requeridos a fim de produzir lipossomas unilamelares (YAROSH, 2001).

As VMLs formam múltiplas bicamadas, apresentam maior capacidade de encapsulação de fármacos lipofílicos, sendo mecanicamente mais estáveis sobre longo tempo de armazenamento, além de serem facilmente preparadas. As VUGs formam uma bicamada única com uma elevada razão volume aquoso e taxa lipídica, sendo usadas principalmente para incorporar fármacos hidrofílicos. Por fim, as VUPs formam uma bicamada única, assim como as VUGs, apresentam tamanho homogêneo, vesículas pequenas, sendo consideradas termodinamicamente instáveis, susceptíveis de agregação e fusão (SHARMA & SHARMA, 1997). Na **FIGURA 8** pode-se observar uma representação esquemática comparativa dos vários tipos de lipossoma em função do tamanho e lamelaridade.

O tamanho das vesículas é um parâmetro crítico na determinação do tempo de meia-vida dos lipossomas. Tanto o tamanho como o número de bicamadas influenciam no conteúdo de encapsulação de fármaco nos lipossomas (SHARMA & SHARMA, 1997).

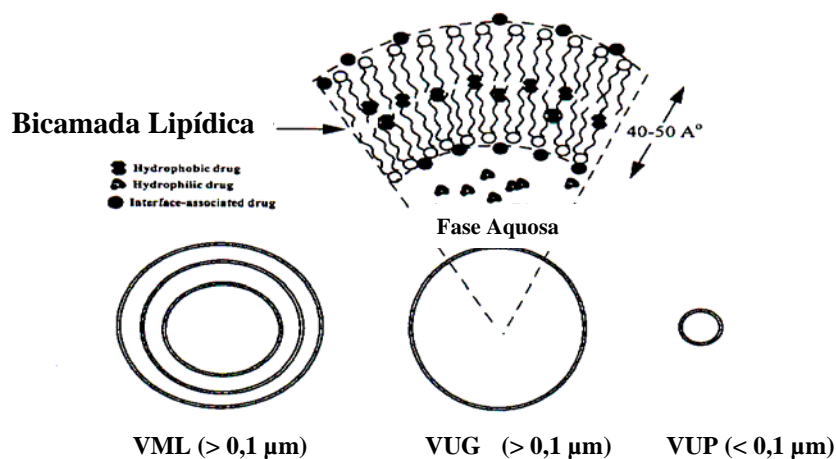


FIGURA 8: Tipos de lipossomas dependendo do tamanho e número de lamelas (Adaptado de SHARMA & SHARMA, 1997).

1.4.2 Métodos de Preparação

O tipo de lipossoma é, essencialmente, condicionado pelo seu método de preparação.

Embora os lipossomas possam ser formados espontaneamente quando os fosfolipídios são dispersos em um meio aquoso, por meio da hidratação dos lipídios, geralmente eles não apresentam estruturas termodinamicamente estáveis por este método, sendo, portanto, necessário uma energia externa proveniente da sonicação, extrusão ou homogenização para a sua produção (GÓMEZ-HENS & FERNÁNDEZ-ROMERO, 2005).

Para o preparo de VML, o procedimento de hidratação do filme lipídico é o mais utilizado (ELSAYED *et al.*, 2007). Após a escolha da composição lipídica e da solução aquosa a utilizar, usualmente uma solução tampão, cada lipídio deverá ser dissolvido em um solvente ou mistura de solventes orgânicos. O solvente orgânico é evaporado de modo a formar um fino filme lipídico. De modo a conseguir o desprendimento do lipídio das paredes do balão, deve-se promover agitação com cautela com o auxílio do tampão aquoso. No fim desta etapa, dispõe-se já de uma suspensão de VML (SANTOS & CASTANHO, 2002).

Geralmente, os lipossomas formados a partir desse método apresentam variações na distribuição dos tamanhos das vesículas e na lamelaridade. Logo, é necessário realizar a passagem por um filtro com membrana de policarbonato a fim de se obter lipossomas menores e com tamanhos mais uniformes (SHARMA & SHARMA, 1997). Segundo Olson e colaboradores (1979), a passagem por membranas de policarbonato é um processo fácil, reproduzível, conveniente, não induz a degradação do fosfolipídio, não introduz impurezas dentro das vesículas e pode dobrar a eficiência de encapsulação da preparação lipossômica.

Para a preparação do VUG vários métodos foram propostos como a injeção de solvente (éter ou etanol), fusão induzida por cálcio e técnicas de evaporação em fase reversa. O método de injeção de solvente consiste em uma injeção lenta de uma solução etanólica de lipídios em uma fase aquosa, formando, dessa forma, as vesículas unilamelares. Essa técnica permite a formação de lipossomas com uma distribuição de tamanho bem definida e alta eficiência de encapsulação, embora o etanol possa ficar parcialmente retido nos lipossomas, sendo indispensável o uso de diálise para a sua eliminação (GÓMEZ-HENS & FERNÁNDEZ-ROMERO, 2005). A outra técnica descrita, evaporação em fase reversa, consiste em preparar uma emulsão água em óleo de fosfolipídios e tampão em um excesso de fase orgânica, seguido de remoção da fase orgânica sob pressão reduzida. As duas fases (fosfolipídios e água) são emulsificadas por métodos mecânicos ou por sonicação, formando uma pasta de leve consistência que é descrita como uma suspensão de VUG. Por esta técnica é alcançada eficácia de incorporação de fármacos acima de 60-65% (VEMURI & RHODES, 1995).

Os VUPs podem ser preparados a partir dos VMLs ou por sonicação dos VUGs ou, ainda, por extrusão (passagem por um pequeno orifício sob alta pressão) (SHARMA & SHARMA, 1997).

1.4.3 Limitações no Desenvolvimento dos Lipossomas

Alguns problemas podem limitar a manufatura e o desenvolvimento dos lipossomas como a instabilidade, o método de esterilização, o controle do tamanho de partículas e a baixa encapsulação de fármacos.

Um dos principais problemas que limitam o avanço do uso de lipossomas é a instabilidade física e química. Os lipossomas tendem a fundir e crescer formando vesículas maiores, um estado termodinamicamente mais favorável, caracterizando a instabilidade física da formulação. Devido a isso, a aparência visual, tamanho médio e distribuição das vesículas são parâmetros importantes para serem controlados (VEMURI & RHODES, 1995).

A instabilidade química pode ser causada pela hidrólise do éster que geralmente forma liso-fosfatidilcolina, que é responsável por aumentar a permeabilidade dos lipossomas e/ou oxidação da cadeia acil insaturada dos lipídios (SHARMA & SHARMA, 1997). A oxidação pode ser minimizada pela proteção da preparação lipídica da luz, por adição de antioxidantes, como alfa-tocoferol, por adição de EDTA à formulação lipídica para remover os possíveis metais, ou, ainda, por obtenção do produto sob atmosfera de nitrogênio (VEMURI & RHODES, 1995).

A maioria dos problemas relacionados à falta de estabilidade podem ser revertidos por liofilização. Este método é um meio promissor para aumentar a estabilidade física e química, principalmente para fármacos que não são estáveis em fase aquosa, em que a transformação em uma forma sólida pode evitar reações de hidrólise que ocorrem em dispersões lipídicas aquosas (MEHNERT & MADER, 2001).

Os crioprotetores (sorbitol, manose, glicose, trealose e polivinilpirrolidona) são necessários e usados para proteger os lipossomas durante o estágio de congelamento do ciclo de liofilização (VEMURI & RHODES, 1995). Os agentes crioprotetores diminuem a

atividade osmótica da água, a cristalização e ainda favorecem o estado vítreo da amostra congelada (HARRIGAN, MADDEN & CULLIS, 1990).

Estudos sugerem que a trealose é a substância crioprotetora mais indicada para prevenir a fusão das vesículas e a perda do fármaco incorporado (MEHNERT & MADER, 2001), sendo o mecanismo proposto para a trealose a formação de uma ponte de hidrogênio do açúcar com o grupo cabeça polar do fosfolípido, impedindo a ligação com a água (HARRIGAN, MADDEN & CULLIS, 1990).

1.4.4 Caracterização dos lipossomas

O estudo das propriedades morfológicas requer o uso de técnicas que consideram o lipossoma como um todo, como a microscopia de varredura (MEV) ou de transmissão (MET). A técnica de criofratura também tem sido empregada para auxiliar a análise morfológica deste sistema (RUOZI *et al.*, 2005)

Para caracterizar o tamanho médio das partículas a espectroscopia de correlação de fótons (ECF) e o espalhamento dinâmico da luz laser (DLS) são as ferramentas mais indicadas. A ECF é uma técnica capaz de medir a flutuação da intensidade da luz dispersa causada pelo movimento das partículas, resultante das colisões entre as partículas suspensas e as moléculas do solvente. Esse método é capaz de medir partículas com tamanhos que variam de nanômetros a aproximadamente três micrômetros. DLS é baseada na dependência do ângulo de difração no raio da partícula. Uma vantagem da DLS é a capacidade de cobrir uma ampla faixa de tamanho que pode variar em torno de nanômetros. Quando uma fonte laser incide sobre a preparação lipossômica, as vesículas de diferentes tamanhos irão dispersar ou espalhar a luz.

Outra técnica recentemente desenvolvida empregada para caracterizar a morfologia de superfície é a microscopia de força atômica (MFA), a qual fornece informações com alta

resolução em três dimensões, em escala nanométrica, sendo capaz ainda de resolver detalhes de superfície em nível atômico. Em 2005, Ruozi e colaboradores avaliaram a aplicabilidade desta técnica para caracterizar a estabilidade de lipossomas com diferentes composições lipídicas, comparando os resultados encontrados com os obtidos por ECF. A MFA demonstrou ser uma técnica rápida, não invasiva e capaz de prever informações sobre a morfologia, distribuição do tamanho, bem como possíveis processos de agregação que ocorrem durante a estocagem dos lipossomas. Além disso, foi descrita uma boa correlação entre as duas técnicas.

Várias técnicas são comumente utilizadas para a determinação do conteúdo de fosfolípidios nos lipossomas. A maioria delas inclui o uso de reagentes contendo molibdato para formar um complexo azul. Um dos métodos é o ensaio de Bartlett (BARTLETT, 1959), que consiste na hidrólise ácida do material orgânico (fosfolípidios) em amostras de lipossomas, transformando-os em fosfato inorgânico que ao reagir com molibdato de amônio forma o ácido fosfomolibdico. Este, por sua vez, forma um complexo azul quando adicionado um agente redutor. A intensidade da cor azul é medida espectrofotometricamente.

Ensaio enzimático para a fosfatidilcolina e o colesterol estão disponíveis no comércio e são amplamente utilizados. O método padrão usa a fosfolipase para hidrolisar fosfolípidios e liberar o grupo colina livre, que pode ser oxidado, com posteriores reações, até a formação do produto final, a quinoneimina seca, que pode ser mensurada por espectrofotometria. Técnicas cromatográficas como CLAE, CG e a cromatografia de camada fina podem ser utilizadas para separar e quantificar os lipídios que compõem a bicamada lipídica dos lipossomas (EDWARDS & BAEUMNER, 2006).

Uma característica importante da membrana fosfolipídica é a existência de uma fase de transição dependente de temperatura, em que as cadeias hidrocarbonetos dos fosfolípidios sofrem uma transição de forma a partir de um estado ordenado (gel) para um estado fluido

mais desordenado (líquido cristalino). A calorimetria de varredura diferencial (CVD) é utilizada para caracterizar a temperatura de transição de fase das membranas do lipossoma. O estado físico da bicamada pode afetar a permeabilidade e parâmetros relacionados a estabilidade dos lipossomas (VEMURI & RHODES, 1995). Vários marcadores fluorescentes também são utilizados para o estudo da fluidez e da permeabilidade, como por exemplo, a carboxifluoresceína, o pireno, entre outros (GÓMEZ-HENZ & FÉRNÁNDEZ-ROMERO, 2005).

1.4.5 Interação dos lipossomas com a pele e sua penetração

Vários fatores como a lamelaridade, a composição lipídica, a carga da superfície lipossomal, o modo de preparação e a concentração lipídica podem influenciar a interação com o EC e a possível penetração para a epiderme (VERMA *et al.*, 2003; RAMÓN *et al.*, 2005; ELSAYED *et al.*, 2007).

O estado termodinâmico das bicamadas dos lipossomas é um fator responsável pela interação com o EC. Van den Bergh e colaboradores (1999) mostraram que o estado cristalino dos lipossomas induz interações com lipídios intracelulares nas camadas mais profundas do EC, enquanto que o estado em gel dos lipossomas promove uma agregação, fusão e aderência na superfície do EC. A grande flexibilidade da bicamada e a liberdade de movimentos de moléculas de fosfolipídios no estado cristalino dos lipossomas comparado com o estado em gel podem estar relacionadas com essa diferença de interação dos lipossomas com o EC (VAN DEN BERGH *et al.*, 1999; BETZ *et al.*, 2005)

Além disso, estudos indicam que uma diminuição no conteúdo de colesterol nas bicamadas resulta em um aumento no transporte do fármaco através do EC (YU & LIAO, 1996; ELSAYED *et al.*, 2007).

Estudos sugerem que os lipossomas convencionais são úteis como sistemas de liberação para uso tópico, visto que aumentam a deposição do ativo na pele devido a seu efeito reservatório, que mantém o ativo confinado nas camadas do EC, diminuindo, dessa maneira, a penetração na pele (PUGLIA *et al.*, 2004; ELSAYED *et al.*, 2007). Além do mais, trabalhos recentes de microscopia confocal indicam que lipossomas intactos não são capazes de penetrar nas camadas granulares da epiderme.

Portanto, os lipossomas são sistemas ideais para o controle da liberação de filtros solares de uma formulação. Busca-se com os lipossomas a incorporação desses ativos, a proteção do material encapsulado da degradação metabólica, um efeito reservatório na epiderme e, por fim, a redução da absorção sistêmica e os efeitos indesejáveis descritos na literatura para esses compostos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de uma formulação com filtros solares inclusos em lipossomas, a fim de aumentar a estabilidade e reduzir a absorção sistêmica dos filtros solares, através da inclusão destes em sistemas de liberação prolongada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Incorporação do 3,4-MBC e do BMDM em lipossomas pelo método da hidratação do filme lipídico;
- Estabelecer a melhor relação para o aprisionamento do ingrediente ativo no lipossoma, determinando o teor de fósforo e o teor de filtro solar dos lipossomas obtidos;
- Desenvolver formulações: gel com os filtros solares livres e gel com os filtros solares inclusos em lipossomas;
- Validar metodologia analítica para a quantificação dos ativos inclusos nas formulações desenvolvidas.
- Determinar o FPS das formulações por método *in vitro*;
- Avaliação da liberação dos filtros das formulações, *in vitro*, através do sistema bicompartimental clássico conhecido por célula de Franz.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Matérias-primas

- Ácido ascórbico (SIGMA);
- Colesterol (SIGMA);
- Eumulgin[®] VL 75 (SPECTRUM);
- Eusolex[®] 6300 (3,4-MBC), teor declarado de 99,9% (SPECTRUM);
- Natrosol[®] (DEG);
- Nipagin[®] (ROCHE);
- Neo Heliopan[®] 357 (BMDM), teor declarado de 99,2% (COSMOTEC);
- Pelemol[®] G7A (BRASQUIM);
- Phospholipon[®] 90 NG (PHOSPHOLIPID);
- Sephadex[®] G-50 (SIGMA-ALDRICH);

3.1.2 Reagentes

- Acetonitrila para CLAE (TEDIA)
- Ácido sulfúrico P.A. (VETEC);
- Álcool etílico P.A. (VETEC);
- Bacitracina
- Clorofórmio P.A. (VETEC);
- Fosfato de potássio monobásico P.A. (PROQUÍMIOS);
- Metanol P.A. (VETEC);
- Molibdato de amônio P.A. (CONTROL);

- Peróxido de hidrogênio P.A. (VETEC);
- Solução aquosa de ácido fosfotungstico a 2% (v/v) (pH 7,0);
- Solução de ácido sulfúrico 10% (v/v);
- Solução de etanol a 25% (v/v).
- Solução de molibdato de amônio
- Solução padrão de fósforo 0,65 mM (SIGMA);
- Solução tampão TRIS pH 6,8;
- Soluções tampão pH 4 e 7 (MERCK);
- TRIS - Tris (hidroximetil) amino metano P.A. (VETEC);
- Tween 80 P.S (VETEC);

3.1.3 Equipamentos

- Agitador de tubos PHOENIX - AP 56;
- Agitador mecânico FISATOM 713 D
- Aparelho ZETASIZER Malvern;
- Balança analítica METTLER TOLEDO - AG 204;
- Balança de precisão METTLER TOLEDO - PB 3002;
- Banho de água BÜCHI - B-480;
- Banho de ultra-som THORNTRON – 14;
- Centrífuga HERMLE – Z 200 A;
- Potenciômetro DIGIMED - DM 21;
- Eletrodo DIGIMED – DME CV4
- Eletrodo DIGIMED – DME CVC1;
- Espectrofotômetro de infravermelho ABB FTLA 2000-100;
- Espectrofotômetro UV/VIS SHIMADZU - PC 2401;

- Microscópio AXOPLAN 2 DA ZEISS, sistema de captura com câmera de vídeo *color view XS* e fotográfica da marca JVC - TK 1270;
- Placa de aquecimento com agitação magnética CORNING;
- Placa de aquecimento de tubos THERMOBLOCK;
- Ponto de fusão BÜCHI B-540;
- Rotavapor BÜCHI - R-114;
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência SHIMADZU – bomba modelo LC-10AD vp, auto-injetor modelo SIL-10AD vp, detector de arranjo de fotodiodos modelo SPD-M10A vp e sistema de dados (*software*) modelo CLASS-VP versão 6.1;
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência WATERS – bomba modelo HPLC Pump Waters 510; detector modelo tunable absorbance detector waters 486; registrador modelo data module waters 746 e injetor rheodyne 7125.

3.1.4 Outros Materiais

- Células de difusão tipo Franz, com área de 1,96 cm² e 7 mL de capacidade;
- Colunas PD-10 PHARMACIA BIOTECH;
- Membranas de policarbonato ISOSPORE[®] com poros de 0,4 µm e 0,2 µm;
- Seringas descartáveis de 5 mL BECKTON & DICKSON;
- Sistema de filtração millex[®] HV (PVDF), 0,45 µm de poro, 33 mm.
- Suporte para filtração SWINEX[®] em polipropileno com 25 mm de diâmetro;
- Tubo de celulose para diálise largura 33mm (SIGMA-ALDRICH);

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Padrões de Trabalho

No início deste trabalho, não havia no mercado substância química de referência para filtros solares, dessa forma, utilizou-se como padrões de trabalho as matérias-primas 3,4-MBC e BMDM com teor de pureza declarado, cedida pelas indústrias Spectrum e Cosmotec, respectivamente. Essas matérias-primas foram avaliadas de acordo com o ponto de fusão, os espectros de ultravioleta e infravermelho, sendo comparados os resultados obtidos com especificações encontradas na literatura. A partir de 2007, a monografia para o BMDM passou a constar na farmacopéia americana (USP 30, 2007).

3.2.2 Caracterização físico-química dos filtros solares usados como padrões de trabalho

3.2.2.1 Determinação do ponto de fusão

O ponto de fusão (PF) de uma substância é a temperatura na qual existe um equilíbrio entre um estado cristalino bem organizado e um estado líquido mais randômico (SOLOMONS & FRYHLE, 2001), sendo uma medida útil na identificação e isolamento de compostos orgânicos.

Para a determinação do PF, uma pequena quantidade de 3,4-MBC e de BMDM foi colocada em um capilar de vidro fechado em uma das pontas. O capilar de vidro foi introduzido no aparelho para a determinação do PF.

A determinação do ponto de fusão para cada filtro foi realizada em triplicata e comparada com valores que constam na literatura (ENCICLOPÉDIA DE ABSORVEDORES DE UV PARA PRODUTOS COM FILTRO SOLAR, 1995; USP 30, 2007).

3.2.2.2 Análise do espectro de absorção na região ultravioleta

O espectro de absorção na região ultravioleta (UV) é uma forma de estabelecer o perfil espectrofotométrico e determinar o comprimento de onda máximo (λ máx) de um determinado composto, como também é útil para o cálculo do coeficiente de extinção molar. O perfil de absorção de substâncias no UV depende das transições eletrônicas que possam ocorrer na molécula e, conseqüentemente, da sua estrutura eletrônica. Quanto menor a energia envolvida nessas transições, maior é o comprimento de onda no qual a molécula absorve. Os espectros de absorção das soluções metanólicas contendo 10 $\mu\text{g/mL}$ de 3,4-MBC e 10 $\mu\text{g/mL}$ de BMDM foram determinados em espectrofotômetro UV/VIS no intervalo de 200 a 450 nm, usando cubetas de quartzo de 1 cm e metanol P.A. como branco.

3.2.2.3 Análise do espectro de absorção na região infravermelha

A espectroscopia de IV é um tipo de espectroscopia de absorção a qual usa a região de 4000 a 10 cm^{-1} do espectro eletromagnético (MENDHAM *et al.*, 2002). Os espectros de absorção no IV são usados para a identificação de compostos puros ou para a detecção e identificação de impurezas do composto e são provocados pelos diferentes modos de vibração e de rotação de uma molécula.

Para a obtenção do espectro de absorção no IV, as amostras foram preparadas misturando o 3,4-MBC e o BMDM com brometo de potássio. Essa mistura foi triturada e prensada a altas pressões a fim de se formar uma pastilha pela qual a luz pode passar. Estas pastilhas foram levadas ao aparelho. Como o brometo de potássio não absorve a radiação IV, as linhas espectrais encontradas caracterizam a amostra. A determinação foi realizada na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , região de interesse principal para fins analíticos.

Como não há um espectro padrão dessas substâncias na literatura, será analisado o espectro de cada composto em particular comparando com seus grupos funcionais característicos.

3.2.3 Desenvolvimento das Curvas de Calibração

3.2.3.1 Curva de Ringbom

A curva de Ringbom define as concentrações de linearidade dos filtros em estudo. Permite avaliar qual a faixa de concentração de uma solução de um determinado composto que apresenta uma resposta linear em relação à absorbância, ou seja, quais os limites de concentração do composto que respondem à lei de Lambert-Beer.

A curva de Ringbom foi construída a partir de soluções de 3,4-MBC e de BMDM em etanol P.A., na faixa de 0,4 a 50 µg/mL. Para o 3,4-MBC as leituras das transmitâncias foram realizadas em 300 nm, enquanto que para o BMDM a leitura foi realizada em 358 nm. Os valores de logaritmo das concentrações foram calculados e fazem parte do eixo da abscissa do gráfico, ficando no eixo da ordenada os valores de percentual de transmitância determinado para cada concentração.

3.2.3.2 Curva de calibração por espectrofotometria na região do UV

A partir da curva de Ringbom escolheu-se a faixa de concentração que seria utilizada na construção da curva de calibração. Foram escolhidas cinco concentrações (2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL) para ambos os filtros solares. No caso do 3,4-MBC, com os valores das absorbâncias obtidos em 300 nm, em função da concentração, foram calculados o coeficiente de correlação e a equação da curva de calibração com o auxílio do programa Excel[®]. O mesmo

procedimento foi executado para o BMDM, contudo, as leituras de absorbâncias foram realizadas em 358 nm.

Foram construídas três curvas de calibração para cada filtro, mas foi utilizada a curva de calibração referente à média das três determinações.

3.2.4 Obtenção e Caracterização dos Lipossomas contendo Filtros Solares

3.2.4.1 Obtenção

Várias metodologias são descritas na literatura para o preparo de lipossomas. As vesículas multilamelares (VML) permitem uma melhor incorporação de substâncias lipofílicas, como é o caso dos filtros solares em estudo. Desta forma, o método escolhido foi o de hidratação do filme fosfolipídico (NEW, 1997). Esse método já foi descrito em estudos anteriores com filtros solares (MOTA, 2005; GARCIA, 1998), e, além disso, é capaz de garantir uma melhor incorporação de filtros sólidos lipofílicos quando comparado com o método de agitação mecânica de pré-lipossomas (HENRIQUES, SANTOS & GARCIA, 2005).

Contudo, vários fatores podem influenciar as características das VMLs produzidas, tais como, o tempo de hidratação, a espessura do filme lipídico formado na parede do balão, entre outros (VEMURI & RHODES, 1995). Por isso, esses parâmetros devem ser bem estabelecidos durante a produção dos lipossomas.

Os lipossomas do tipo VMLs possuem a capacidade de incorporação de substâncias lipofílicas entre 5 e 20% em relação ao total de lipídios (NEW, 1997). A escolha dos fosfolipídios que formam os lipossomas é mais restrita, pois, embora se usem fosfolipídios sintéticos, a preferência vai para os compostos de origem natural. Os fosfolipídios contendo colina são os mais abundantes na natureza e constituem o maior componente das membranas

naturais, sendo portanto bastante utilizados na formação de lipossomas para as mais variadas aplicações (FERREIRA *et al.*, 2005). Foram utilizados para o preparo dos lipossomas os componentes: Phospholipon[®] 90 (contendo 96,70% fosfatidilcolina), colesterol e os filtros solares 3,4-MBC ou BMDM.

O volume final estabelecido de preparação lipossômica foi de 25 mL. A concentração lipídica usada foi 42 mM (GARCIA, 1998), a concentração de colesterol foi 12 mM (GARCIA, 1998) e variou-se a concentração do 3,4-MBC entre 6,3 mM, 8,4 mM, 9,6 mM e 10,5 mM e do BMDM em 4,2 mM, 6,3 mM e 8,4 mM com o intuito de definir a melhor relação entre filtro solar:fosfolípido. As formulações lipossomais preparadas estão listadas abaixo.

TABELA 1: Composição das preparações lipossomais obtidas pelo método de hidratação do filme fosfolípido para a incorporação do 3,4-MBC.

Composição das Preparações Lipossomais	Quantidade (mM)			
	Formulação A	Formulação B	Formulação C	Formulação D
Phospholipon [®] 90	42	42	42	42
Colesterol	12	12	12	12
3,4-MBC	6,3	8,4	9,6	10,5
Solução Tampão Tris pH 6,8	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL

TABELA 2: Composição das preparações lipossomais obtidas pelo método de hidratação do filme fosfolipídico para a incorporação do BMDM.

Composição das Preparações Lipossomais	Quantidade (mM)		
	Formulação E	Formulação F	Formulação G
Phospholipon [®] 90	42	42	42
Colesterol	12	12	12
BMDM	4,2	6,3	8,4
Solução Tampão Tris pH 6,8	25 mL	25 mL	25 mL

O processo de produção dos lipossomas multilamelares pelo método de hidratação do filme fosfolipídico encontra-se esquematizado na **FIGURA 9**. Exatamente cerca de 0,85 g de Phospholipon[®] 90 e 0,12 g de colesterol foram pesados diretamente em um balão de fundo redondo de 1 L, enquanto que o ativo foi pesado separadamente, já que a massa é muito pequena, na ordem de miligramas, e transferido quantitativamente com auxílio de 20 mL de clorofórmio P.A. Na literatura, outros solventes orgânicos podem ser usados nesse processo como éter, metanol e combinações, para solubilizar as substâncias e garantir uma distribuição uniforme dos lipídios na bicamada lipídica (VEMURI & RHODES, 1995). A solução é evaporada em evaporador rotatório, sob vácuo, sendo a temperatura mantida em torno de 35°C e lenta rotação, durante duas horas. Após esse período há formação de uma fina película lipídica aderida na parede interna do balão. O balão é levado para um dessecador a vácuo, onde permanece durante vinte e quatro horas, a fim de garantir a completa remoção do solvente. A hidratação do filme lipídico foi realizada em 25 mL de tampão TRIS pH 6,8 com

auxílio de pérolas de vidro e agitação em vórtex (permitindo que as pérolas batam na parede do vidro e soltem o filme lipídico aderido), obtendo-se os lipossomas. Adicionou-se gás nitrogênio ao balão com o intuito de evitar a oxidação do material lipídico, garantindo uma melhor conservação. Os lipossomas foram deixados em geladeira (4-8°C) durante noventa e seis horas. Estudos recentes mostraram que o aumento no tempo de hidratação de vinte quatro para noventa e seis horas permite uma formação de um maior número de vesículas, com liberação de todo o filme lipídico aderido ao balão (SANTOS, 2007).

A suspensão lipossomal obtida foi submetida à normalização das vesículas formadas em membranas de policarbonato.



FIGURA 9: Representação esquemática do preparo de lipossomas pelo método de hidratação do filme fosfolipídico.

3.2.4.2 Normalização dos lipossomas

A fim de obter lipossomas com tamanhos normalizados foi realizada a filtração das preparações lipossomais em membranas de policarbonato com poros de 0,4 μm (duas vezes) e 0,2 μm (uma vez), respectivamente. Após a passagem por cada membrana as frações dos lipossomas eram separadas para análise (VEMURI & RHODES, 1995; GARCIA, 1998; MIRANDA, 2005; SANTOS, 2007). As três primeiras frações estão esquematizadas abaixo.

1ª Fração: suspensão lipossomal sem filtrar

2ª Fração: suspensão lipossomal após passagem por membrana de 0,4 μm

3ª Fração: suspensão lipossomal após passagem por membrana de 0,2 μm

Por fim, uma alíquota de aproximadamente 4 ml da fração filtrada em membrana de 0,2 μm era separada para que fossem filtrados em uma coluna PD-10 contendo gel Sephadex[®] G-50 (Pharmacia), sendo a eluição da amostra pela coluna realizada por meio de solução tampão TRIS pH 6,8 (4ª Fração). As vesículas muito grandes são excluídas das aberturas da rede do gel sephadex[®], enquanto que as vesículas menores podem entrar no interior das partículas do gel e serem retidas. Desta forma, todo o material que não estava incorporado no lipossoma ficaria retido no gel da coluna, e a fração que passava por toda coluna era recolhida para análise. Na **FIGURA 10** encontra-se esquematizado o processo de normalização dos lipossomas.

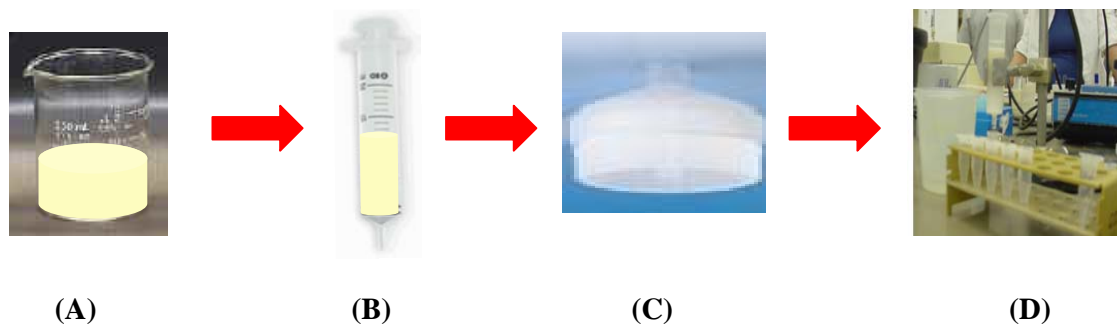


FIGURA 10: Esquema do processo de normalização dos lipossomas. A solução lipossomal (A) foi passada para uma seringa (B) que é acoplada a um suporte filtrante (C) contendo uma membrana de policarbonato de tamanhos variando entre 0,4 e 0,2 micra. As frações filtradas foram estocadas em eppendorfs. A seguir, foi realizada a separação dos lipossomas através de uma coluna PD-10 (D) contendo gel Sephadex[®] G-50 e as frações obtidas separadas em eppendorfs.

As quatro frações lipossomais obtidas foram analisadas por espectrofotometria no UV/VIS quanto ao teor de filtro solar presente e teor de fosfatidilcolina (método de Bartlett), pela determinação e visualização do tamanho das vesículas lipossomais por microscopia ótica, espalhamento dinâmico da luz e microscopia eletrônica de transmissão.

3.2.4.3 Análise das frações dos lipossomas

3.2.4.3.1 Determinação da quantidade de filtros solares incorporados nas frações dos lipossomas

A determinação da quantidade de filtros solares nas frações lipossomais foi realizada por espectrofotometria da região UV, sendo a leitura das absorbâncias dos filtros determinada no comprimento de onda máximo de cada um, 3,4-MBC e BMDM, caracterizado anteriormente.

A diluição foi calculada com base na concentração teórica existente de cada filtro solar nos lipossomas preparados. Os cálculos da diluição foram realizados a fim de obter soluções com concentrações próximas ao ponto central da curva de calibração dos filtros (6 µg/mL).

Cada fração lipossomal foi analisada em triplicata, sendo utilizado como solvente etanol P.A. A quantidade de cada ativo encapsulado foi determinada com base na equação da reta da curva de calibração dos filtros solares. Dessa forma, foi realizado o cálculo do percentual de filtro incorporado em cada fração.

3.2.4.3.2 Determinação da quantidade de fosfolipídio nas frações dos lipossomas pelo método de Bartlett

A determinação indireta da concentração de fosfolipídios foi realizada pelo método de Bartlett (BARTLETT, 1959), método colorimétrico que visa avaliar o conteúdo de fósforo em cada fração lipossomal.

O ensaio é realizado em uma placa de aquecimento de tubos de ensaio, sendo utilizados quatro tubos, cada tubo com um volume crescente de solução padrão de fósforo 0,65 mM (50, 100, 150 e 200 µL) a fim de se estabelecer uma curva de calibração de fósforo em cada análise, três tubos para o branco e três tubos para cada fração da amostra analisada.

Para a análise do fósforo foram retiradas alíquotas de 100 μL de cada fração dos lipossomas e diluídas com etanol P.A. obtendo uma solução com concentração teórica de 2,52 $\mu\text{g/mL}$ em fósforo, desta transferiu-se 1,0 mL para cada tubo da amostra. Nos tubos destinados ao branco foi adicionado 1,0 mL de etanol P.A .

A seguir, foi adicionado 400 μL de uma solução de ácido sulfúrico a 10% em todos os tubos de ensaio que foram colocados em uma placa de aquecimento com a temperatura variando de 180 a 195°C durante trinta minutos. Decorrido esse tempo, os tubos foram resfriados. Esta etapa tem como objetivo a hidrólise ácida, transformando o fosfolipídio em fosfato inorgânico.

Na segunda etapa do ensaio foi adicionado a todos os tubos de ensaio, 100 μL de solução de peróxido de hidrogênio a 10% (v/v). Os tubos tornaram a ser aquecidos durante trinta minutos a temperatura de 180 a 195°C. Após o aquecimento, os tubos foram resfriados novamente.

A última etapa é realizada adicionando 4,6 mL da solução de molibdato de amônio em todos os tubos, e por fim, acrescentando 500 μL de solução de ácido ascórbico a 10% (p/v) e homogeneizando cada tubo. Os tubos foram colocados em uma placa de aquecimento a 90°C durante 20 minutos. Nesta última fase o fosfato inorgânico formado na etapa anterior reage com a solução de molibdato de amônio formando o ácido fosfomolibdico que forma um complexo azul, quando na presença de ácido ascórbico, agente redutor. A intensidade da cor azul é diretamente proporcional à quantidade de fósforo presente e é medida espectrofotometricamente.

Portanto, as absorvâncias das amostras, padrão de fósforo e do branco são determinadas no comprimento de onda de 800 nm. O percentual de fosfolipídios presentes na amostra é estabelecido através da equação da reta construída.

3.2.4.3.3 Microscopia Ótica

A microscopia ótica (MO) foi realizada em microscópio Axoplan 2 da Zeiss, sistema de captura com câmera de vídeo e câmera fotográfica acoplada ao microscópio e a um computador; software de análise de imagem analySIS.

No presente estudo, foi desenvolvido um método de preparo de amostra para avaliar o tamanho das vesículas lipossomais por MO.

As preparações lipossomais escolhidas para a visualização em microscópio ótico foram lipossoma 42 mM com 8,4 mM de 3,4-MBC e lipossoma 42 mM com 6,3 mM de BMDM.

Os lipossomas recentemente preparados e suas frações foram diluídas após filtração em membrana de policarbonato com 0,2 μ m. Pipetou-se 200 μ L da amostra em um balão volumétrico de 25,0 mL com etanol 25% (v/v). Após homogenização com auxílio de uma pipeta pasteur, foi retirada uma gota desta solução, a qual foi disposta sobre lâmina de vidro, sendo a lamínula posicionada delicadamente sobre a gota. As lâminas foram observadas em aumento de 100x no microscópio ótico, imediatamente após sua preparação, para evitar o ressecamento e rompimento das vesículas e em intervalos de 10, 15 e 30 minutos após realizada a diluição da amostra.

As fotomicroscopias foram realizadas em campo claro e microscopia com contraste interferencial-diferencial (DIC). O tamanho das vesículas e parâmetros como esfericidade foram determinados por análise de imagem computadorizada.

Deve-se fazer uma consideração em relação ao tratamento das imagens obtidas por MO, realizada pelo software AnalySIS. Para que este possa ser realizado, fornecendo dados como diâmetros mínimos, médios e máximos das vesículas lipossomais, as imagens obtidas devem ser convertidas em escala de cinza e posteriormente em sistema binário, ou seja, preto

e branco. Desta forma, as vesículas podem ser compreendidas pelo software, contadas e medidas.

3.2.4.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

O microscópio eletrônico é um equipamento desenhado para mostrar detalhes em alta resolução, através da utilização de um feixe de elétrons. No microscópio eletrônico de transmissão (MET) a imagem é gerada pelos elétrons que passam através do material. O feixe resultante contém alguns elétrons originais que não tiveram suas características alteradas e outros que, ao passar pelo espécime, tiveram alteradas a velocidade e a direção. Como os elétrons não podem ser observados diretamente, a imagem no MET é vista através de uma tela fosforescente ou através da sensibilização de um filme (LEAL, 2000).

Com o intuito de avaliar a morfologia dos lipossomas foi utilizado o MET sendo a técnica de coloração negativa usada para o preparo das amostras.

Para executar a técnica de coloração negativa foi empregado o método da gota. Neste método foram utilizadas telas de cobre recobertas por um filme de suporte de parlódio que possui como característica ser transparente e resistente ao feixe eletrônico, reforçado por um filme de carbono. Com o objetivo de diminuir a tensão superficial presente no filme de carbono, usou-se uma gota de solução de bacitracina, que após 2 minutos em contato com o filme suporte foi seca por capilaridade com papel de filtro, que foi encostado na tela em um ângulo de 45°C. As frações lipossomais foram diluídas em água destilada e foi adicionada uma gota da fração lipossomal sobre a tela por um período de 2 minutos. Após esse tempo a tela foi seca com auxílio de papel de filtro. Foi adicionada uma gota de corante fosfotungstato de potássio (PTK) sobre a tela com o filme suporte por um período de cerca de 2 minutos e seca com papel de filtro (GARCIA, 1998). Em seguida, as telas preparadas foram mantidas

armazenadas, por um período de 24 horas, no dessecador, e então submetidas à análise através de MET e fotografadas com aumento próprio para cada amostra.

3.2.4.3.5 Espalhamento dinâmico da luz laser (DLS)

O espalhamento dinâmico da luz está baseado no comportamento de um feixe de luz emitido por uma lâmpada de laser de hélio-neon, principalmente por partículas menores que 1µm suspensas em um meio. A intensidade de espalhamento é tempo dependente e, em parte, função do tamanho das partículas, bem como de outros fatores físicos (URLICH, 2002; EDWARDS & BAEUMNER, 2006).

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

Foram realizadas análises preliminares para se determinar as condições ideais de trabalho, a fim de garantir a confiabilidade das análises e eficácia do método. O ângulo de detecção foi de 90° e o comprimento de onda para as leituras de 633nm (ESPOSITO *et al.*, 2007). As amostras foram diluídas até que o tamanho das partículas medido fosse independente da concentração da amostra. Isto é geralmente obtido quando o kCps (medida de concentração do equipamento; counts per second) está entre 10 e 500 (LOBO, 2005).

A diluição das amostras foi realizada com água destilada, sendo procedida a leitura. Os dados obtidos são integrados por um software acoplado ao equipamento.

3.2.5 Desenvolvimento das formulações

3.2.5.1 Formulação gel de Natrosol® contendo 3,4-MBC e BMDM

Para o desenvolvimento da formulação contendo os filtros solares não inclusos em lipossomas é importante escolher um polímero para a constituição do gel, de tal forma que quando preparado o gel com o lipossoma, este possa ser compatível. Dessa forma, o Natrosol® (hidroxietilcelulose) torna-se uma escolha adequada visto que é um polímero gelificante com um caráter não-iônico, derivado da celulose, compatível com a fosfatidilcolina, protegendo a integridade e estabilidade dos lipossomas (GARCIA, 1998). Além disso, apresenta vantagens como facilidade de preparo, uma vez que não requer neutralização e sua estabilidade ocorre em uma ampla faixa de pH.

Os ativos foram incorporados no percentual máximo permitido pela legislação vigente para ser obtida uma formulação com o FPS mais elevado possível. A concentração máxima permitida para o 3,4-MBC é de 4% e para o BMDM é de 5% (BRASIL, 2006).

Buscou-se uma formulação simples e capaz de ser aplicada na indústria cosmética. A formulação desenvolvida foi avaliada em função do FPS e do pH e encontra-se descrita na **FÓRMULA 1**.

FORMULA 1: Gel creme de Natrosol[®] com os filtros 3,4-MBC e BMDM livres

Fase 1

3,4-MBC.....4,0g

BMDM.....5,0g

Triacetato de etila (Pelemol[®] G7A).....8,0g

Eumulgin[®] VL 75 *1,0g

*Lauril glucosídeo, poligliceril 2-dipolihiidroxiestearato e glicerina

Fase 2

Hidroxietilcelulose (Natrosol[®])1,0g

Metilparabeno (Nipagin[®])0,2g

Água destilada.....qsp.....100g

Os filtros solares 3,4-MBC e BMDM foram pesados em um bécher e com o auxílio do Pelemol[®] G7A e do emulsificante, Eumulgin[®] VL 75, foram dissolvidos sob agitação constante e aquecimento em banho-maria, constituindo a fase 1. A seguir o metilparabeno foi pesado em um bécher e dissolvido completamente em água destilada previamente aquecida. Após total solubilização do conservante, o restante de água destilada foi adicionado e o sistema mantido sob constante agitação. A hidroxietilcelulose deve ser adicionada aos poucos sob agitação constante, formando a fase 2. A fase 2 foi vertida na fase 1 e mantida sob vigorosa agitação até a formação da rede do polímero e homogeneização das fases.

3.2.5.2 Formulação gel de Natrosol®

Foi elaborada a formulação de um gel base, segundo a **FÓRMULA 2**, que foi utilizada como branco das formulações contendo os filtros não inclusos e incorporados nos lipossomas.

FÓRMULA 2: Gel creme base de Natrosol®

Fase 1

Triacetato de etila (Pelemol® G7A).....8,0g

Eumulgin® VL 75*.....1,0g

* Lauril glucosídeo, poligliceril 2-dipoli-hidroxiestearato e glicerina

Fase 2

Hidroxietilcelulose (Natrosol®)1,0g

Metilparabeno (Nipagin®)0,2g

Água destilada.....qsp.....100g

Pelemol® G7A e o emulsificante, Eumulgin® VL 75, foram dissolvidos sob agitação constante e aquecimento em banho-maria, constituindo a fase 1. A fase 2, também foi preparada em banho-maria, para solubilizar o metilparabeno. Em seguida, o Natrosol® foi adicionado sob agitação constante até a formação do gel. A fase 2 deve ser vertida sobre a fase 1.

O gel base preparado foi mantido sob refrigeração a 4°C até os ensaios de dosagem em CLAE, com o objetivo de ser usado como branco.

3.2.5.3 Formulação gel de Natrosol® contendo 3,4-MBC e BMDM inclusos em lipossomas

Para o preparo da formulação em gel contendo lipossomas, aumentou-se a concentração do fosfolípido para 168 mM (GARCIA, 1998; SANTOS, 2007) e, por conseguinte, a de filtro incorporado, mantendo-se sempre a melhor relação de aprisionamento estabelecida, sendo 8,4 mM de 3,4-MBC e 6,3 mM de BMDM. É necessário o aumento da concentração de Phospholipon® 90 para incluir uma quantidade maior de filtros solares e aumentar o FPS do lipossoma formado (GARCIA, 1998).

Nesta concentração elevada de 168 mM só é possível ocorrer a passagem por membrana de polycarbonato utilizando-se um filtro sob pressão de gás nitrogênio.

Para atingir um FPS 11, foi formulado um gel de natrosol a 1% contendo 4% de 3,4-MBC e 5% de BMDM, em que parte desses filtros solares estavam inclusos no lipossoma.

FÓRMULA 3: Gel creme de Natrosol® com os filtros 3,4-MBC e BMDM inclusos em lipossomas

Fase 1

Suspensão Lipossomal 168mM com 3,4-MBC30mL

Suspensão Lipossomal 168 mM com BMDM.....30mL

3,4-MBC.....3,8g

BMDM.....4,8g

Triacetato de etila (Pelemol® G7A).....8,0g

Eumulgin® VL 75*1,0g

* Lauril glucosídeo, poligliceril 2-dipolihidroxiestearato e glicerina

Fase 2

Hidroxietilcelulose (Natrosol [®])	1,0g
Metilparabeno (Nipagin [®])	0,2g
Água destilada.....qsp.....	100g

Para o preparo da fase 1 os filtros solares 3,4-MBC e BMDM foram pesados em um bécher e com o auxílio do Pelemol[®] G7A e do emulsificante, Eumulgin[®] VL 75, foram dissolvidos sob agitação constante e aquecimento em banho-maria. Em outro bécher foi adicionada a suspensão lipossomal contendo 3,4-MBC e, em seguida, a suspensão lipossomal contendo BMDM, sendo mantidas sob agitação por cerca de 10 minutos. A suspensão lipossomal final foi vertida no bécher que continha os filtros solares já solubilizados e mantida sob vigorosa agitação. A fase 2 foi preparada da mesma maneira indicada na **FÓRMULA 1**. A fase 2 foi vertida na fase 1 e mantida sob vigorosa agitação até a formação da rede do polímero e homogeneização das fases.

3.2.6 Padronização da metodologia de análise das formulações por CLAE

3.2.6.1 Estabelecimento das Condições Cromatográficas

A metodologia de análise empregada foi baseada em método já desenvolvido anteriormente para separação de misturas de filtros solares (RIBEIRO, 2004), porém não aplicado para a mistura de 3,4-MBC e BMDM.

A metodologia desenvolvida foi validada na formulação gel Natrosol[®] contendo os filtros solares livres. Foi empregado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência SHIMADZU, acoplado ao detector de UV com arranjo de fotodiodos (PDA). A coluna empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (C18), caracterizando a fase reversa, foi mantida à temperatura de 30° C. A fase móvel foi acetonitrila e água destilada (930 : 70, v/v) com ajuste de pH para 2,7 com auxílio de solução de ácido fosfórico diluída. A fase móvel obtida foi filtrada através de membrana Millipore com poros de 0,45 µm de diâmetro. A vazão da fase móvel foi estabelecida em 1,0 mL/min e o volume de injeção foi de 20 µL. Os comprimentos de onda utilizados para a detecção foram 304 nm para o 3,4-MBC e 352 nm para o BMDM, conforme descrito na **TABELA 3**.

TABELA 3: Condições cromatográficas para a metodologia proposta para a avaliação dos filtros solares 3,4-MBC e BMDM.

Parâmetros	Condições empregadas
Coluna	Shimpack® CLC-ODS (150 mm x 4,6 mm), com partículas de 5 µm
Fase Móvel	Acetonitrila : Água (930:70, v/v) com pH 2,7
Fluxo	1,0 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura do forno	30° C
Tempo de corrida	7 minutos
Comprimentos de onda	304 nm (3,4-MBC) e 352 nm (BMDM)

3.2.6.2 Preparo dos padrões de trabalho

Uma solução estoque contendo 500 µg/mL de BMDM e 400 µg/mL de 3,4-MBC foi preparada por meio da solubilização de cerca de 0,02 g de 3,4-MBC e de 0,025 g de BMDM, padrões de trabalho, em balão volumétrico de 50,0 mL, com auxílio de 10 mL de etanol P.A. Após levar ao ultra-som por 5 minutos, até total solubilização, completou-se o volume com a fase móvel. A partir da solução estoque, foram obtidas cinco diluições, usando a fase móvel como solvente, nas concentrações de 16, 28, 40, 56 e 80 µg/mL de 3,4-MBC e de 20, 35, 50, 70 e 100 µg/mL de BMDM, para a construção da curva de calibração.

Todas as soluções foram filtradas através de filtros descartáveis com membranas Millipore (millex®) de 0,45 µm de diâmetro de poro, previamente à injeção.

3.2.6.3 Preparo das amostras

Foram pesados 0,5g da formulação gel Natrosol® com filtros solares livres em balões volumétricos de 100,0mL. Foram diluídos com 25mL de água destilada e completado o

volume com etanol. As soluções foram levadas ao banho de ultra-som por 15 minutos. Após total solubilização dos componentes ativos da formulação, o volume foi completado com etanol e realizada nova diluição. Uma alíquota de 10,0mL foi transferida para um balão volumétrico de 50,0mL, sendo o volume completado com a fase móvel.

Todas as soluções foram filtradas através de filtros descartáveis com membranas Millipore (millex[®]) de 0,45µm de diâmetro de poro, previamente à injeção.

O mesmo procedimento para o preparo da amostras foi tomado para a análise do gel com os filtros solares 3,4-MBC e BMDM inclusos no lipossoma.

3.2.6.4 Validação da metodologia analítica por CLAE

A validação de um método analítico deve garantir que o mesmo atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo de linearidade, precisão, sensibilidade e exatidão adequadas à análise (BRASIL, 2003). Três fontes oficiais estabelecem os critérios requeridos para a validação: US Food and Drug Administration (FDA), United States Pharmacopeia (USP) e a International Conference Harmonization (ICH). No Brasil, a legislação vigente como guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, é a RE nº 899 (BRASIL, 2003).

De acordo com a RE nº 899 (2003), no caso de inexistência de substâncias de referência oficializadas pela Farmacopéia Brasileira, ou na ausência destas, por outros códigos autorizados pela legislação vigente, é admitido o uso de padrões de trabalho, desde que a identidade e o teor sejam comprovados (BRASIL, 2003).

A metodologia proposta foi inicialmente validada para a formulação gel de Natrosol[®] contendo 3,4-MBC e BMDM.

3.2.6.4.1 Especificidade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como, impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003). A especificidade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a especificidade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (RIBANI *et al.*, 2004).

A especificidade pode ser obtida de várias maneiras. A primeira forma de avaliá-la é comparando a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, que deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra. Uma segunda maneira é pela avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão e utiliza-se isto como uma indicação da presença do composto puro. Estas duas maneiras são as mais utilizadas (RIBANI *et al.*, 2004).

Neste trabalho, a especificidade foi determinada comparando os cromatogramas obtidos na análise da formulação do gel base, contendo apenas os excipientes, frente à formulação contendo os filtros solares.

3.2.6.4.2 Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003).

A linearidade do método foi determinada através da construção de duas curvas de calibração para cada filtro solar, em dois dias diferentes. Para isso, foram preparadas soluções de 3,4-MBC e BMDM, a partir de uma solução estoque, nas concentrações de 16, 28, 40, 56 e

80 µg/mL de MBC e 20, 35, 50, 70 e 100 µg/mL de BMDM, sendo cada ponto injetado três vezes no sistema de cromatografia. Com os dados obtidos, construiu-se uma curva de calibração com as concentrações dos filtros versus a resposta gerada (área). Determinou-se a equação da reta através de análise da regressão linear das curvas, calculando-se o intercepto, a inclinação e o coeficiente de correlação (r) obtido das réplicas analisadas.

A cada dia de trabalho, foi realizada uma nova curva de calibração de três pontos, no mínimo, sendo três injeções para cada ponto e a equação da reta foi utilizada para o cálculo da concentração dos ativos na formulação.

3.2.6.4.3 Precisão

Consiste na avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra e pode ser considerada em três níveis: repetibilidade (precisão intra-corrída), precisão intermediária (precisão inter-corrídas) e reprodutibilidade (precisão interlaboratorial) (BRASIL, 2003).

A repetibilidade deve ser avaliada por, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja três concentrações baixa, média e alta, com três réplicas cada ou mínimo de 6 determinações na concentração média da concentração teste (BRASIL, 2003). Para verificá-la foi realizada a análise do teor da formulação desenvolvida. Foram preparadas seis réplicas de cada solução da formulação e injetada três vezes no sistema cromatográfico. Foi calculado o teor de filtros presentes na formulação, o desvio padrão (dp) e o desvio padrão relativo (DPR).

A precisão intermediária foi determinada repetindo-se o mesmo procedimento executado para a repetibilidade, em outro dia, e os resultados obtidos foram avaliados pela concordância entre os resultados.

3.2.6.4.4 Precisão do volume de injeção

Para avaliar a precisão de injeção, foram realizadas 10 injeções da solução padrão dos filtros solares, na concentração de trabalho de cada filtro solar, ou seja, 40 µg/mL para o 3,4-MBC e 50 µg/mL para o BMDM.

3.2.6.4.5 Exatidão

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro e deve ser determinada, após o estabelecimento da linearidade e da especificidade, sendo verificada a partir de no mínimo 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja três concentrações baixa, média e alta, com três réplicas cada (BRASIL, 2003).

O ensaio foi realizado adicionando quantidades conhecidas dos padrões de trabalho em um gel contendo uma mistura dos componentes da formulação, método conhecido como placebo contaminado.

Foi adicionado, em torno de 0,32 g, 0,40 g e 0,48 g, correspondendo a 80%, 100% e 120%, respectivamente de 3,4-MBC em formulação gel base, de 10,0 g, contendo apenas os excipientes da formulação. O mesmo procedimento foi realizado para o 3,4-MBC, sendo adicionado cerca de 0,42 g, 0,50 g e 0,60 g, correspondendo a 80%, 100% e 120%, respectivamente de BMDM em formulação gel base, de 10,0 g, contendo apenas os excipientes da formulação.

Foram pesados 0,5 g das formulações contaminadas contendo 80%, 100% e 120% dos ativos em balões volumétricos de 100,0 mL e diluídos com 25 mL de água destilada e etanol. As soluções foram levadas ao banho de ultra-som por 15 minutos e o volume foi completado com etanol e realizada nova diluição, em que uma alíquota de 10,0 mL foi transferida para um

balão volumétrico de 50,0 mL, sendo o volume completado com a fase móvel. Cada concentração foi avaliada em triplicata.

3.2.6.4.6 Robustez

Avalia a capacidade do método analítico de resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. No caso da cromatografia líquida, alguns fatores podem ser considerados na determinação da robustez, como a variação na composição da fase móvel, variação do pH da fase móvel, temperatura e fluxo da fase móvel e diferentes lotes ou fabricantes de coluna (BRASIL, 2003).

Para o método analítico proposto foram considerados os parâmetros: variação no fluxo da fase móvel entre 0,5 a 1,5 mL/min e mudança de equipamento.

3.2.7 Determinação do FPS *in vitro* das formulações desenvolvidas

A determinação do FPS foi realizada *in vitro* pelo método espectrofotométrico desenvolvido por Mansur e colaboradores que verifica o comportamento da preparação fotoprotetora na faixa de 290 a 320 nm (MANSUR *et al.*, 1986). A concentração final foi de 0,2 mg/mL. O FPS foi determinado em triplicata e calculado de acordo com a **EQUAÇÃO 1**.

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

EQUAÇÃO 1: Cálculo do FPS segundo Mansur (MANSUR *et al.*, 1986).

Onde:

FC – Fator de Correção (igual a 10)

EE (λ) – Efeito eritemogênico da radiação no comprimento de onda (λ)

I (λ) – Intensidade da luz solar no comprimento de onda (λ)

Abs (λ) – valor espectrofotométrico para a absorbância no comprimento de onda (λ) da substância ou da preparação.

Os valores EE(λ) x I(λ) são tabelados e apresentam um valor correspondente a cada comprimento de onda, conforme demonstrado no **Quadro 1**.

Quadro 1: Valores do efeito eritematogênico e intensidade de radiação na faixa do UVB, normalizados para a determinação de FPS por espectrofotometria (SAYRE *et al.*, 1979).

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

O FPS foi determinado para as preparações lipossomais e as formulações gel de Natrosol[®] com os filtros solares inclusos e não inclusos nos lipossomas. Vale lembrar que essa faixa de comprimento de onda é característica de filtros que absorvem na região do UVB, por isso a determinação do FPS da preparação lipossomal só foi realizada para lipossomas contendo 3,4-MBC e não para lipossomas que incorporavam BMDM, pois este último é um filtro que absorve predominantemente na faixa do UVA.

3.2.8 Determinação da solubilidade dos filtros solares em diferentes meios

A solubilidade dos filtros solares, 3,4-MBC e BMDM, foi avaliada nos meios abaixo relacionados, os quais seriam utilizados nos estudos de liberação dos ativos das formulações:

- Tampão fosfato pH 7,4 com polissorbato (poli) 80 nas concentrações de 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0% (p/v);
- Tampão fosfato pH 7,4 com 2,0% (p/v) poli 80 e etanol 30% (v/v) (MOTA, 2005);

Cerca de 7 mL do meio a ser testado e um excesso de 3,4-MBC e BMDM, matérias-primas, foram colocados em um bécher, de modo a obter uma suspensão. Os bécheres foram mantidos por 24 horas sob agitação magnética e mantidos à temperatura ambiente (25° C). Decorrido esse tempo, o conteúdo do bécher foi transferido para um tubo falcon que foi centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos, e o sobrenadante filtrado em filtro descartável de 0,45 µm de porosidade. A solução resultante da filtração foi analisada por CLAE, sendo necessário proceder a diluição da amostra com os respectivos meios. O método de análise inclui coluna Shimpack® CLC-ODS aquecida a 30°C, fase móvel composta por acetonitrila e água (930:70 v/v) com vazão de 1 mL/min e detecção em 304 nm e 352 nm.

A partir dos valores das áreas de cada amostra e da curva de calibração obtida para cada meio, obtiveram-se os valores de concentração do 3,4-MBC e do BMDM, em µg/mL, que multiplicadas pelo fator de diluição, forneceram a concentração de saturação dos filtros solares em cada meio, nas condições empregadas.

3.2.9 Liberação *in vitro* através de membrana sintética

3.2.9.1 Preparo da membrana sintética

Pedaços de aproximadamente 5x5 cm de membrana de acetato de celulose foram cortados. A membrana foi aberta em água destilada e as suas laterais foram cortadas. Os pedaços da membrana foram fervidos em cerca de 50 mL de água destilada por 5 minutos, repetindo-se o procedimento por três vezes com novo volume de água destilada (BENTLEY & LOPEZ, 2002).

3.2.9.2 Montagem da célula de difusão tipo Franz

As células de difusão tipo Franz foram presas na placa agitadora. Os agitadores magnéticos foram introduzidos nas células e as conexões foram colocadas nas aberturas de amostragem e reposição da solução receptora (SR). O compartimento receptor foi preenchido com 7 mL de tampão fosfato pH 7,4 contendo 4% de polissorbato 80, ou seja, a solução receptora escolhida nos ensaios de solubilidade dos filtros solares. A membrana de acetato de celulose hidratada foi disposta na célula, evitando a formação de bolhas. O sistema foi deixado por 30 minutos com uma agitação de 500 rpm para alcançar o equilíbrio. Decorrido este tempo, foi colocado acima da membrana um anel de teflon que teve o seu orifício preenchido com 400 μ L de formulação, sendo esta ocluída por disco de teflon. A área disponível para a difusão da formulação na célula de Franz foi 1,96 cm². O sistema foi fechado com uma garra metálica e mantida a agitação de 500 rpm.

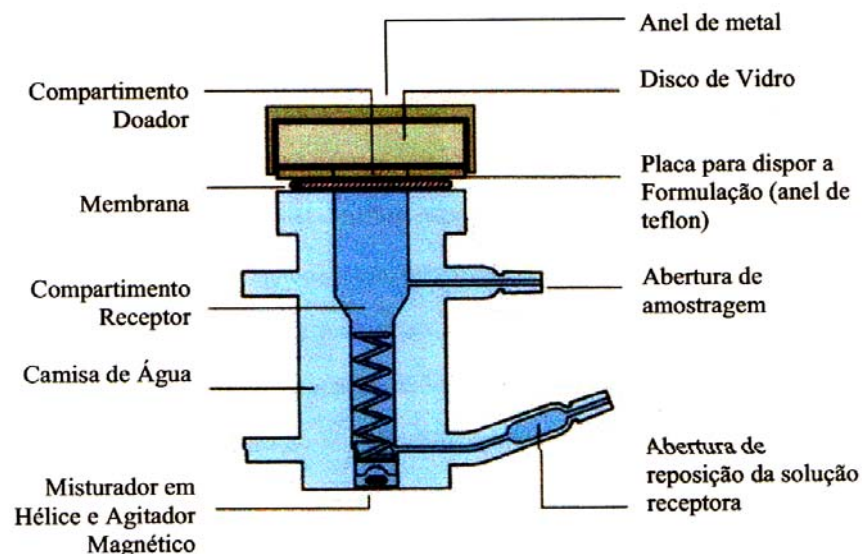


FIGURA 11: Representação esquemática de uma célula de Franz.
Adaptado da Hanson Research Corporation – Cell Manual

Alíquotas de 1 mL da amostra foram retiradas após 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos da aplicação da formulação e submetidas à análise por CLAE, utilizando coluna Shimpack® CLC-ODS aquecida a 30°C, fase móvel composta por acetonitrila e água (930:70 v/v) com vazão de 1 mL/min e detecção em 304 nm e 352 nm. A retirada da amostra foi realizada através da adição de 1 mL de SR, com auxílio de seringa, por meio da abertura de reposição de SR, localizada no braço inferior da célula, sendo igual volume deslocado por meio da abertura de amostragem localizada no braço superior da célula.

Para uma análise quantitativa foram calculadas as massas de filtros solares acumuladas no compartimento receptor, em cada tempo de estudo, considerando a área efetiva para a liberação na célula, a quantidade dos ativos retirada nas coletas e o volume total da célula.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILTROS SOLARES USADOS COMO PADRÃO

4.1.1 Determinação do ponto de fusão

Os dados de ponto de fusão determinados para o 3,4-MBC e o BMDM obtido pelo método descrito na **seção 3.2.1**, estão apresentados na **TABELA 4**.

TABELA 4: Determinação do ponto de fusão dos filtros solares em estudo

Filtro Solar	Ponto de Fusão literatura	Ponto de Fusão determinado (n = 3)	Resultado
3,4-MBC	66-68°C *	67,8°C	De acordo
BMDM	81-86°C **	84,2°C	De acordo

*Enciclopédia de Absorvedores de UV para Produtos com Filtro Solar, 1995.

**USP 30, 2007.

Os valores encontrados para ambos os filtros solares estão de acordo com o especificado pela literatura.

4.1.2 Análise do espectro de absorção na região ultravioleta

O espectro de absorção obtido a partir de uma solução de BMDM 10 µg/mL em metanol mostrou que a molécula apresenta uma absorção máxima em 358 nm, conforme ilustrado na **FIGURA 12a**. Na **FIGURA 12b** está demonstrado o espectro de absorção obtido

a partir de uma solução de 10 µg/mL de 3,4-MBC em metanol, mostrando que a molécula apresenta uma absorção máxima em 300 nm.

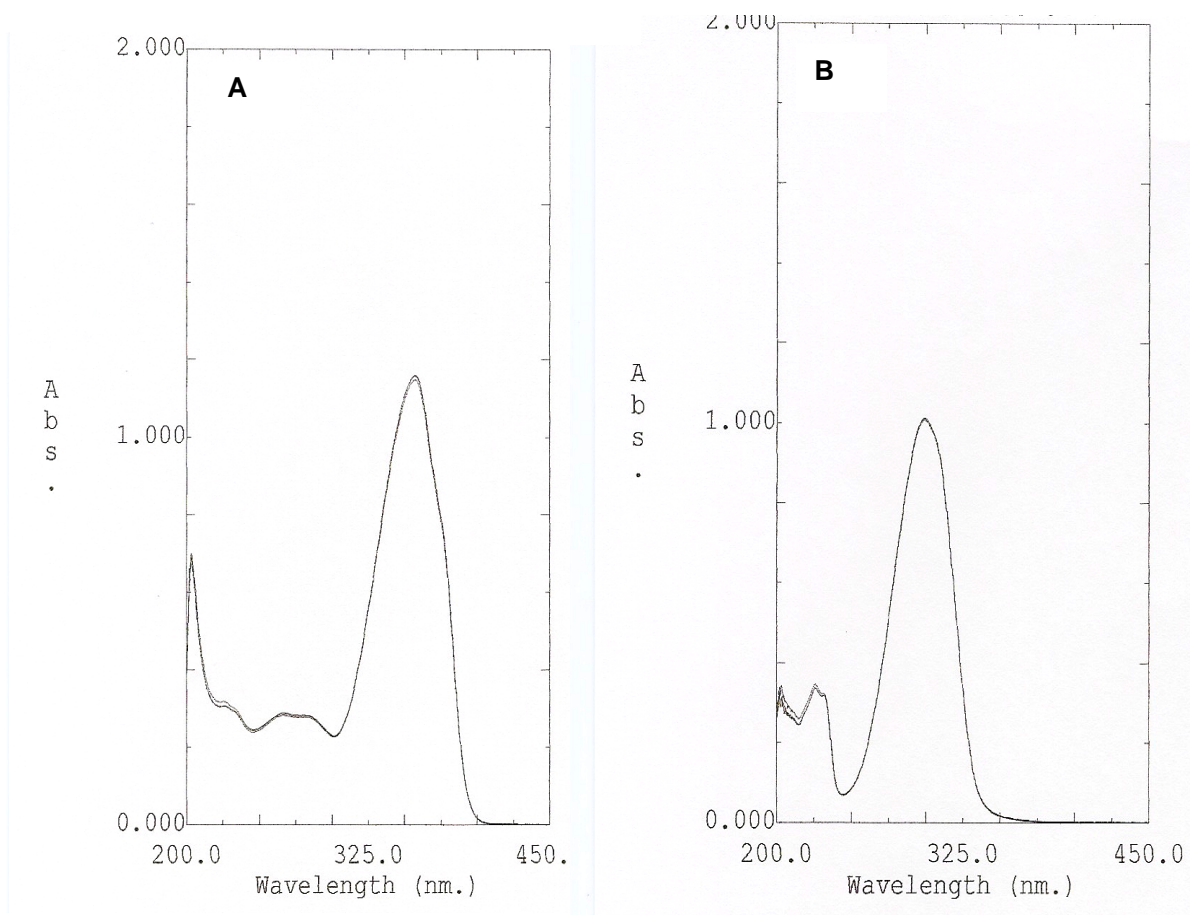


FIGURA 12: Espectros de absorção na região do ultravioleta para os filtros solares em estudo. A) BMDM a 10 µg/mL B) 3,4-MBC a 10 µg/mL. Abs corresponde a absorbância e wavelength corresponde a comprimento de onda.

Na avaliação de cada espectro pôde-se determinar o λ máximo, a absorbância máxima e calcular a absortividade molar. Estes dados contribuíram para a identificação dos filtros solares. A **TABELA 5** contém algumas características no UV encontradas na análise do 3,4-MBC e BMDM.

TABELA 5: Caracterização dos filtros solares em estudo, utilizando metanol como solvente.

Características no UV	BMDM	3,4-MBC
Comprimento de onda máximo (λ)	358 nm	300 nm
Absorbância máxima encontrada	1,1534	1,0088
Absorbância específica ($A^{1\%}_{1\text{cm}}$)	1151	990
Absorbância específica literatura ($A^{1\%}_{1\text{cm}}$)*	Min 1100	930-990
Absortividade molar (ϵ)	35686	25183
Absortividade molar literatura (ϵ)**	34720	24500

* segundo laudo do fabricante

** segundo literatura (Enciclopédia de Absorvedores de UV para Produtos com Filtro Solar, 1995).

Pelos dados encontrados nas determinações realizadas quando comparados com os valores da literatura pode-se avaliar que ambos os filtros solares estavam de acordo com as especificações.

4.1.3 Análise do espectro de absorção na região do infravermelho

Os espectros de IV são provocados pelos diferentes modos de interação da radiação eletromagnética com a molécula (vibração e rotação), considerada a impressão digital do composto. As **FIGURAS 13 e 14** apresentam os espectros de IV do 3,4-MBC e do BMDM, respectivamente.

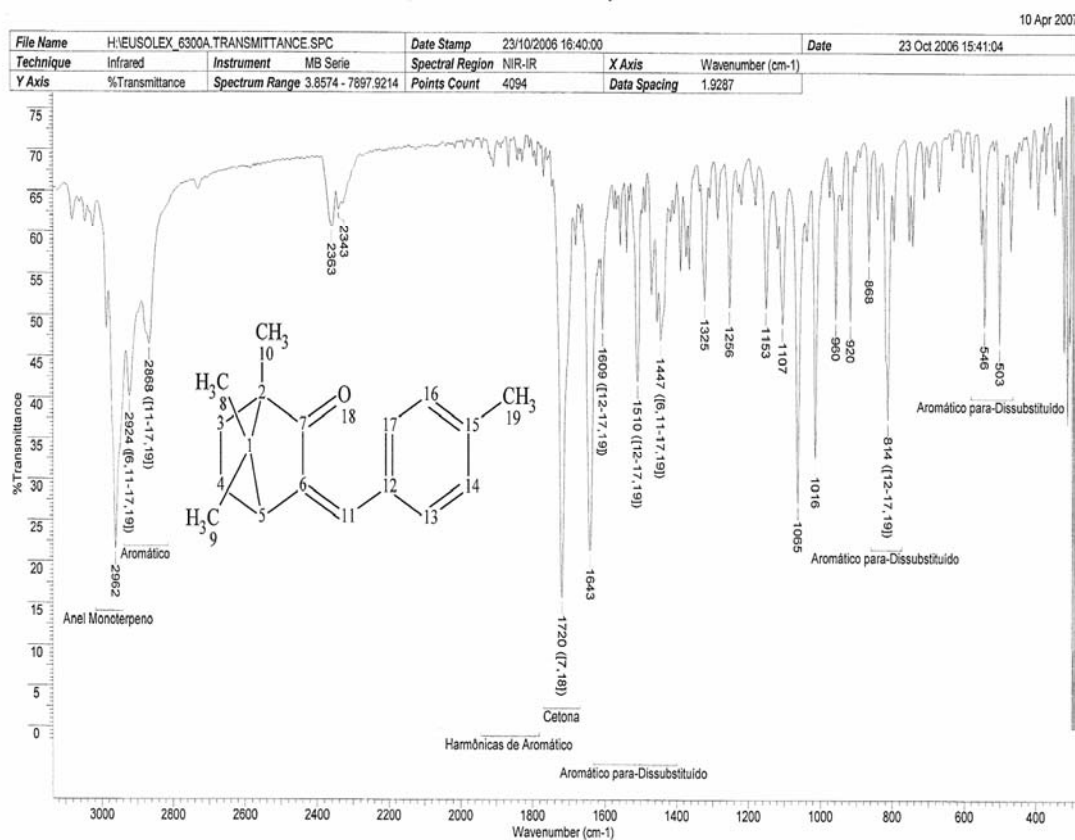


FIGURA 13: Espectro de IV do 3,4-MBC avaliado como padrão de trabalho.

O espectro de IV obtido demonstrou possuir todas as bandas características da molécula do 3,4-MBC. As bandas principais são 2924, 2868 cm^{-1} , características de anel aromático, banda em 2962 cm^{-1} , característica de anel monoterpene. A banda 1720 cm^{-1} indica presença de grupos cetona e, por fim, as bandas características de anel aromático para-substituído são: 1609, 1510, 1447, 814, 546 e 503 cm^{-1} .

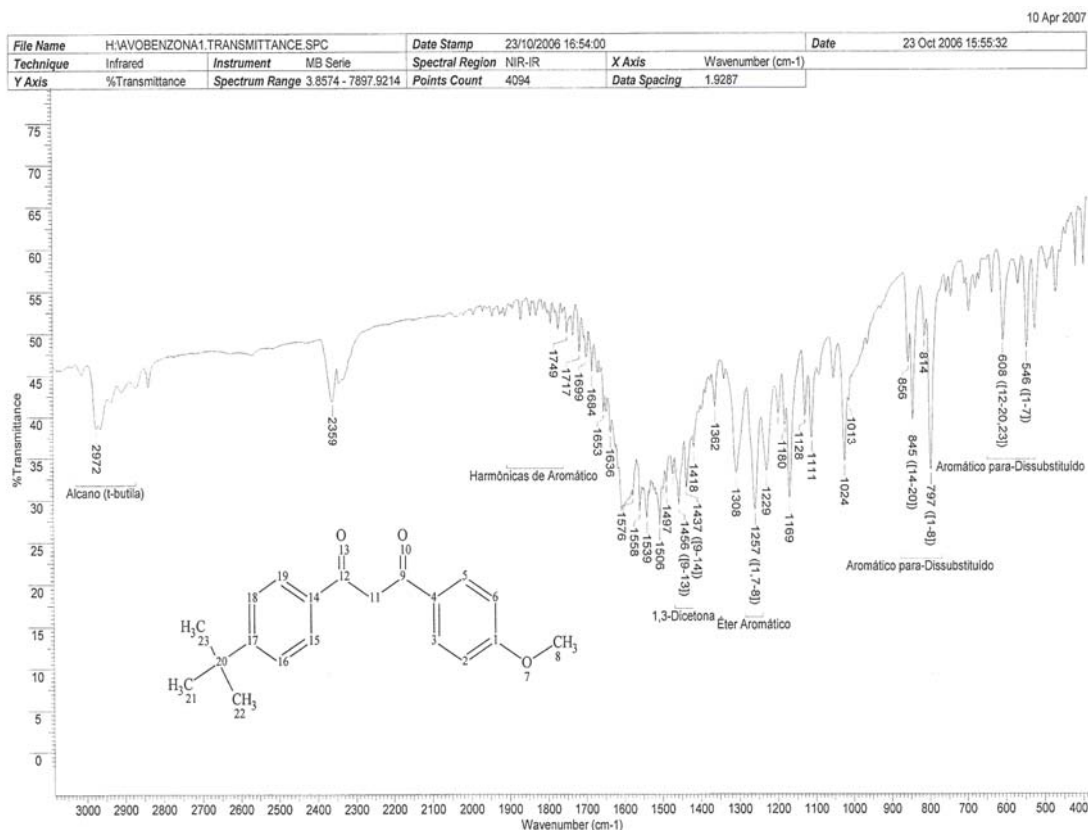


FIGURA 14: Espectro de IV do BMDM avaliado como padrão de trabalho.

O espectro de IV obtido demonstrou possuir todas as bandas características da molécula do BMDM. As bandas principais são 2972 cm⁻¹, característica de grupos terc-butila; bandas 845, 814, 797, 608 e 546 cm⁻¹ características de anéis aromáticos para-dissubstituídos. As bandas 1456 e 1437 cm⁻¹ são características da presença de 1,3-dicetona e, por fim, a presença das harmônicas de anel aromático nas bandas 1749 e 1717 cm⁻¹.

4.2 Desenvolvimento das Curvas de Calibração

4.2.1 Curva de Ringbom

As curvas de Ringbom foram traçadas com as condições definidas na **seção 3.2.3.1** e são apresentadas nas **FIGURAS 15 e 16**. Os valores de absorbância foram utilizados para o cálculo dos percentuais de transmitância (%T) pela relação $\%T = 1 / 10^{\text{abs}} \times 100$, sendo também calculado o logaritmo de cada concentração (log C). Os valores são apresentados nas **TABELAS 6 e 7**.

A **TABELA 6** determina os valores utilizados para a construção da curva de Ringbom para o 3,4-MBC. A melhor faixa de concentração para ser utilizada na quantificação de 3,4-MBC ficou estabelecida entre 2 e 10 µg/mL conforme determinado na **FIGURA 15**.

TABELA 6: Valores utilizados para a construção da curva de Ringbom para o 3,4-MBC.

Concentração real (µg/mL)	Abs*	Log C (µg/mL)	% T**
0,39	0,0453	-0,398	90,09
0,80	0,0853	-0,097	82,17
0,99	0,1031	-0,0004	78,87
1,99	0,1959	0,300	63,69
3,99	0,3910	0,602	40,64
5,99	0,5920	0,777	25,58
7,99	0,8046	0,903	15,68
9,99	0,9954	0,999	10,11
19,98	2,0047	1,300	0,989
29,97	2,9090	1,476	0,123
39,96	3,8197	1,602	0,015
49,95	4,3399	1,698	0,004

*Abs corresponde absorbância

**T corresponde transmitância

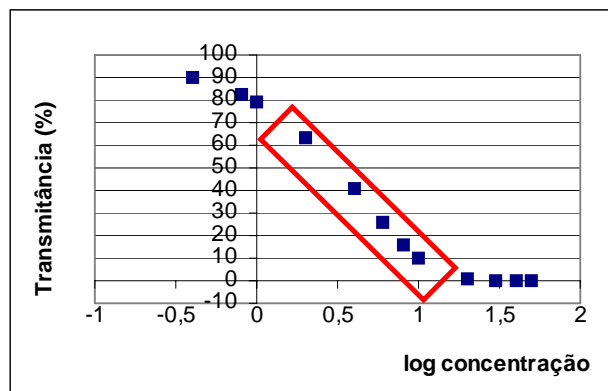


FIGURA 15: Curva de Ringbom obtida a partir da solução de 3,4-MBC em etanol nas concentrações de 0,39 a 49,95 µg/mL, determinadas no UV a 300nm.

A **TABELA 7** indica os valores utilizados para a construção da curva de Ringbom para o BMDM. A melhor faixa de concentração para ser utilizada na quantificação deste filtro ficou estabelecida entre 2 e 10 µg/mL conforme determinado na **FIGURA 16**.

TABELA 7: Valores utilizados para a construção da curva de Ringbom para o BMDM.

Concentração real (µg/mL)	Abs	Log C (µg/mL)	% T
0,41	0,0465	-0,384	89,85
0,83	0,1138	-0,083	76,95
1,03	0,1315	0,013	73,87
2,06	0,2538	0,315	55,74
4,12	0,5021	0,615	31,47
6,19	0,7394	0,792	18,22
8,26	0,9685	0,917	10,75
10,32	1,2297	1,014	5,89
20,64	2,4154	1,315	0,38
30,96	3,8177	1,491	0,015
41,28	5,0001	1,616	0,001

*Abs corresponde absorvância

**T corresponde transmitância

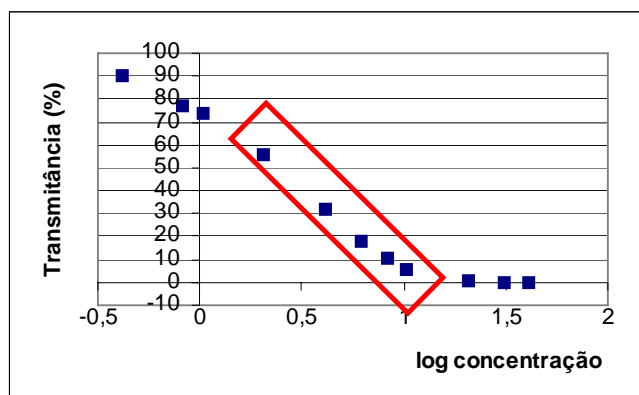


FIGURA 16: Curva de Ringbom obtida a partir da solução de BMDM em etanol nas concentrações de 0,41 a 41,28 µg/mL, determinadas no UV a 358nm.

4.2.2 Curvas de calibração

A curva de calibração média para o 3,4-MBC apresenta cinco pontos com concentrações variando de 2 até 10 µg/mL. A reta de calibração apresentou coeficiente de correlação (r) 0,9998 e equação da reta $y = 0,0937x - 0,0059$ (**FIGURA 17**). O coeficiente de correlação linear acima de 0,99 indica linearidade adequada (BRASIL, 2003). A **TABELA 8** demonstra as respostas obtidas pelas curvas de calibração do 3,4-MBC em cada dia de análise.

TABELA 8: Respostas obtidas pelas curvas de calibração do 3,4-MBC em cada dia de análise.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Média ± dp
Inclinação (a)	0,0894	0,0954	0,0962	$0,0937 \pm 0,0037$
Intercepto (b)	-0,0217	0,0011	0,0027	$- 0,0059 \pm 0,0136$
Coeficiente de determinação (R^2)	0,9991	0,9999	0,9999	$0,9996 \pm 0,0004$
Coeficiente de correlação(r)	0,9995	0,9999	0,9999	$0,9998 \pm 0,0002$

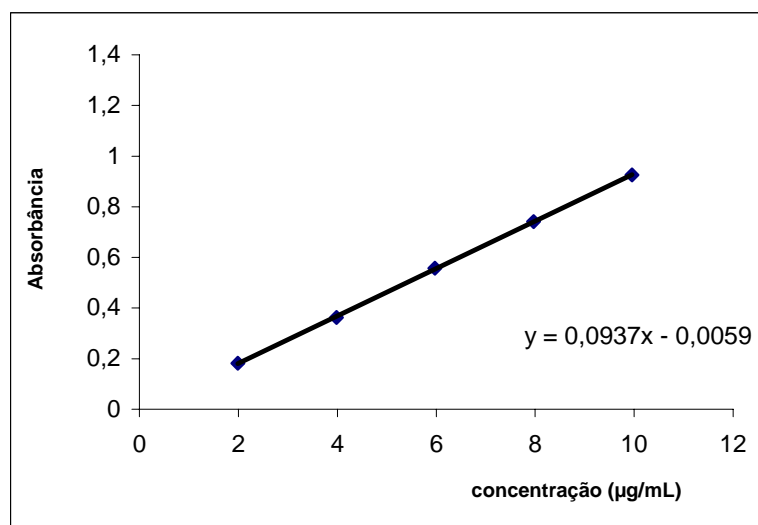


FIGURA 17: Representação da curva de calibração do 3,4-MBC por espectrofotometria de ultravioleta (UV) utilizando como solvente etanol P.A. $y = ax + b$, onde y = variável dependente (absorbância), x = variável independente (concentração em $\mu\text{g/mL}$), a = coeficiente angular da reta, b = coeficiente linear da reta.

A curva de calibração para o BMDM apresenta cinco pontos com concentrações variando de 2 a 10 $\mu\text{g/mL}$. A curva elaborada apresentou a equação da reta: $y = 0,1189x - 0,0092$, com um coeficiente de correlação linear (r) 0,9999, demonstrando uma relação linear para as concentrações escolhidas (RIBANI *et al.*, 2004) (**FIGURA 18**). A **TABELA 9** representa as respostas obtidas pelas curvas de calibração do BMDM em cada dia de análise.

TABELA 9: Respostas obtidas pelas curvas de calibração do BMDM em cada dia de análise.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Média \pm dp
Inclinação (a)	0,1183	0,1158	0,1226	$0,1189 \pm 0,0034$
Intercepto (b)	-0,0246	-0,0002	-0,0027	$-0,0092 \pm 0,0134$
Coeficiente de determinação (R^2)	0,9997	0,9996	0,9997	$0,9997 \pm 0,00005$
Coeficiente de correlação(r)	0,9999	0,9998	0,9999	$0,9999 \pm 0,00005$

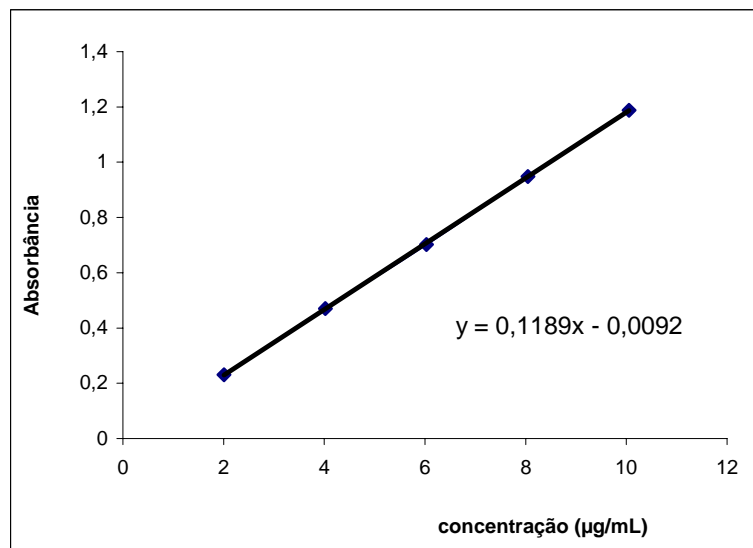


FIGURA 18: Representação da curva de calibração do BMDM por espectrofotometria de ultravioleta (UV), utilizando como solvente etanol P.A. $y = ax + b$, onde y = variável dependente (absorbância), x = variável independente (concentração em µg/mL), a = coeficiente angular da reta, b = coeficiente linear da reta.

4.3 ANÁLISE DOS LIPOSSOMAS COM 42 mM DE FOSFOLIPÍDIO PREPARADOS PELO MÉTODO DE HIDRATAÇÃO DO FILME LIPÍDICO

4.3.1 Determinação da quantidade de filtros solares e fosfolipídio nas preparações lipossomais

Os lipossomas foram analisados a fim de determinar a relação de incorporação dos filtros solares. As análises necessárias foram: teor do filtro, teor de fósforo que corresponde à quantidade de fosfatidilcolina que forma a vesícula fosfolipídica e determinação do FPS *in vitro*.

Para o cálculo do teor de filtro solar incorporado nos lipossomas utilizou-se a curva de calibração determinada anteriormente e diluiu-se as frações das suspensões lipossomais em etanol P.A de forma a ter a concentração equivalente ao ponto central da curva de calibração. A leitura da absorbância foi lida em espectrofotômetro UV/VIS no comprimento de onda específico para cada filtro solar em análise. No exemplo da **FIGURA 19** pode-se observar a diferença existente entre a fração sem filtrar e a fração que passou por uma coluna gel sephadex[®]G-50, evidenciando-se, assim, a retenção dos filtros que estão fora dos lipossomas.

O método é de fácil execução, rápido e não se observa nenhuma interferência nos comprimentos de onda máximo de absorção dos filtros solares, já que os lipídios utilizados na preparação dos lipossomas são detectados na região de 203 - 205 nm do espectro de absorção (VEMURI & RHODES, 1995). Sendo assim, o método apresenta-se muito adequado para uma análise quantitativa das preparações lipossomais com filtros solares.

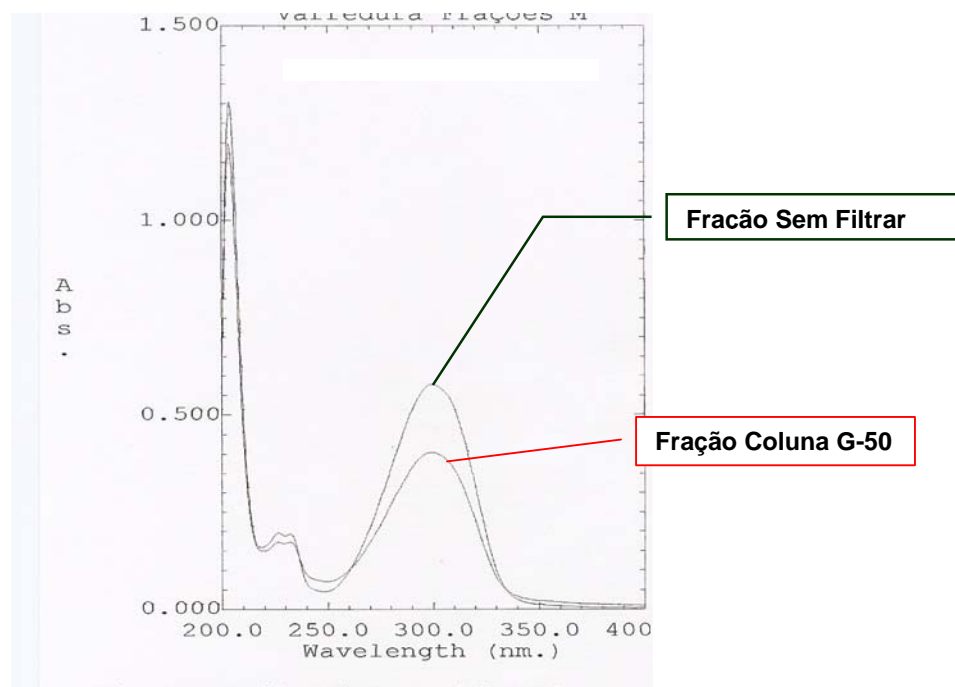


FIGURA 19: Espectro de varredura das frações sem filtrar e filtrada em coluna gel Sephadex® G-50 das suspensões lipossomais diluídas em etanol P.A. para a análise quantitativa do 3,4-MBC em lipossomas com 42 mM de fosfolipídio com a inclusão de 8,4 mM de 3,4-MBC.

Com o intuito de analisar a quantidade de fosfolipídio presente, o método de Bartlett foi empregado (BARTLETT, 1959). A cada análise foi realizada uma curva de calibração para o conteúdo de fósforo, utilizando uma solução padrão de fósforo de 0,65 mM já que o percentual de fosfolipídios presentes na amostra foi estabelecido através da curva de calibração construída. Além disso, para o cálculo do teor de fosfolipídio é necessário utilizar o valor da massa de Phospholipon® 90 pesada no preparo do lipossoma, os valores de absorbância obtidos para cada amostra analisada e a equação da reta obtida na curva de calibração de fósforo. A curva de calibração de fósforo apresenta quatro pontos com concentrações variando de 0,9988 µg/ml a 3,9951 µg/ml da solução padrão de fósforo. A absorbância de cada padrão foi determinada por espectrofotometria no UV/VIS no comprimento de onda de 800 nm, segundo ilustrado na **FIGURA 20**.

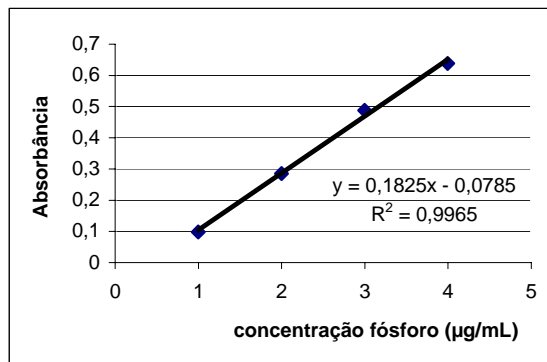


FIGURA 20: Representação de uma das curvas de calibração de fósforo utilizada para a determinação do teor de fosfolípidios nas frações de lipossomas por espectroscopia no UV/VIS. $y = ax + b$, onde y = variável dependente (absorbância), x = variável independente (concentração em µg/mL), a = coeficiente angular da reta, b = coeficiente linear da reta, R^2 = coeficiente de determinação.

Os resultados encontrados para os lipossomas com 42 mM de fosfolípido (lipossomas 42 mM) e com a inclusão de 6,3; 8,4; 9,6 e 10,5 mM de 3,4-MBC pelo método de hidratação do filme lipídico estão apresentados na **TABELA 10**.

TABELA 10: Determinação do teor de fósforo, teor de 3,4-MBC e FPS nos lipossomas com Phospholipon® 90 a 42mM variando-se a concentração de 3,4-MBC.

Concentrações do 3,4-MBC nos lipossomas	Frações do lipossoma	Teor de Fósforo (%) (n = 3)	Teor de Filtro (%) (n = 3)	FPS (n=3)
6,3 mM	sem filtrar	79,81 ± 0,672	103,78 ± 0,681	0,31 ± 0,037
	membrana 0,4 µm	77,31 ± 0,922	99,77 ± 0,845	0,27 ± 0,002
	membrana 0,2 µm	74,07 ± 1,989	99,06 ± 0,573	0,27 ± 0,004
	coluna	59,69 ± 1,123	96,55 ± 0,744	0,26 ± 0,003
8,4 mM	sem filtrar	75,71 ± 1,585	99,18 ± 0,639	0,36 ± 0,025
	membrana 0,4 µm	82,18 ± 1,462	98,76 ± 0,453	0,38 ± 0,022
	membrana 0,2 µm	77,82 ± 0,681	89,53 ± 0,448	0,34 ± 0,050
	coluna	77,09 ± 1,473*	74,65 ± 0,535*	0,24 ± 0,019
9,6 mM	sem filtrar	118,77 ± 3,632	107,10 ± 0,275	0,40 ± 0,019
	membrana 0,4 µm	101,97 ± 3,875	59,22 ± 0,458	0,25 ± 0,025
	membrana 0,2 µm	91,86 ± 2,468	58,80 ± 0,375	0,25 ± 0,012
	coluna	89,16 ± 1,929	60,25 ± 0,275	0,24 ± 0,014
10,5 mM	sem filtrar	97,79 ± 2,164	103,40 ± 0,104	0,43 ± 0,038
	membrana 0,4 µm	103,75 ± 1,849	86,65 ± 0,628	0,37 ± 0,014
	membrana 0,2 µm	100,55 ± 0,970	79,46 ± 0,306	0,31 ± 0,016
	coluna	92,60 ± 0,460	57,39 ± 0,270	0,21 ± 0,031

média ± dp, com n = 3 para cada fração lipossomal

*A melhor correlação entre a quantidade de material de membrana e a quantidade de filtro.

Os primeiros lipossomas preparados possuíam 6,3 mM de 3,4-MBC. Pelos resultados apresentados na **TABELA 10**, observou-se uma perda do fosfolipídio, material de membrana do lipossoma desde o início da preparação, indicando algum problema de preparo desta amostra e após a retirada do material não encapsulado, também ocorreu uma queda de 20% dos fosfolipídios após a passagem pela coluna gel Sephadex[®] G-50. Porém, o filtro solar incluído neste lipossoma apresentou uma queda de apenas 7% do total de filtro adicionado, evidenciando que seria possível incluir uma maior quantidade de filtro solar. Desta forma, foram preparados lipossomas com uma maior concentração de filtro solar incluso, e escolheu-se as concentrações de 9,6 mM e 10,5 mM de 3,4-MBC. Analisando os lipossomas com 9,6 mM de 3,4-MBC, a queda da quantidade de 3,4-MBC inicial ficou em torno de 46% e de fosfolipídios 29%, após passagem pela coluna de gel Sephadex[®] G-50. Os resultados para os lipossomas na concentração de 10,5 mM apontaram uma queda de filtro solar de 46% e de fosfolipídios 5%. Esses resultados demonstraram que deveria haver uma quantidade de 3,4-MBC a ser incorporada nos lipossomas que estaria entre 6,3 mM e 9,6 mM. Sendo assim, lipossomas com 8,4 mM de 3,4-MBC foram preparados.

Os resultados apresentados na **TABELA 10** indicam que a relação de aprisionamento mais adequada foi obtida com os lipossomas 42 mM com 8,4 mM de 3,4-MBC, visto que as perdas de fosfolipídio e filtro solar foram equivalentes, ou seja, há uma proporção adequada entre quantidade de filtro solar incorporado no lipossoma e material de membrana, após passar o lipossoma pela coluna de gel Sephadex[®] G-50, indicando que o material está incluso no lipossoma.

Dessa forma, foram preparadas mais duas formulações lipossômicas com 8,4 mM de 3,4-MBC, sendo os resultados das três formulações mostrados na **TABELA 11**.

TABELA 11: Determinação em triplicata do teor de fósforo, do filtro solar 3,4-MBC e do FPS *in vitro* para avaliar a sua inclusão nos lipossomas com Phospholipon® 90 a 42 mM e com 8,4 mM de 3,4-MBC.

Formulação Lipossomal	Frações do lipossoma	Teor de Fósforo (%) (n = 3)	Teor de Filtro (%) (n = 3)	FPS (n = 3)
1	sem filtrar	75,71 ± 1,585	99,18 ± 0,639	0,36 ± 0,025
	membrana 0,4 µm	82,18 ± 1,462	98,76 ± 0,453	0,38 ± 0,022
	membrana 0,2 µm	77,82 ± 0,681	89,53 ± 0,448	0,34 ± 0,050
	coluna	77,09 ± 1,473	74,65 ± 0,535	0,24 ± 0,019
2	sem filtrar	95,73 ± 1,963	103,72 ± 0,272	0,32 ± 0,012*
	membrana 0,4 µm	85,29 ± 2,780	92,12 ± 0,273	0,26 ± 0,021*
	membrana 0,2 µm	82,51 ± 2,022	85,40 ± 0,545	0,27 ± 0,016*
	coluna	73,24 ± 1,298	72,85 ± 0,449	0,15 ± 0,016*
3	sem filtrar	96,04 ± 9,040	102,07 ± 1,014	0,37 ± 0,024
	membrana 0,4 µm	83,45 ± 4,456	84,26 ± 0,271	0,27 ± 0,038
	membrana 0,2 µm	84,84 ± 1,856	72,39 ± 0,371	0,29 ± 0,044
	coluna	85,31 ± 1,697	75,18 ± 0,627	0,29 ± 0,021

média ± dp, com n = 3 para cada fração lipossomal.

* Foi utilizado um n = 2 nessa determinação.

Os resultados em triplicata apresentados para o filtro solar 3,4-MBC, após a passagem pela coluna gel Sephadex® G-50 demonstraram uma ótima precisão para a inclusão do filtro solar, com DPR de 1,6%, enquanto que para o teor de fósforo o DPR foi de 6,6%. Este alto valor de DPR encontrado para o teor de fósforo deve-se ao método de Bartlett para a determinação dos fosfolipídios, que é muito sensível, porém não facilmente reprodutível (NEW, 1997). Um dos problemas do ensaio é a contaminação por traços de fosfato inorgânico

(NEW, 1997), sendo assim, para minimizar os riscos foram usados tubos de vidro de borossilicato, lavados com água destilada antes de cada análise, com o objetivo de tornar os resultados mais precisos.

Na **TABELA 12** encontram-se os resultados para os lipossomas com 42 mM de fosfolipídio com inclusão de 4,2 mM, 6,3 mM e 8,4 mM de BMDM pelo método de hidratação do filme lipídico.

TABELA 12: Determinação do teor de fósforo e teor do BMDM nos lipossomas com Phospholipon® 90 a 42 mM variando-se a concentração de BMDM.

Concentrações do BMDM nos lipossomas	Frações do lipossoma	Teor de Fósforo (%) (n = 3)	Teor de Filtro (%) (n = 3)
4,2 mM	sem filtrar	124,36 ± 14,178	94,66 ± 0,291
	membrana 0,4 µm	94,03 ± 2,523	92,14 ± 0,291
	membrana 0,2 µm	106,46 ± 10,243	89,47 ± 0,404
	coluna	116,67 ± 7,078	91,44 ± 0,357
6,3 mM	sem filtrar	94,22 ± 3,633	93,49 ± 0,581
	membrana 0,4 µm	77,12 ± 2,850	89,05 ± 0,290
	membrana 0,2 µm	77,70 ± 1,551	90,49 ± 0,660
	coluna	85,13 ± 1,102*	88,02 ± 0,536*
8,4 mM	sem filtrar	92,43 ± 1,168	94,86 ± 0,213
	membrana 0,4 µm	96,11 ± 2,502	69,12 ± 0,376
	membrana 0,2 µm	87,45 ± 7,118	55,25 ± 0,208
	coluna	103,73 ± 3,249	52,21 ± 0,647

média ± dp, com n = 3 para cada fração lipossomal

*A melhor correlação entre a quantidade de material de membrana e a quantidade de filtro.

Conforme exposto na **TABELA 12**, a concentração de 4,2 mM do BMDM após a passagem pela coluna gel Sephadex[®] G-50 apresentou uma boa incorporação do filtro solar no lipossoma e uma pequena perda do material de membrana. A partir disso, optou-se pelo preparo de lipossomas com uma maior concentração de filtro solar, na expectativa de aumentar a quantidade de filtro incluso, sendo escolhida a concentração de 8,4 mM do BMDM. Os resultados do lipossoma nesta concentração mostraram uma perda muito grande de filtro, cerca de 40%, após a passagem pela coluna de gel Sephadex G-50. Sendo assim, escolheu-se uma concentração intermediária de 6,3 mM do BMDM. Os resultados mostraram que nesta concentração houve uma queda de 7% dos fosfolipídios após a passagem pela coluna gel Sephadex[®] G-50, material de formação das lamelas dos lipossomas e uma queda em torno de 9% do total de filtro adicionado. Dessa forma, a relação de aprisionamento foi a mais adequada nesta concentração, devido a pequena perda de filtro solar incorporado, indicando que o material está incluso. Verificou-se que após a passagem dos lipossomas pela coluna gel Sephadex[®] G-50 o teor encontrado para os fosfolipídios e para o filtro solar foram equivalentes.

Portanto, foram preparadas mais duas formulações lipossômicas com 6,3 mM do BMDM, sendo os resultados das três formulações mostrados na **TABELA 13**.

TABELA 13: Determinação em triplicata do teor de fósforo e do filtro solar BMDM para avaliar a sua inclusão nos lipossomas com Phospholipon® 90 a 42 mM com 6,3 mM do filtro solar.

Formulação Lipossomal	Frações do lipossoma	Teor de Fósforo (%) (n = 3)	Teor de Filtro (%) (n = 3)
1	sem filtrar	94,22 ± 3,633	93,49 ± 0,581
	membrana 0,4 µm	77,12 ± 2,850	89,05 ± 0,290
	membrana 0,2 µm	77,70 ± 1,551	90,49 ± 0,660
	coluna	85,13 ± 1,102	88,02 ± 0,536
2	sem filtrar	98,71 ± 0,898	99,69 ± 0,242
	membrana 0,4 µm	81,13 ± 1,135	98,24 ± 0,370
	membrana 0,2 µm	84,91 ± 1,391	91,28 ± 0,505
	coluna	74,32 ± 1,231	85,72 ± 0,691
3	sem filtrar	105,52 ± 0,719	98,03 ± 0,71
	membrana 0,4 µm	77,85 ± 0,439	94,06 ± 0,51
	membrana 0,2 µm	75,53 ± 0,185	90,79 ± 0,43
	coluna	73,95 ± 1,076	91,02 ± 0,65

média ± dp, com n = 3 para cada fração lipossomal

Os resultados em triplicata apresentados para o filtro solar BMDM após a passagem pela coluna gel Sephadex® G-50 demonstraram uma boa precisão para o teor do BMDM com DPR de 2,7%, abaixo de 5%. Contudo, o valor de DPR encontrado para o teor de fósforo foi elevado, 7,2%, como já observado para os lipossomas com 3,4-MBC, possivelmente pelo mesmo motivo.

4.3.2 Caracterização das preparações lipossomais em relação ao tamanho e morfologia das vesículas

Com a determinação dos percentuais de inclusão de cada filtro solar nos lipossomas, foi necessário caracterizá-los em relação ao tamanho e morfologia das vesículas através do espalhamento dinâmico da luz laser e da visualização por microscopia ótica e eletrônica de transmissão.

Na literatura, para avaliar as propriedades morfológicas dos lipossomas, as técnicas mais indicadas são a microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. A técnica de criofratura também tem sido empregada na obtenção de informações relativas à forma. A fim de determinar o tamanho destas vesículas, várias técnicas são descritas como o espalhamento dinâmico da luz laser, microscopia de força atômica, difração da luz laser, entre outras (GOMEZ-HENS & FERNÁNDEZ-ROMERO, 2005; EDWARDS & BAEUMNER, 2006). A técnica de microscopia ótica não é descrita na literatura para este tipo de preparação, devido ao tamanho das vesículas lipossomais estar na faixa de nanômetros. Contudo, com o intuito de buscar uma ferramenta mais acessível, a microscopia ótica foi utilizada como capaz de evidenciar à forma das vesículas lipossomais.

O primeiro passo para a visualização das vesículas foi determinar a diluição que seria utilizada, assim como o solvente a ser empregado. A primeira tentativa foi diluir as amostras em água destilada, porém as partículas adquiriam movimento browniano ao serem colocadas sob lâmina e lamínula, não permitindo fotografar a imagem.

Na literatura foram encontrados alguns diluentes que haviam sido utilizados em amostras de nutrição parenteral, como o propilenoglicol em diversas concentrações e a fixação das amostras com tetróxido de ósmio, sendo que estas tentativas não foram satisfatórias, uma vez que estas substâncias alteram a estrutura microscópica das emulsões (LOBO, 2005).

Estudos anteriores relataram que a diluição para a determinação do tamanho da partícula de amostras de lipossomas preparados com fosfolipídios extraídos de diferentes origens (ovo e soja) deve ser realizada em etanol 25% (v/v), a fim de refletir o real tamanho das partículas nas formulações lipossomais (KIRJAVAINEN *et al.*, 1999; BETZ *et al.*, 2005). Devido a isso, foi realizada a diluição das amostras em etanol 25% (v/v), conseguindo-se boas fotomicroscopias. No entanto, a diluição deve ser feita no momento da determinação, pois o etanol tende a romper as vesículas com o passar do tempo.

A partir da escolha do diluente das amostras, várias diluições foram testadas, para a escolha da que apresentasse melhores resultados, com fotografias de microscopia mais nítidas e com possibilidade de contagem das vesículas. Além disso, foi avaliada a influência do tempo em que as vesículas lipossomais ficaram em contato com o diluente, etanol 25% (v/v).

Foram analisadas as frações sem filtrar e as frações filtradas em membrana 0,2 μm do lipossoma 42 mM com 8,4 mM de 3,4-MBC. A imagem da fração sem filtrar pode ser obtida em campo claro (**FIGURA 21**), visto que os tamanhos das vesículas são maiores, o que permite a visualização sem nenhum outro artifício. Entretanto, para a captura de imagem da fração normalizada em membrana de polycarbonato de 0,4 μm e posteriormente a de 0,2 μm foi necessário utilizar um sistema de contraste de fases, chamado contraste interferencial-diferencial (DIC) (**FIGURA 22**), já que as vesículas apresentam tamanhos em torno de 200 nm, não sendo possível visualizá-las em campo claro. O uso de microscopia com DIC melhora o contraste e permite a visualização nítida das vesículas lipossomais. Contudo, as frações que foram filtradas em coluna gel sephadex[®] G-50 não puderam ser visualizadas, visto que essas vesículas adquiriam movimento browniano.



FIGURA 21: Fotomicroscopia ótica da fração sem filtrar de lipossomas 42 mM com 8,4 mM do 3,4-MBC (campo claro). Aumento de 100x, óleo de imersão.

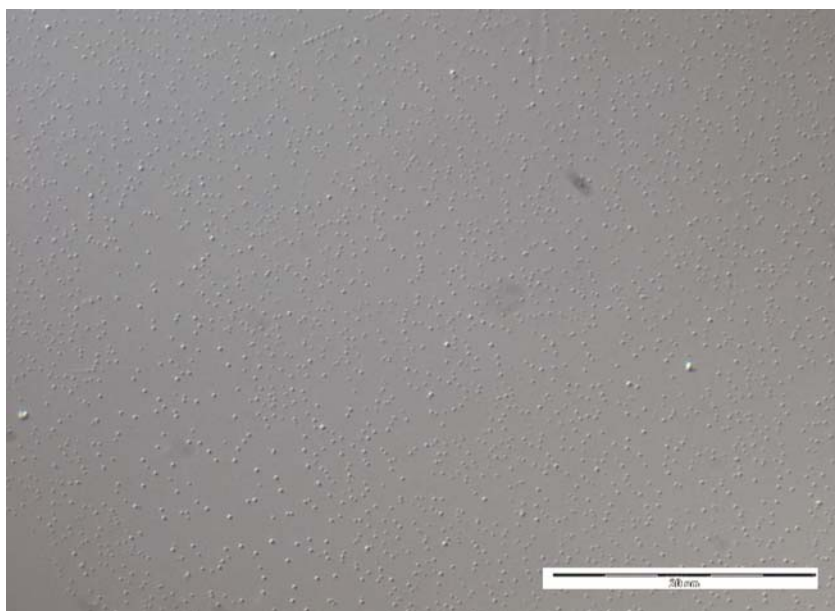


FIGURA 22: Fotomicroscopia ótica da fração filtrada em membrana 0,2 μm de lipossomas 42 mM com 8,4 mM do 3,4-MBC (DIC). Aumento de 100x, óleo de imersão.

Pela **FIGURA 21** foi possível observar uma diferença em relação ao tamanho das vesículas lipossomais, o que reflete a realidade da preparação que ainda não passou pela etapa de normalização do tamanho. Na **FIGURA 22** visualiza-se uma população de vesículas com uma distribuição de tamanho mais homogênea, já que este material foi normalizado pelas membranas de 0,4 μm e 0,2 μm . Os resultados inferidos pelas fotomicroscopias podem ser evidenciados mediante a análise de dados realizada pelo software ANALYSIS que é capaz de, a partir das fotomicroscopias obtidas, escolher um campo, contar o número de vesículas e informar parâmetros como diâmetro máximo, médio e mínimo, esfericidade, perímetro entre outros.

As **FIGURAS 23 e 24** mostram os dados obtidos em relação à distribuição do tamanho de lipossomas 42 mM com 8,4 mM do 3,4-MBC, nas frações sem filtrar e filtradas por membrana 0,2 μm , respectivamente.

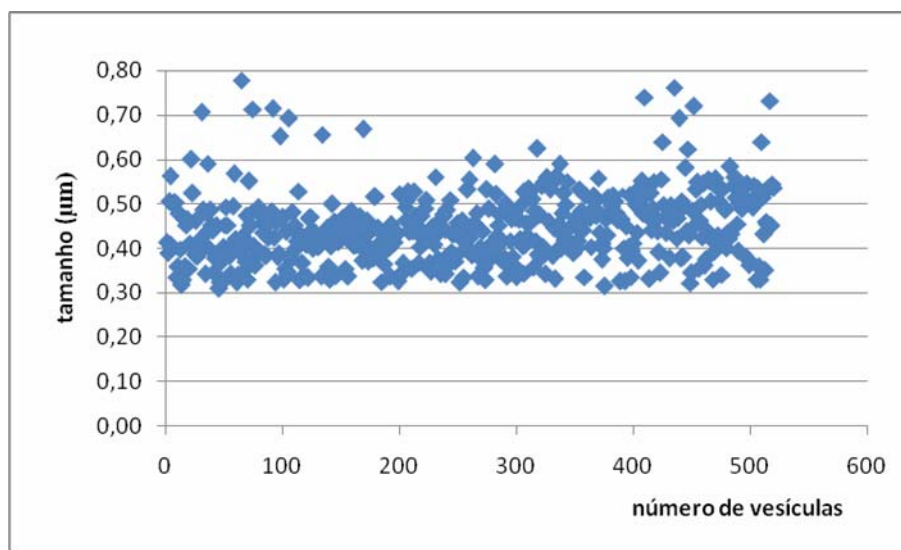


FIGURA 23: Distribuição do tamanho de lipossomas 42 mM com 8,4 mM do 3,4-MBC, fração sem filtração.

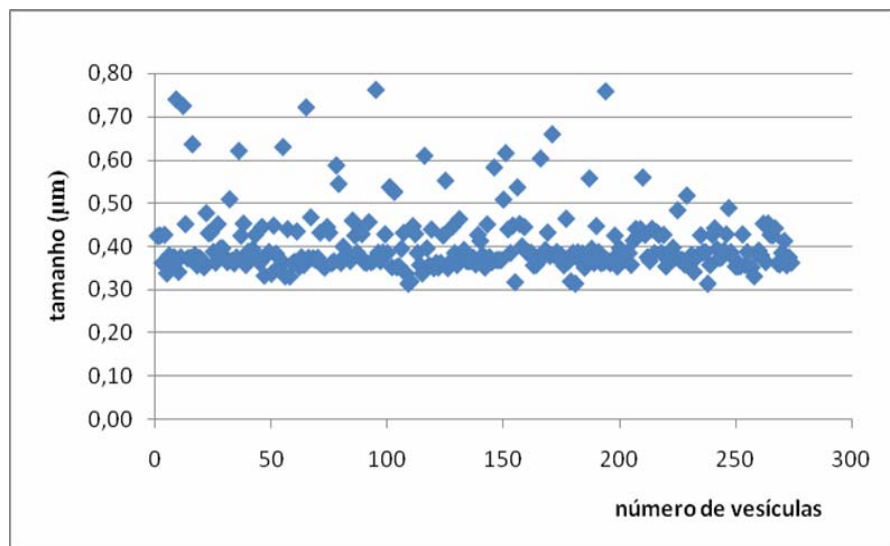


FIGURA 24: Distribuição do tamanho de lipossomas 42 mM com 8,4 mM do 3,4-MBC, fração filtrada em membrana 0,2 µm.

Foram analisadas também as frações sem filtrar e normalizada por membrana de policarbonato de 0,2 µm do lipossoma 42 mM contendo 6,3 mM do BMDM. A imagem da fração sem filtrar foi realizada em campo claro (**FIGURA 25**), enquanto que a imagem da fração normalizada foi visualizada utilizando DIC (**FIGURA 26**).

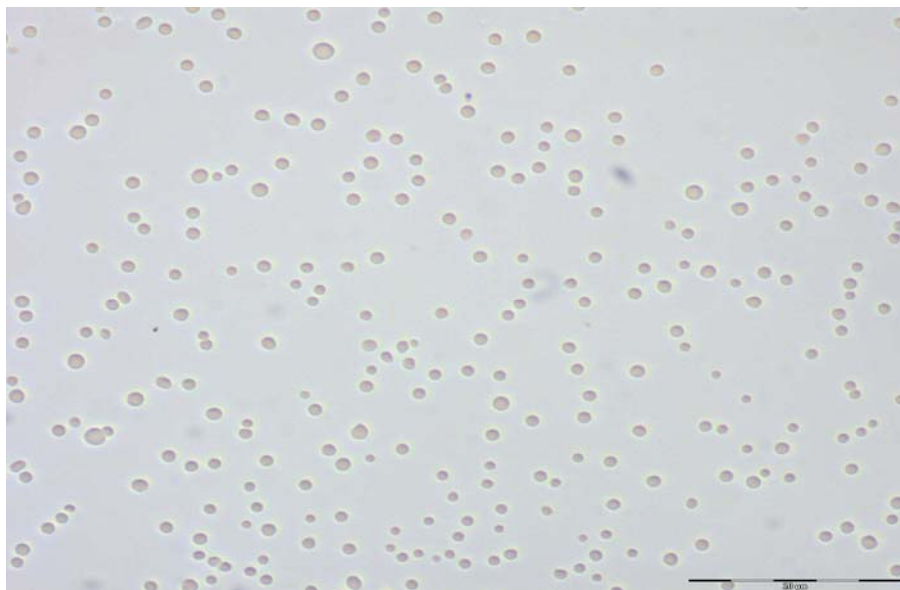


FIGURA 25: Fotomicroscopia ótica da fração sem filtrar de lipossomas 42 mM com 6,3 mM do BMDM (campo claro). Aumento de 100x, óleo de imersão.

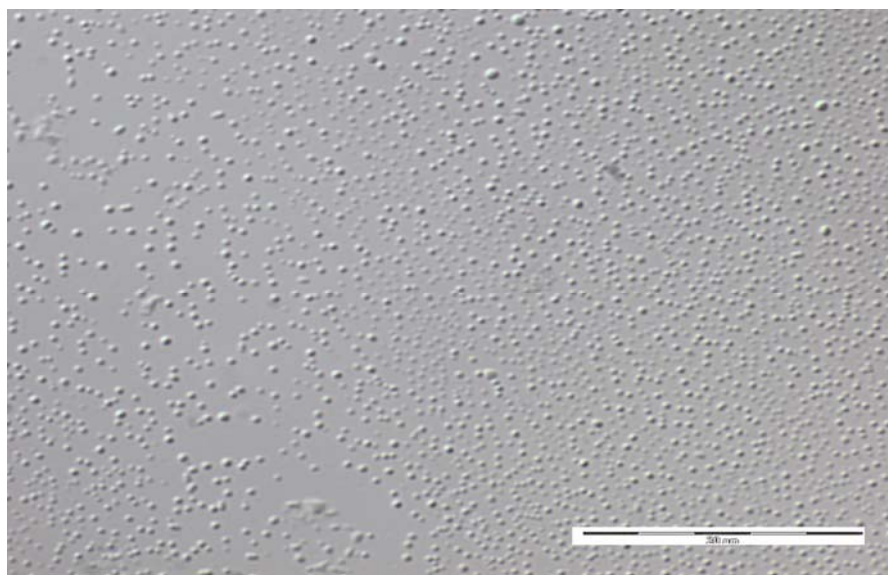


FIGURA 26: Fotomicroscopia ótica da fração filtrada em membrana 0,2 μm de lipossomas 42 mM com 6,3 mM do BMDM (DIC). Aumento de 100x, óleo de imersão.

Pelas **FIGURAS 25** e **26** pode-se constatar o mesmo já observado para os lipossomas contendo 3,4-MBC, em que as vesículas da fração filtrada em membranas de policarbonato 0,2 μm apresentam menores tamanhos.

As **FIGURAS 27 e 28** mostram os dados obtidos em relação a distribuição do tamanho de lipossomas 42 mM com 6,3 mM do BMDM, nas frações sem filtrar e filtradas por membrana 0,2 μm , respectivamente.

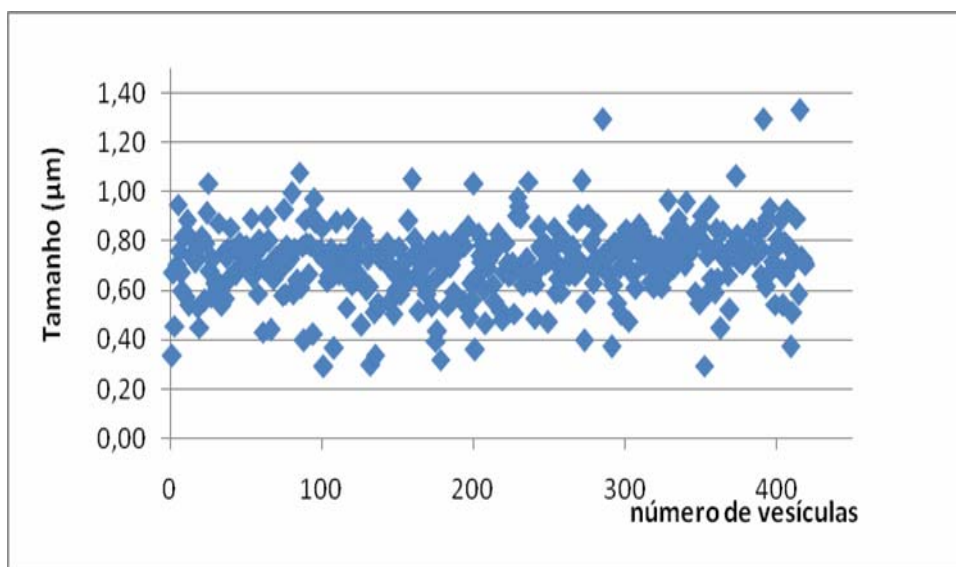


FIGURA 27: Distribuição do tamanho de lipossomas 42 mM com 6,3 mM de BMDM, fração sem filtrar.

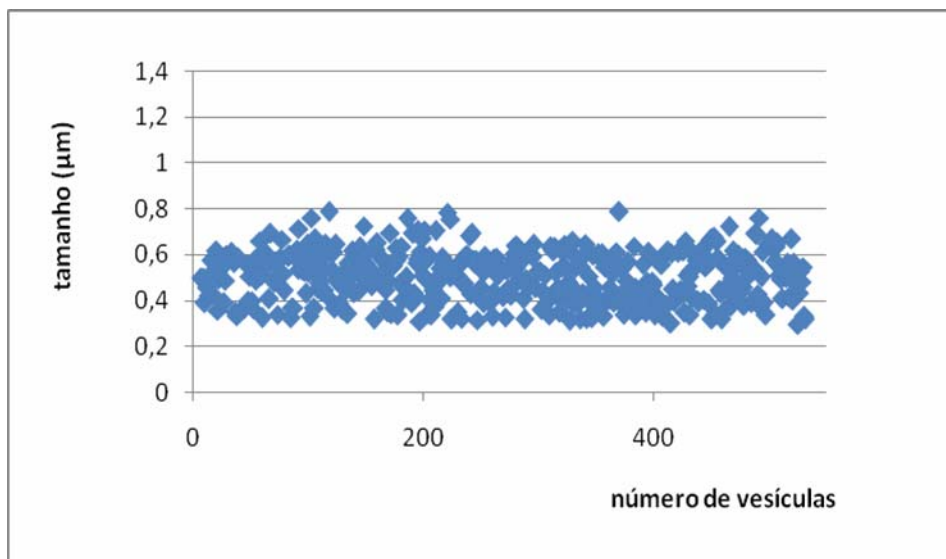


FIGURA 28: Distribuição do tamanho de lipossomas 42 mM com 6,3 mM de BMDM, fração filtrada em membrana 0,2 μm .

As análises da dispersão por MO são apresentadas a seguir de forma a expor os valores mínimos, médios e máximos encontrados nas fotomicroscopias realizadas. A **TABELA 14** mostra os resultados obtidos para cada fração dos lipossomas.

TABELA 14: Valores médios para os diâmetros mínimo, médio e máximo obtidos por MO para os lipossomas nas diferentes frações.

Lipossomas 42 mM	Frações	Diâmetro mínimo (μm) \pm dp	Diâmetro médio (μm) \pm dp	Diâmetro máximo (μm) \pm dp
8,4 mM 3,4-MBC	Sem filtrar	0,34 \pm 0,08	0,45 \pm 0,09	0,52 \pm 0,10
	membrana 0,2 μm	0,30 \pm 0,04	0,40 \pm 0,08	0,45 \pm 0,09
6,3 mM BMDM	Sem filtrar	0,59 \pm 0,12	0,72 \pm 0,14	0,80 \pm 0,16
	membrana 0,2 μm	0,41 \pm 0,11	0,50 \pm 0,11	0,57 \pm 0,11

Para os lipossomas com inclusão de 8,4 mM de 3,4-MBC foi observado que enquanto a fração sem filtrar apresentava uma população de vesículas com tamanhos maiores, a fração normalizada por membrana de 0,2 μm apresentou uma população de vesículas com diâmetros menores, garantindo que o processo de normalização foi eficaz. O mesmo resultado foi verificado para os lipossomas contendo 6,3 mM de BMDM.

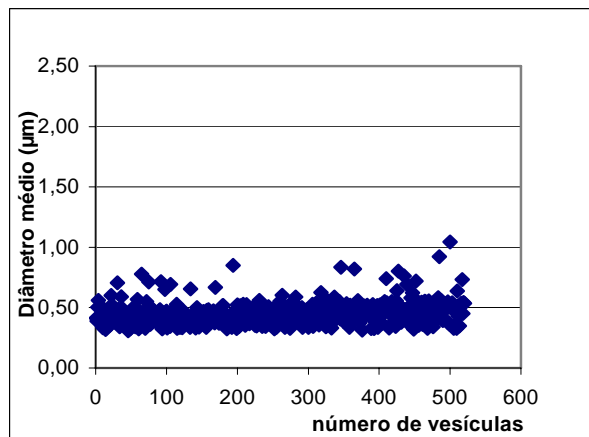
O tempo de contato do etanol com a preparação lipossomal é um parâmetro importante a ser estudado, já que o mesmo é capaz de alterar o tamanho das vesículas (**FIGURA 29**). Contudo, o tempo de contato do etanol com a formulação lipossomal não é capaz de interferir na esfericidade das vesículas (**FIGURA 30**). Foi observado e comparado o tamanho das vesículas lipossomais imediatamente após o preparo da lâmina, 10 e 15 minutos após a diluição da amostra com etanol 25% (v/v).

Aproximadamente 15 minutos após realizar a diluição da fração sem filtrar, foi retirada nova alíquota da amostra para visualização no microscópio ótico, no qual foi observado um aumento considerável no tamanho das vesículas. Após 30 minutos, nova alíquota foi retirada para preparação de nova lâmina e as vesículas apresentavam estruturas que lembravam lamelas em seu interior. Provavelmente, o etanol com o aumento de tempo de contato com a formulação lipossomal é capaz de “inchar” as vesículas, conferindo tamanhos maiores e que tendem a se fundir e arrebentar.

Logo, a fotomicroscopia deve ser sempre realizada em amostras diluídas no momento da visualização no microscópio, a fim de apresentar tamanhos que representem melhor a realidade.

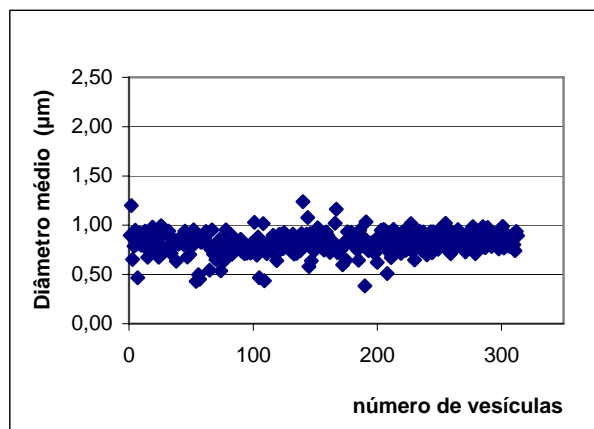
A **FIGURA 30** mostra que o parâmetro esfericidade não se altera deixando a preparação lipossomal exposta 10 e 15 minutos com etanol 25% (v/v). A esfericidade é um parâmetro importante, já que nos diz se as vesículas lipossomais formam estruturas mais próximas de uma esfera. Quando se encontram resultados próximos de 1,0; significa uma aproximação da estrutura encontrada ao de uma esfera. Na amostra sem filtrar foram obtidas vesículas com esfericidades que variam de 0,8 a 1,0, indicando que as vesículas lipossomais preparadas se assemelham com estruturas esféricas.

A



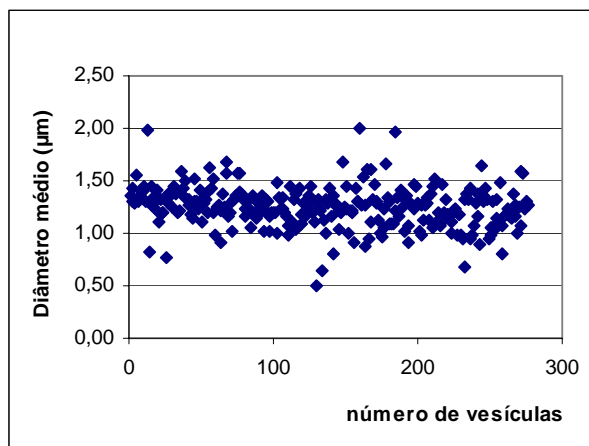
Média = 0,45 µm
dp = 0,09

B



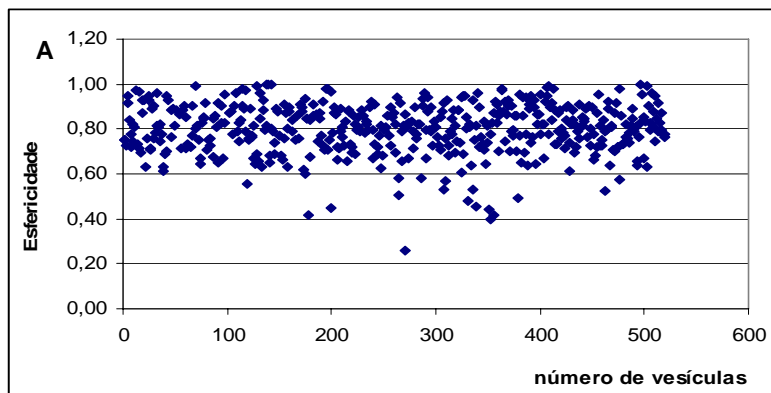
Média = 0,82 µm
dp = 0,11

C

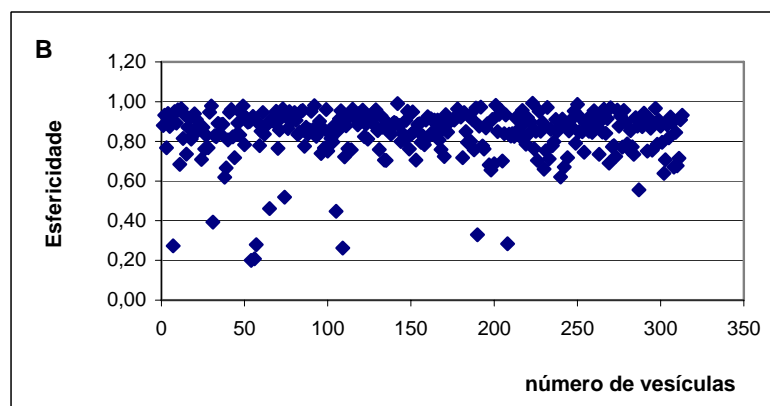


Média = 1,25 µm
dp = 0,20

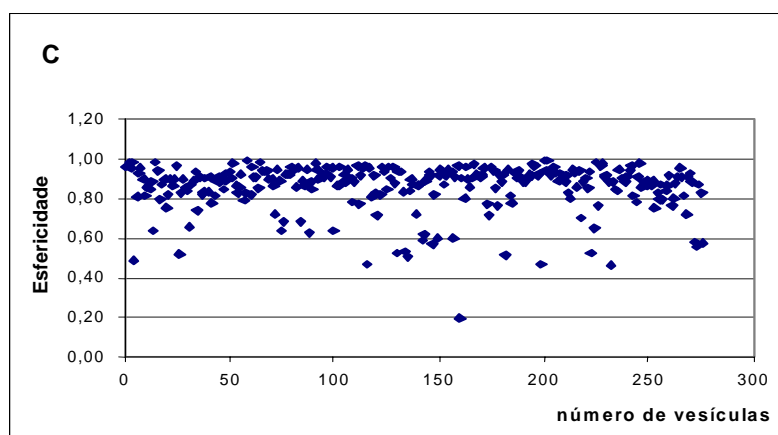
FIGURA 29: Avaliação da influência do tempo de contato de lipossoma 42 mM com 8,4 mM de 3,4-MBC, fração sem filtrar, em etanol 25% (v/v) quanto à distribuição do tamanho das vesículas. A) amostra visualizada em microscópio ótico imediatamente após a diluição. B) amostra visualizada 10 minutos após diluição. C) representa a mesma amostra visualizada em microscópio aproximadamente 15 minutos após diluição.



Média = 0,80
dp = 0,11



Média = 0,84
dp = 0,13



Média = 0,86
dp = 0,12

FIGURA 30: Avaliação da influência do tempo de exposição de lipossoma 42 mM com 8,4 mM de 3,4-MBC, fração sem filtrar, em etanol 25% (v/v) quanto à esfericidade das vesículas. A) amostra visualizada em microscópio após diluição. B) amostra visualizada em microscópio 10 minutos após diluição C) representa a mesma amostra visualizada em microscópio aproximadamente 15 minutos após a diluição.

A microscopia eletrônica de transmissão revela com uma maior exatidão a morfologia das vesículas lipossomais em comparação à microscopia ótica. Por isso deve ser aplicada principalmente nas frações que contêm as vesículas com os menores tamanhos, o que ocorre com os lipossomas filtrados em membrana de policarbonato 0,2 μm e após filtragem em coluna gel Sephadex[®] G-50 (**FIGURAS 31 e 32**).

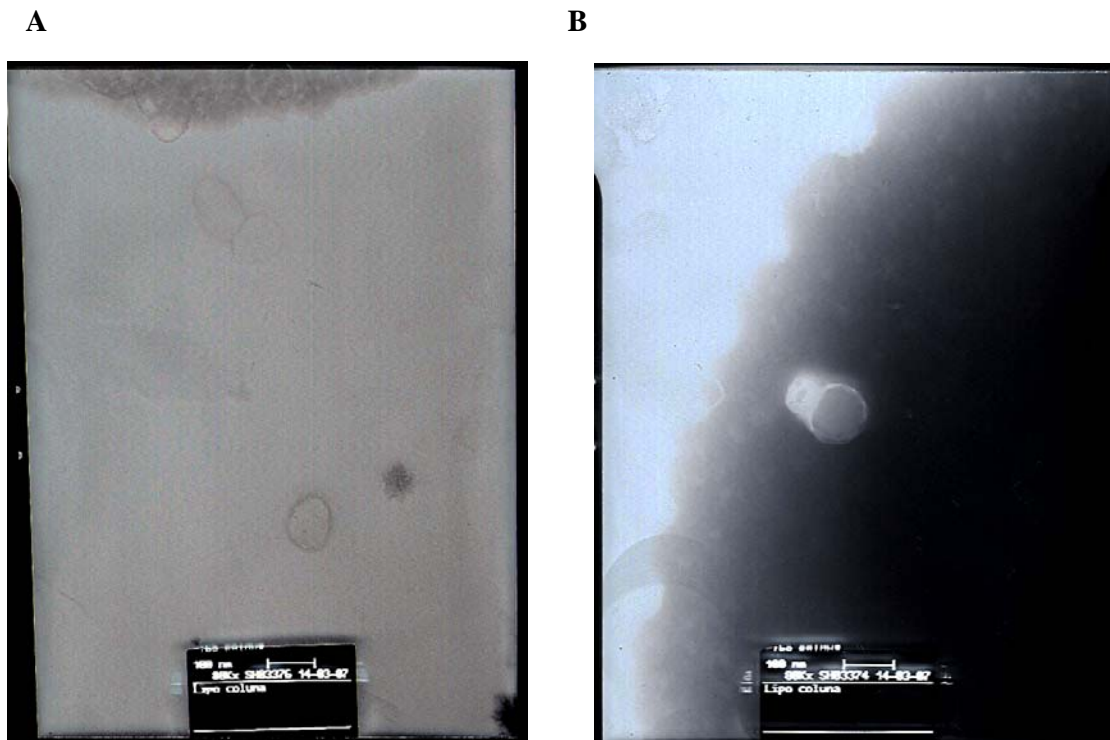


FIGURA 31: Fotomicroscopia eletrônica do lipossoma 42 mM com 8,4 mM de 3,4-MBC, após a passagem por coluna de Sephadex[®] G-50, pelo método da gota. Aumento de 80 Kx. A) Observar três vesículas presentes, uma no centro da foto e as outras duas juntas mais acima. B) Observar vesícula no centro da fotomicroscopia. Escala corresponde a 100 nm.

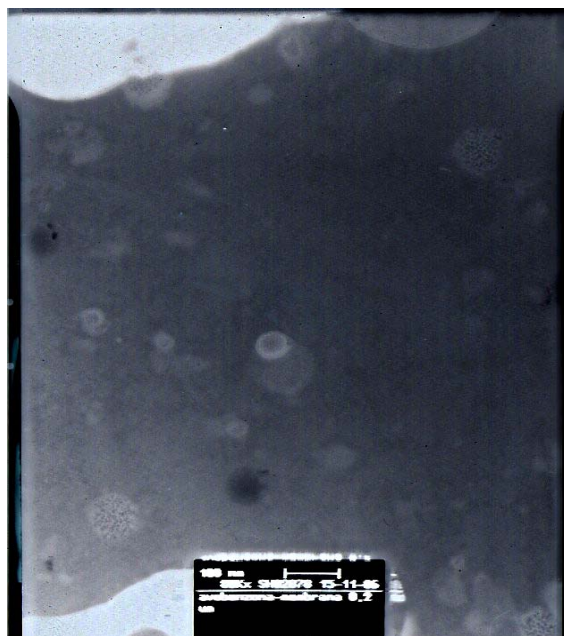


FIGURA 32: Fotomicroscopia eletrônica do lipossoma 42 mM com 6,3 mM de BMDM, após a normalização por membrana 0,2 μm , pelo método da gota. Aumento de 80 Kx. Escala corresponde a 100 nm.

Os lipossomas 42 mM preparados com o 3,4-MBC a 8,4 mM e os preparados com BMDM a 6,3 mM foram caracterizados em termos de diâmetro médio das vesículas por espalhamento dinâmico da luz laser (DLS).

A seguir são apresentados os dados de distribuição média de diâmetro das vesículas lipossomais. Avaliando os resultados obtidos na **FIGURA 33**, a fração filtrada em membrana de policarbonato de 0,2 μm para os lipossomas contendo 3,4-MBC, a variação de diâmetro ficou entre 91,3 nm e 955 nm. A temperatura do sistema foi 25°C e o kcps de 339,1. O diâmetro médio obtido foi 306 nm com um índice de polidispersidade de 0,178. Na literatura está descrito que índices de polidispersidade menores que 0,1 indicam uma população homogênea (VERMA *et al.*, 2003) e valores próximos de 1,0 indicam heterogeneidade

(PIERRE *et al.*, 2001). Os valores encontrados para o diâmetro indicam um bom processo de filtração e colocam as vesículas dentro da faixa ideal de tamanho para lipossomas tipo VMLs.

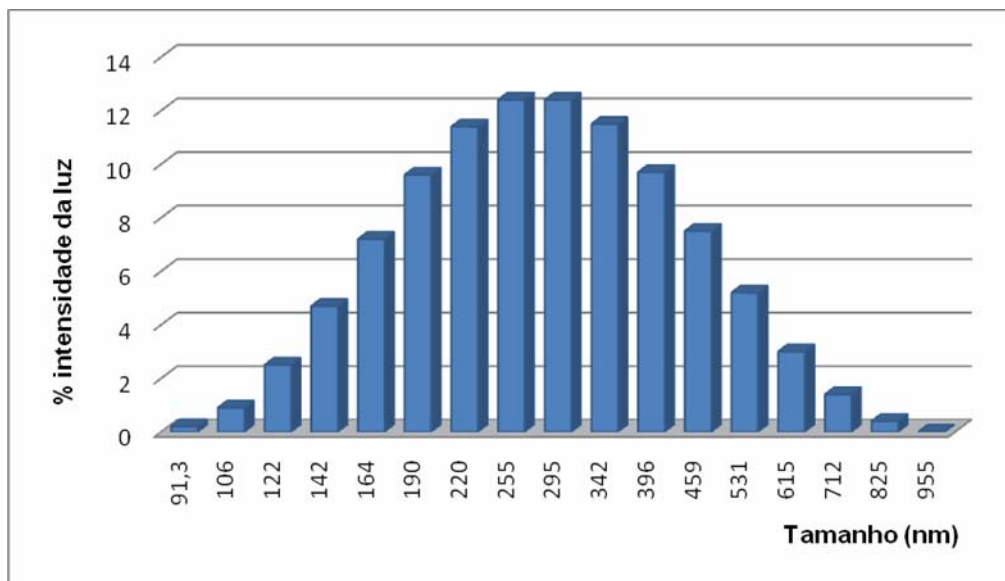


FIGURA 33: Tamanho das partículas nos lipossomas 42 mM com 8,4 mM de 3,4-MBC – fração filtrada em membrana de 0,2 μm .

Os resultados obtidos na **FIGURA 34**, fração filtrada em membrana de policarbonato de 0,2 μm para lipossomas contendo BMDM, a variação de diâmetro ficou entre 78,8 nm e 5560 nm. A temperatura do sistema foi 25°C e o η_{cps} de 380,5. Foram encontradas duas populações principais, sendo que a primeira apresentou 98,5% das vesículas com diâmetro médio de 294 nm e a segunda população apresentou 1,5% das vesículas com diâmetro médio de 4900 nm. O índice de polidispersidade foi de 0,200. Os valores encontrados para os lipossomas com BMDM indicam vesículas com tamanhos de acordo com o esperado após processo de normalização das vesículas com membranas de policarbonato de 0,4 e 0,2 μm , sucessivamente. Embora sejam identificadas duas populações principais, a segunda população apresenta intensidade muito baixa.

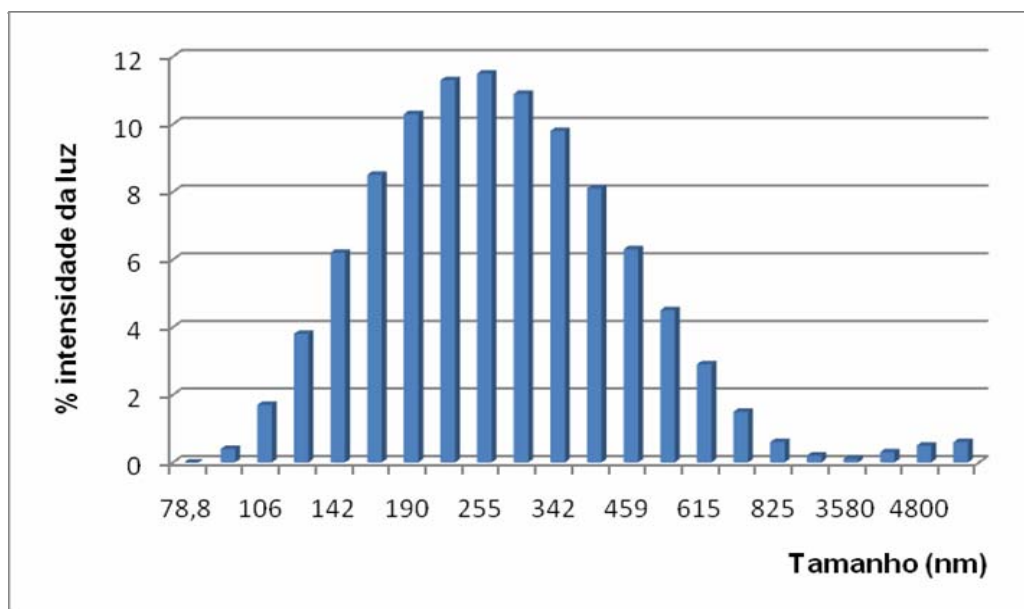


FIGURA 34: Tamanho das partículas nos lipossomas 42 mM com 6,3 mM de BMDM – fração filtrada em membrana de 0,2 μ m.

Em 1994, Du Plessis e colaboradores observaram que tamanhos intermediários de partículas lipossomais (300 nm) apresentam o maior efeito reservatório nas camadas mais profundas da pele, assim como, as concentrações dos ativos são as mais altas no reservatório, utilizando vesículas com esse tamanho, confirmando que a distribuição dos ativos nas camadas da pele quando administrados por via tópica é influenciada pelo tamanho dos lipossomas.

Verma e colaboradores (2003) investigaram a influência do tamanho da partícula na penetração de duas substâncias fluorescentes encapsuladas em lipossomas, através da pele. Para isso, as preparações lipossomais, contendo como material lipídico, Phospholipon[®] 90, foram analisadas de acordo com o tamanho das vesículas por espalhamento dinâmico da luz laser, estudos de permeação em células de difusão de Franz, utilizando pele abdominal humana e por fim, realizaram microscopia confocal para avaliar a capacidade dos lipossomas penetrarem nas diferentes camadas da pele. Concluíram que os lipossomas com tamanhos menores ou iguais a 300 nm já são capazes de distribuir os seus conteúdos nas camadas mais

profundas da pele. Entretanto, lipossomas com tamanhos menores ou iguais a 70 nm são mais promissores para penetração na derme.

Os resultados encontrados para o tamanho das vesículas lipossomais através do espalhamento dinâmico da luz laser corroboram os estudos citados e estão de acordo com os objetivos pretendidos neste trabalho para o desenvolvimento de uma formulação de uso tópico, com efeito nas camadas viáveis da epiderme, sem ocorrer absorção sistêmica dos filtros solares veiculados.

No entanto, comparando-se os dois métodos de análise de tamanho das vesículas lipossomais, foi observada uma variação nos diâmetros médios obtidos por DLS e por MO. As vesículas após a passagem por membrana de polycarbonato de 0,2 μm , medidas por MO apresentaram um diâmetro médio na faixa de 450 nm, enquanto que as medidas pelo DLS se apresentaram na faixa de 300 nm. Esta variação provavelmente ocorreu pela diferença do solvente utilizado em ambas as técnicas, lembrando que, enquanto na MO o diluente foi o etanol 25% (v/v), no DLS foi utilizada a água destilada. Foi demonstrado que o contato da solução etanólica com a amostra promove um aumento no tamanho das vesículas com o tempo de contato, levando a resultados duvidosos em relação ao tamanho das vesículas. Além disso, o tratamento das imagens obtidas pela MO, feito pelo software AnalySIS, superestima os diâmetros das vesículas durante a transformação da imagem para sistema binário, quando ocorre a formação de uma sombra ao redor da vesícula.

Ambos os métodos, MO e DLS, mostraram-se úteis para a análise do tamanho das vesículas nas preparações lipossomais. Entretanto, eles podem ser considerados métodos complementares entre si. Aparentemente, a DLS caracteriza a dispersão como um todo, permitindo avaliar se esta é ou não homogênea e se apresenta as vesículas lipossomais dispersas na faixa de 1 a 5000 nm, enquanto que a MO permite a visualização e análise da morfologia das vesículas.

4.4 PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE ANÁLISE POR CLAE

A quantificação por CLAE tem sido adotada para diversas análises por ser uma metodologia bastante versátil e prática. Na literatura existem vários ensaios descritos por CLAE para a separação e a quantificação de filtros solares (RASTOGI & JENSEN, 1998; DUTRA, KEDOR & SANTORO, 2002; SMYRNIOTAKIS & ARCHONTAKI, 2004; SIMEONI *et al.*, 2005; SALVADOR & CHISVERT, 2005).

De acordo com o espectro de absorção no UV/VIS realizado no sistema de cromatografia provido com detector UV-PDA (**FIGURA 35**) selecionou-se o comprimento de onda de 304 nm para a análise quantitativa do 3,4-MBC e 352 nm para o BMDM. Esses comprimentos de onda são regiões de alta absorvidade dos filtros solares em estudo.

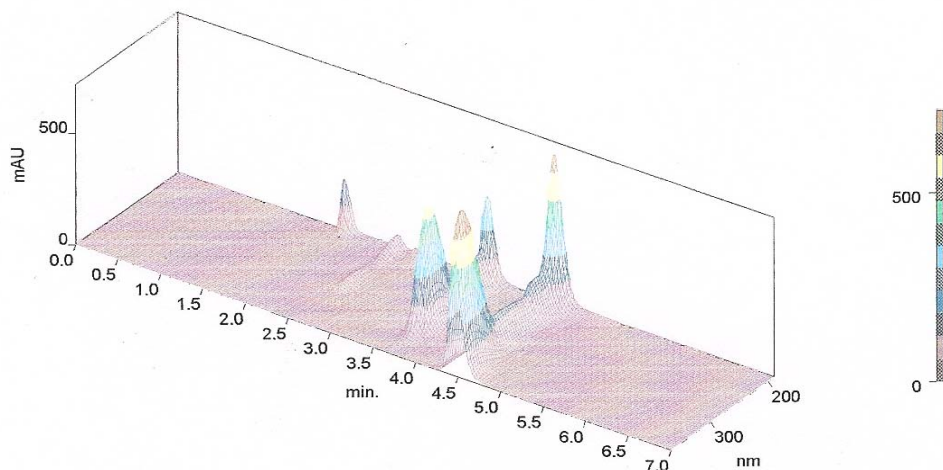


FIGURA 35: Cromatograma tridimensional obtido através do detector UV-PDA para amostra dos filtros solares nas concentrações: 40 µg/mL para o 3,4-MBC e 50 µg/mL para o BMDM.

Conforme as condições cromatográficas estabelecidas, o tempo de retenção foi de 3,6 minutos para o 3,4-MBC e de 4,3 minutos para o BMDM.

Alguns parâmetros de conformidade do sistema como resolução, número de pratos teóricos e fator de cauda foram determinados, com o objetivo de verificar se a resolução e a

reprodutibilidade do sistema cromatográfico estão adequadas para as análises a serem realizadas. Os resultados encontrados estão listados na **TABELA 15**.

TABELA 15: Parâmetros de conformidade do sistema.

Filtros Solares	Parâmetros de conformidade do sistema		
	Resolução	Número de pratos teóricos	Fator de cauda
3,4-MBC (304 nm)	3,19	3984,57	1,2
BMDM (352 nm)	-	4564,67	1,2

A resolução visa garantir que substâncias eluídas proximamente, apresentem separação satisfatória sem interferências mútuas. O número de pratos teóricos é indicativo da eficiência da coluna e o fator cauda refere-se à simetria do pico. De acordo com a USP 27 (2004), o valor da resolução não deve ser inferior a 2,0 e o número de pratos da coluna, em geral, deve ser acima de 2000 para CLAE. Picos perfeitamente simétricos apresentam valores para o fator de cauda próximos de 1 e valores acima indicam picos com arrastamento (USP 27, 2004; RIBANI *et al.*, 2004).

A validação da metodologia para a quantificação dos filtros solares seguiu a legislação em vigor, RE nº 899 de 2003, a qual estabelece as definições dos parâmetros para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Segundo esta resolução, a finalidade do teste enquadra-se na categoria I, testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos, havendo a necessidade da comprovação de especificidade, linearidade, intervalo de confiança, precisão (repetibilidade), exatidão e robustez (BRASIL, 2003).

4.4.1 Especificidade

O resultado da seletividade do método está demonstrado na **FIGURA 36**. A especificidade foi determinada injetando a formulação gel base, ou seja, sem os ativos, no cromatógrafo, a fim de verificar a interferência dos excipientes nos comprimentos de onda de absorção escolhidos para os ativos.

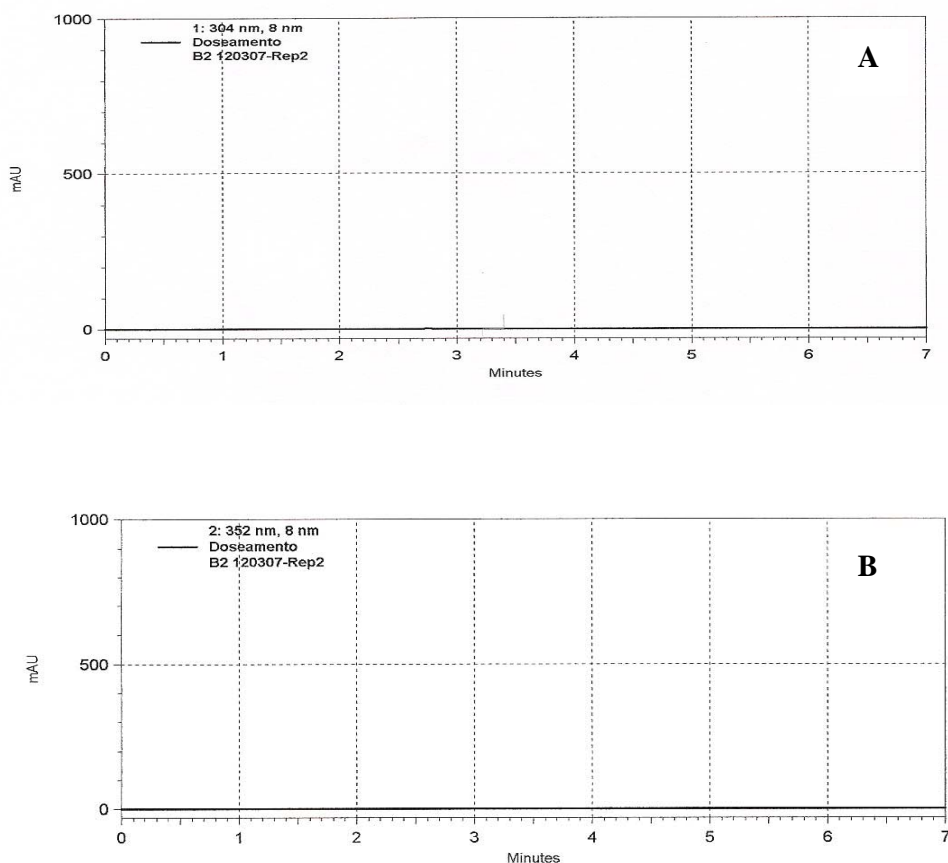


FIGURA 36: Cromatograma da formulação gel base (A) no comprimento de onda 304 nm; (B) no comprimento de onda 352 nm.

Conforme observado na **FIGURA 36**, o método proposto é específico e seletivo para a determinação dos filtros 3,4-MBC e BMDM na formulação gel, visto que não há presença de interferentes na região de retenção, nas condições empregadas.

4.4.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada calculando-se os valores do intercepto (a), da inclinação (b) e do coeficiente de correlação (r). A linearidade do método foi comprovada com a determinação de duas curvas de calibração para cada um dos filtros solares, em dias diferentes, na faixa de 16,0-80,0 µg/mL para o 3,4-MBC e de 20,0 - 100,0 µg/mL para o BMDM.

Na **FIGURA 37** e na **TABELA 16** estão dispostos os resultados para o 3,4-MBC em relação à linearidade.

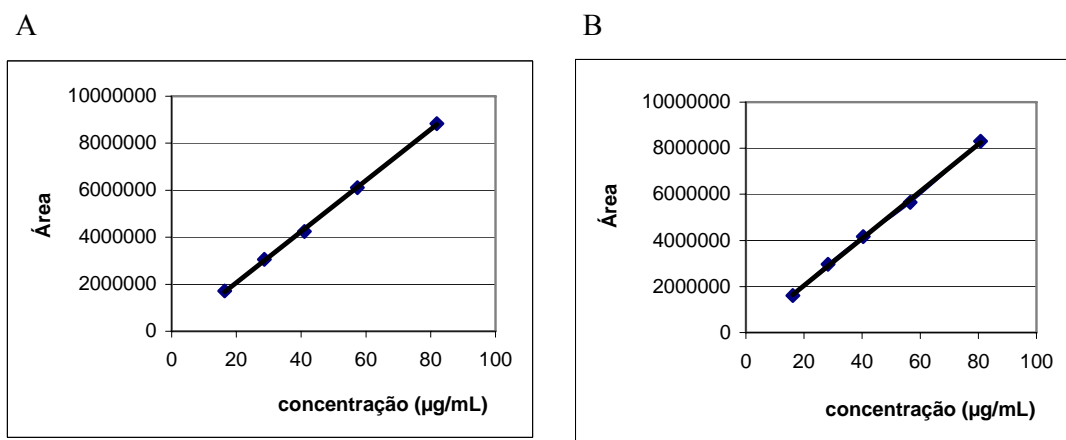


FIGURA 37: Representação das curvas de calibração obtidas para as cinco concentrações de 3,4-MBC, preparadas em triplicata, em cada dia de análise. A) primeiro dia de análise B) segundo dia de análise.

TABELA 16: Respostas obtidas pelas curvas de calibração do 3,4-MBC em cada dia de análise.

	Dia 1	Dia 2	Média ± dp
Inclinação	108622	102583	105602,5 ± 4270,2
Intercepto	-100302	-90962	-95632 ± 6604,3
Coeficiente de determinação (R^2)	0,9995	0,9935	0,9965 ± 0,004
Coeficiente de correlação (r)	0,9997	0,9967	0,9982 ± 0,002

De acordo com os resultados obtidos na **TABELA 16** o método proposto apresentou linearidade adequada, visto que a média do coeficiente de correlação (r) obtido para a equação da reta nos dois dias foi de 0,9982, superior a 0,99, mostrando-se dentro do valor recomendado pela legislação vigente, ou seja, acima de 0,99 (BRASIL, 2003). Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI *et al.*, 2004).

A **FIGURA 38** e a **TABELA 17** apresentam os resultados obtidos para o BMDM.

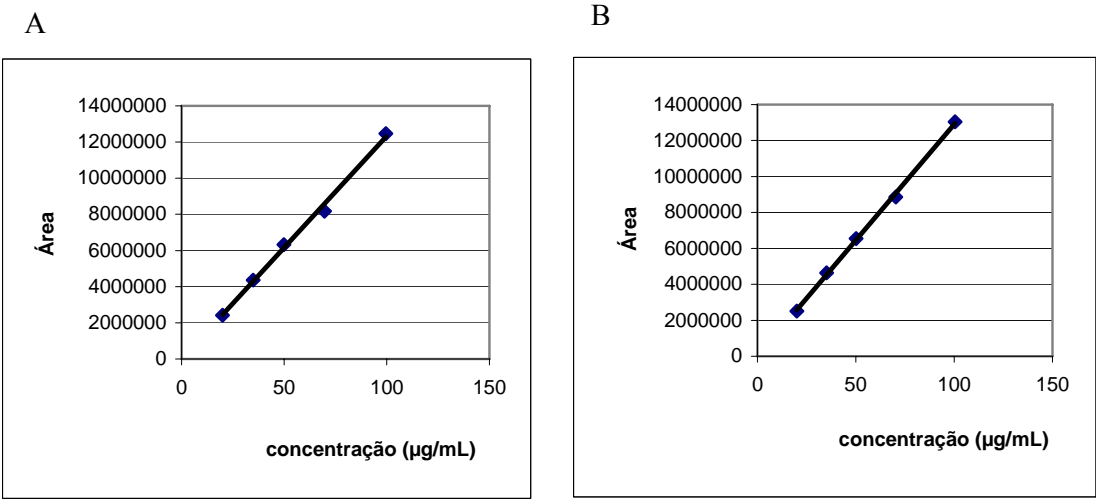


FIGURA 38: Representação das curvas de calibração obtidas para as cinco concentrações de BMDM, preparadas em triplicata, em cada dia de análise: A) primeiro dia de análise B) segundo dia de análise.

TABELA 17: Respostas obtidas pelas curvas de calibração de BMDM em cada dia de análise.

	Dia 1	Dia 2	Média ± dp
Inclinação	123498	129369	126433,5 ± 4151,42
Intercepto	-15093	-17638	-16365,5 ± 1799,59
Coefficiente de determinação (R²)	0,9957	0,9989	0,9973 ± 0,002
Coefficiente de correlação (r)	0,9978	0,9994	0,9986 ± 0,001

Observa-se na **TABELA 17** que a média do coeficiente de correlação encontrado para a equação da reta nos dois dias foi de 0,9986 para BMDM, superior a 0,99, mostrando-se de acordo quando comparado com o valor recomendado pela legislação vigente (BRASIL, 2003).

4.4.3 Repetibilidade e Precisão Intermediária

A precisão do método foi realizada através de seis pesadas a 100% da concentração da formulação gel contendo os filtros solares. Nas **TABELAS 18 e 19** estão dispostos os resultados encontrados para os filtros solares.

TABELA 18: Determinação da repetibilidade e da precisão intermediária para o 3,4-MBC na formulação.

Concentração 3,4-MBC (%)	Massa (g) encontrada intradia		Massa (g) encontrada interdia (n=12)	Teor (%) encontrado intradia		Teor (%) encontrado interdia (n=12)	Precisão Intermediária DPR (%)
	1º dia	2º dia		1º dia	2º dia		
100	3,98	4,06	4,00 ± 0,12	99,02	101,04	100,07 ± 2,70	2,70
	4,00	4,20		99,95	104,80		
	3,98	4,00		99,58	99,73		
	3,92	4,18		97,81	104,57		
	3,74	4,04		93,33	100,91		
	3,94	4,02		98,27	100,35		

TABELA 19: Determinação da repetibilidade e da precisão intermediária para o BMDM na formulação.

Concentração BMDM (%)	Massa (g) encontrada intradia		Massa (g) encontrada interdia (n=12)	Teor (%) encontrado intradia		Teor (%) encontrado interdia (n=12)	Precisão Intermediária DPR (%)
	1º dia	2º dia		1º dia	2º dia		
100	4,82	4,56	4,70 ± 0,13	94,53	89,53	92,27 ± 2,76	2,99
	4,84	4,74		95,05	93,11		
	4,80	4,60		94,11	90,21		
	4,82	4,72		94,59	92,79		
	4,54	4,56		89,22	89,62		
	4,84	4,56		95,11	89,38		

Como não existe metodologia oficial para a análise de formulações em gel contendo filtros solares, pode-se considerar a faixa de 90,0% a 110,0% da quantidade declarada de ativos como especificação usual para o teor, de modo que a formulação desenvolvida está de acordo para este teste, conforme pode ser observado pelas **TABELAS 18 e 19**.

Na **TABELA 18**, verifica-se após análise em dois dias consecutivos um teor de 100,07% para o 3,4-MBC e um DPR de 2,70%. De acordo com a **TABELA 19**, foi encontrado um teor de 92,27% para o BMDM na formulação gel de Natrosol® após análise em dois dias consecutivos e um valor de DPR de 2,99%.

Os valores de DPR encontrados para os dois ativos na formulação estão abaixo do permitido na legislação vigente, em que não são admitidos valores superiores a 5% (BRASIL, 2003), revelando boa repetibilidade (DPR intra-dia) e precisão intermediária (DPR inter-dia) desta metodologia.

4.4.4 Precisão do volume de injeção

Os resultados estão descritos na **TABELA 20**, tendo sido estabelecido para as concentrações 40 µg/mL para o 3,4-MBC e 50 µg/mL para o BMDM.

TABELA 20: Resultados do teste de precisão do volume de injeção.

Filtros Solares	Área sob o pico	Área sob o pico média ± dp	DPR (%)
3,4-MBC	3979148	3985861 ± 51851,2	1,30
	3959501		
	3974845		
	4002010		
	3903108		
	3977828		
	4036255		
	4054582		
	4052375		
	3918958		
BMDM	5603069	5612680 ± 74534,4	1,33
	5580046		
	5599643		
	5644299		
	5494872		
	5605841		
	5685325		
	5708859		
	5699909		
	5504934		

De acordo com a tabela acima, a precisão do volume de injeção foi demonstrada e os valores de DPR encontrados foram de 1,30% para o 3,4-MBC e de 1,33% para o BMDM. Logo, uma vez que nenhum dos valores de DPR encontrados foi superior a 2%, conclui-se que os resultados obtidos foram adequados.

4.4.5 Exatidão

A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (RIBANI *et al.*, 2004). Esse ensaio foi realizado através da contaminação da formulação placebo com quantidades conhecidas dos ativos.

As **TABELAS 21** e **22** mostram os valores de teor encontrados nos ensaios de recuperação, para os três níveis de concentração analisados (80, 100 e 120%) para a mistura de 3,4-MBC e BMDM na formulação gel com os filtros solares livres.

TABELA 21: Resultados do ensaio de recuperação para o 3,4-MBC.

Concentração 3,4-MBC (%)	Massa adicionada (g)	Massa encontrada (g)	Recuperação (%)	Recuperação (%) (média ± dp)	DPR (%)
80	0,3203	0,3056	95,43	99,77 ± 3,87	3,88
		0,3237	101,06		
		0,3294	102,83		
100	0,4091	0,3843	93,94	97,47 ± 3,14	3,22
		0,4030	98,52		
		0,4089	99,95		
120	0,4823	0,4712	97,70	100,13 ± 2,16	2,16
		0,4910	101,80		
		0,4867	100,91		

TABELA 22: Resultados do ensaio de recuperação para BMDM.

Concentração BMDM (%)	Massa adicionada (g)	Massa encontrada (g)	Recuperação (%)	Recuperação (%) (média ± dp)	DPR (%)
80	0,4223	0,3806	90,12	91,99 ± 2,41	2,62
		0,400	94,71		
		0,3849	91,15		
100	0,5082	0,4614	90,80	91,03 ± 2,00	2,20
		0,4531	89,16		
		0,4733	93,14		
120	0,6065	0,5409	89,18	91,60 ± 2,14	2,34
		0,5655	93,24		
		0,5602	92,37		

Os valores de DPR encontrados para o 3,4-MBC e o BMDM foram abaixo de 5%, nos três níveis de concentração estudados (80, 100 e 120%), garantindo, dessa forma, que o método proposto é exato para a quantificação dos ativos (BRASIL, 2003).

O baixo teor encontrado para o filtro solar BMDM pode estar relacionado a sua dificuldade de solubilização e devido ao fato da impregnação em formas semi-sólidas não ser o ideal, como é realizado na contaminação do placebo, pois a dispersão deste filtro solar sólido em um veículo gel só se apresenta totalmente homogênea quando a preparação é feita misturando-se as fases já com o ativo.

4.4.6 Robustez

A robustez foi avaliada alterando-se o fluxo da fase móvel e o modelo do cromatógrafo. Para a verificação da influência do fluxo da fase móvel foram feitas duas corridas cromatográficas modificando-se para 0,5 mL/min e 1,5 mL/min, conforme observado nas **FIGURAS 39 e 40**.

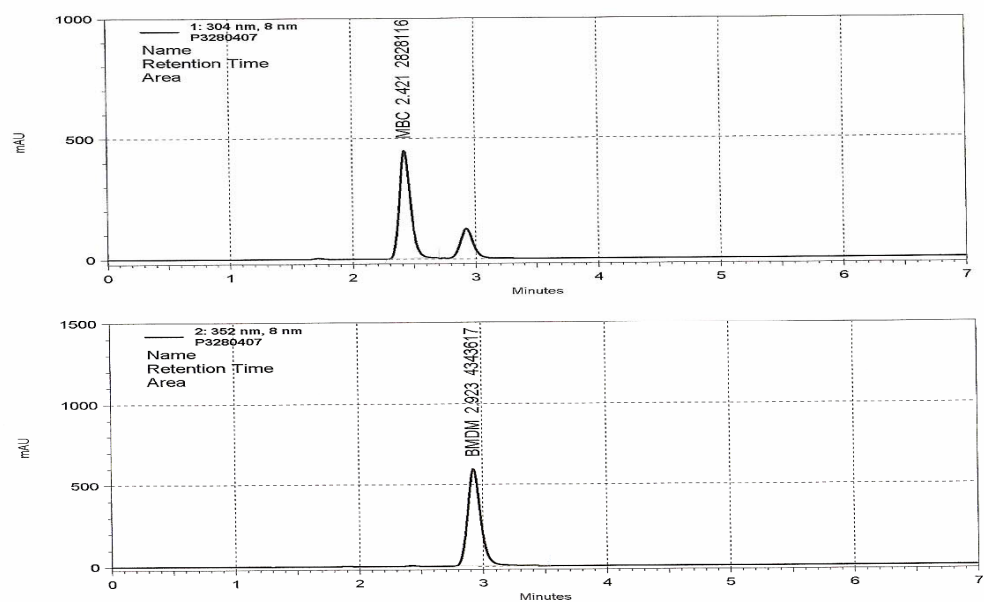


FIGURA 39: Cromatogramas obtidos para fluxo de fase móvel de 1,5 mL/min para o 3,4-MBC na concentração de 40 µg/mL e o BMDM na concentração de 50 µg/mL.

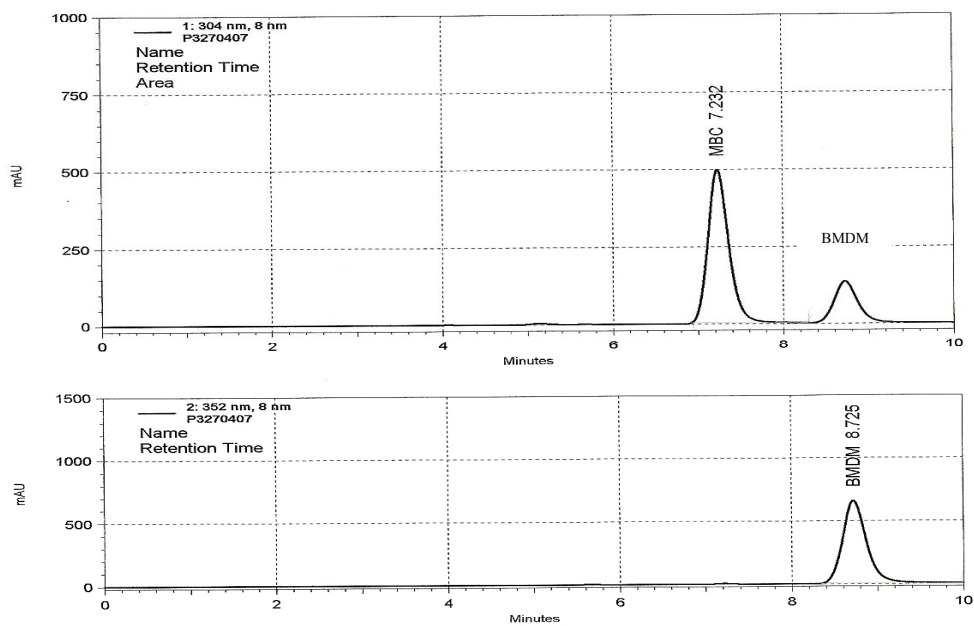
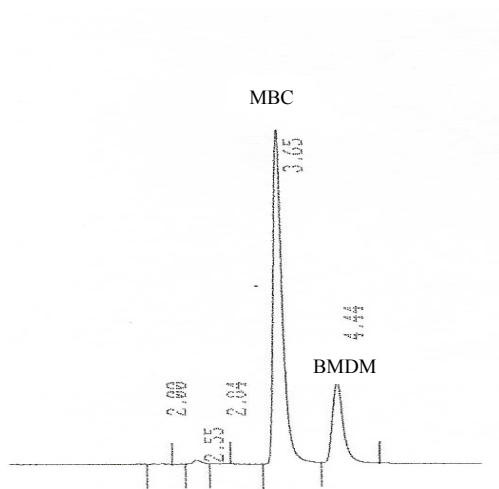


FIGURA 40: Cromatogramas obtidos para fluxo de fase móvel de 0,5 mL/min para o 3,4-MBC na concentração de 40 µg/mL e o BMDM na concentração de 50 µg/mL.

Observa-se que houve uma diminuição do tempo de retenção com o aumento da vazão, ou seja, do fluxo de fase móvel para 1,5 mL/min. Com o aumento do fluxo ocorre uma interação menor entre os analitos, filtros solares, de características lipofílicas e a fase estacionária, ficando estes menos retidos na coluna, com um tempo de retenção de cerca 2,4 minutos para o 3,4-MBC e 2,9 minutos para o BMDM, com o fator de separação (α) de 1,2. Com a diminuição do fluxo da fase móvel para 0,5 mL/min, verifica-se um aumento no tempo de retenção para cerca de 7,2 minutos para 3,4-MBC e 8,7 para o BMDM, com o α de 1,2. Isso ocorre já que os filtros solares por serem eluídos da coluna com um fluxo menor, apresentam mais interações com a mesma, ficando mais tempo retidos, com um aumento no tempo de retenção. Observa-se em ambos os casos que o α foi mantido em 1,2, o que garante uma boa separação destes, mesmo quando o fluxo é modificado.

Foi avaliada a robustez do método proposto alterando o modelo de cromatógrafo para WATERS, com injetor manual RHEODYNE 7725i, detector ultravioleta WATERS 486, bomba para CLAE WATERS 510 e integrador WATERS 746. Mesmo alterando o modelo do cromatógrafo, como também o volume de injeção para 10 μ L e temperatura ambiente (25°C) os tempos de retenção permaneceram os mesmos quando comparados com os tempos de retenção obtidos no cromatógrafo SHIMADZU, sendo 3,65 minutos para o 3,4-MBC e 4,44 minutos para o BMDM, com o α de 1,22; conforme ilustrado na **FIGURA 41**.

A)



B)

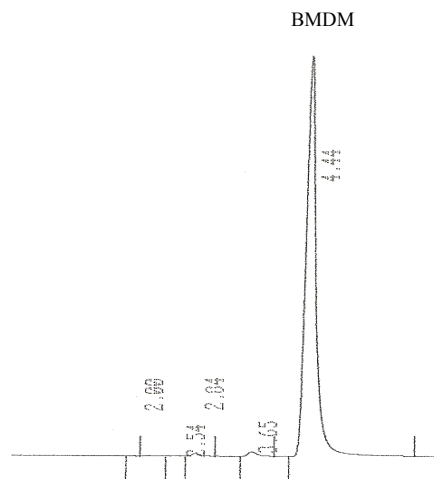


FIGURA 41: Cromatogramas obtidos para cromatógrafo modelo Waters, fluxo de fase móvel de 1,0mL/min e volume de injeção de 10 μ L. A) Para a concentração de 40 μ g/mL de 3,4-MBC, no comprimento de onda de 304 nm B) Para a concentração de 50 μ g/mL de BMDM, no comprimento de onda de 352 nm.

Pode-se dizer pelos resultados obtidos que o método proposto para a identificação, separação e quantificação dos filtros solares 3,4-MBC e BMDM na formulação gel de Natrosol[®] com os filtros solares livres demonstrou ser econômico, sensível, preciso, reprodutível, robusto e linear na faixa de trabalho selecionada.

4.5 AVALIAÇÃO DAS FORMULAÇÕES PREPARADAS

A escolha no preparo de formulações em gel de Natrosol foi baseada em estudos anteriores (GARCIA, 1998; MIRANDA, 2005; SANTOS, 2007). A trama tridimensional do gel aquoso permite equilibrar a constituição óleo : água, obtendo uma formulação com uma menor capacidade oclusiva e um melhor espalhamento (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000). Como já discutido anteriormente, a hidroxietilcelulose foi escolhida com o intuito de proteger a integridade e estabilidade dos lipossomas, visto que é um polímero gelificante de caráter não iônico, compatível com a fosfatidilcolina.

Para o preparo da formulação gel lipossomal foi necessário preparar lipossomas na concentração de 168 mM de fosfatidilcolina e com um aumento proporcional na concentração dos filtros em relação ao fosfolípido, a fim de aumentar a quantidade dos ativos inclusos nos lipossomas. A fim de garantir que os lipossomas 168 mM apresentavam o mesmo comportamento dos lipossomas 42 mM, eles foram preparados e analisados quanto ao teor de filtro solar por espectrofotometria e teor de fósforo, pelo método de Bartlett, que corresponde à quantidade de fosfatidilcolina que forma a vesícula lipídica (**TABELA 23**).

TABELA 23: Determinação em triplicata do teor de fósforo e dos filtros solares para avaliar a inclusão nos lipossomas com Phospholipon[®] 90 a 168 mM.

Lipossomas 168 mM	Teor de fósforo (%) ± dp	Teor dos ativos (%) ± dp
3,4-MBC	83,10 ± 1,38	77,55 ± 0,89
BMDM	73,29 ± 2,69	80,79 ± 1,74

média ± desvio padrão

Os resultados encontrados para os lipossomas 168 mM quanto ao teor de fósforo e de filtros solares encontram-se compatíveis com os resultados obtidos com os lipossomas 42 mM. A partir desse resultado, os lipossomas 168 mM foram utilizados para o preparo da formulação gel Natrosol® com os filtros solares inclusos nos lipossomas.

As formulações desenvolvidas, gel de Natrosol com filtros solares livres e inclusos em lipossomas, foram avaliadas de acordo com o pH e teor de filtros solares.

A determinação do pH foi realizada mediante submersão do eletrodo DME CV4 (específico para semi-sólidos) na amostra, a 25°C, em potenciômetro calibrado com soluções tampão pH 4 e 7 (Merck). O resultado corresponde à média de três determinações.

A metodologia para a quantificação dos ativos na formulação contendo os filtros solares inclusos em lipossomas foi a mesma utilizada para a quantificação dos ativos na formulação gel de Natrosol sem lipossomas, por CLAE. Não foi necessário validar o método analítico para a quantificação do 3,4-MBC e do BMDM na formulação gel Natrosol® com os filtros solares inclusos nos lipossomas visto que o solvente utilizado para o preparo das amostras foi o etanol P.A., que é capaz de destruir as vesículas lipossomais. Além disso, os lipídios utilizados na preparação dos lipossomas são detectados na região de 203-205 nm do espectro de absorção (VEMURI & RHODES, 1995) não interferindo, dessa forma, na leitura das amostras realizadas nos comprimentos de onda 304 e 352 nm. Nas **FIGURAS 42 e 43** observa-se os cromatogramas encontrados para a formulação formulação gel Natrosol® contendo os filtros solares livres e inclusos nos lipossomas, respectivamente.

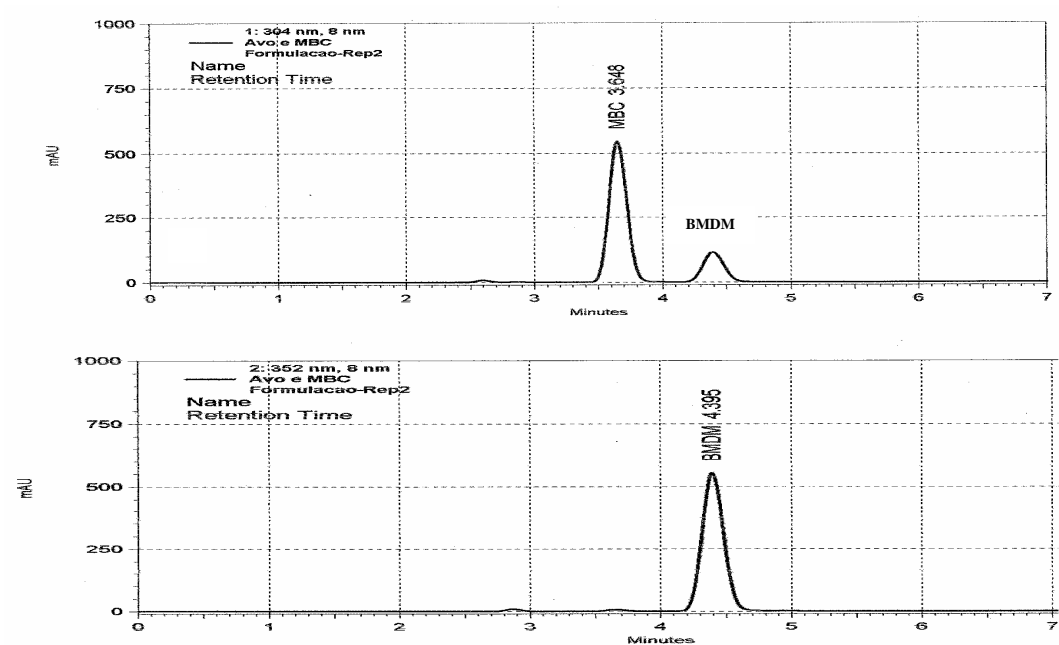


FIGURA 42: Cromatograma da formulação gel de Natrosol® com filtros solares livres.

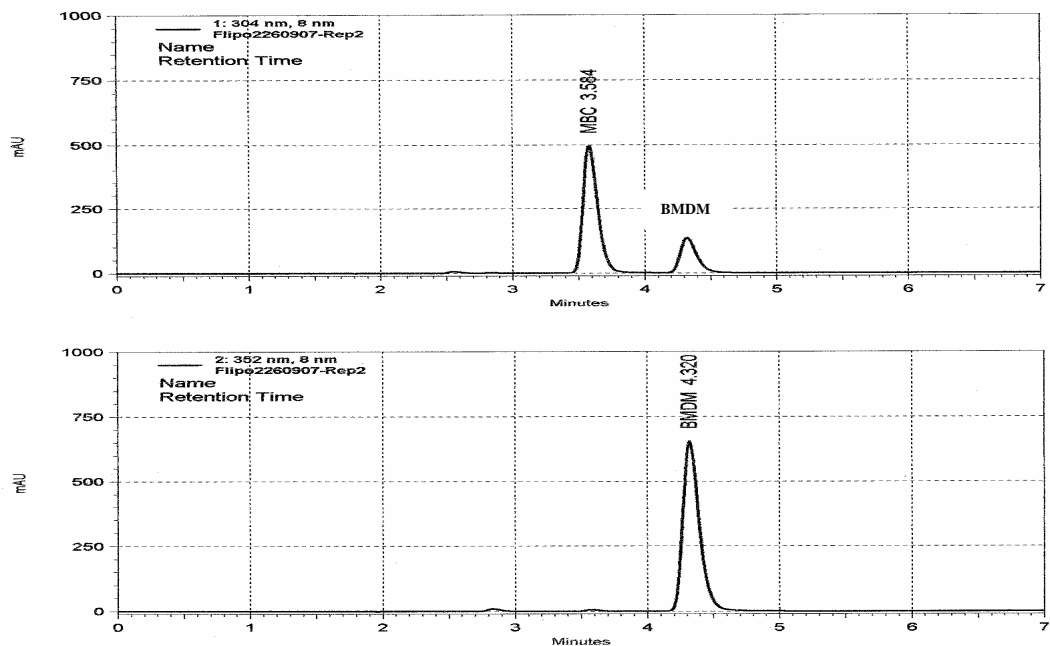


FIGURA 43: Cromatograma da formulação gel de Natrosol® com filtros solares incluídos nos lipossomas.

A **TABELA 24** mostra os resultados encontrados para o pH e teor dos filtros solares nas formulações desenvolvidas.

TABELA 24: Avaliação físico-química das formulações desenvolvidas.

Formulações	pH	Teor dos ativos (%) \pm dp
Gel + filtros livres	5,82 \pm 0,01	98,68 \pm 3,11 (3,4-MBC)
		90,61 \pm 2,84 (BMDM)
Gel + filtros em lipossomas	5,79 \pm 0,02	96,56 \pm 1,67 (3,4-MBC)
		90,54 \pm 0,56 (BMDM)

média \pm desvio padrão

Pelos resultados encontrados na **TABELA 24** pode-se dizer que o pH está compatível com o pH encontrado na pele, garantindo segurança de uso. De acordo com Leonardi e colaboradores (2002) a pele apresenta um pH levemente ácido (4,6 – 5,8) o que contribui para que ocorra a proteção bactericida e fungicida em sua superfície. Em relação à análise quantitativa, o percentual de ativos em ambas as formulações encontra-se de acordo com a faixa de 90,0% a 110,0% da quantidade declarada de ativos, especificação normalmente adotada para o teor.

O grau de proteção de produtos contendo filtros solares é caracterizado pelo seu FPS. De acordo com a legislação vigente, a comprovação do FPS deve ser feita *in vivo* (BRASIL, 2002). No entanto, estes métodos são muito complexos para serem aplicados como rotina no controle de qualidade destes produtos, pois requerem 20 voluntários sadios e normais e, no mínimo, 3 dias de duração. Em contrapartida, os métodos *in vitro* possuem como vantagens a reprodutibilidade, a fácil metodologia e a rapidez na obtenção dos resultados, sendo

recomendados para serem utilizados na fase de desenvolvimento de formulações e como rotina no controle de qualidade (BORGHETTI & KNORST, 2006).

Desta forma, as formulações foram avaliadas em relação ao FPS *in vitro* de acordo com o método de Mansur. O FPS encontrado para ambas as formulações foi próximo de 11, sendo esta formulação proposta indicada para peles sensíveis que ocasionalmente apresentam eritema, oferecendo uma moderada proteção contra queimaduras (BRASIL, 2002). O FPS foi acompanhado durante período de dois meses (**TABELA 25**) para avaliar se a inclusão dos filtros solares nos lipossomas interferia nos valores de FPS.

TABELA 25: Avaliação das formulações em relação ao FPS *in vitro*.

Formulações	FPS no preparo	FPS após 2 meses
Gel + filtros livres	11,30 ± 0,249	10,17 ± 0,112
Gel + filtros em lipossomas	11,50 ± 0,356	11,20 ± 0,388
média ± desvio padrão		

O tratamento estatístico dos dados apresentados foi realizado através do Teste t de Student. Os valores de FPS no preparo das formulações indicam não haver diferença estatisticamente significativa entre as duas formulações ($p = 0,470$), ou seja, não há diferença no FPS se incorporar os filtros solares na formulação ou deixá-los livres na formulação, já que diferenças são consideradas estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$. No preparo das amostras para a leitura no espectrofotômetro, as amostras são diluídas em etanol P.A., o qual promove a destruição das vesículas lipossomais, e, dessa forma, o método não é capaz de detectar diferenças quanto aos filtros solares ficarem livres na formulação ou inclusos em lipossomas. O ideal para avaliação da influência do lipossoma na formulação seria através do ensaio de FPS *in vivo*.

Após dois meses de preparo das formulações, observa-se uma redução no FPS de 10,0% para a formulação de gel Natrosol® contendo os filtros solares livres, enquanto que para a formulação contendo os filtros solares inclusos nos lipossomas, esta queda foi de 2,6% em relação ao inicial. Os valores de FPS após o período de dois meses de armazenamento das formulações indicam haver diferença significativa entre as formulações ($p = 0,012$).

Ao comparar o FPS da formulação gel com filtros solares livres no preparo e após período de 2 meses observa-se uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,02$), diferentemente da formulação com os filtros inclusos em lipossomas em que não foi evidenciado diferença estatística ($p = 0,380$) entre os valores de FPS encontrados. Os resultados mostram que a presença dos lipossomas pode contribuir na manutenção da estabilidade da combinação de filtros solares utilizada em um período de 2 meses. Esses resultados corroboram o estudo de Santos (2007) que avaliou o FPS em um período de 3 meses de formulações gel com os filtros solares benzofenona-3 e p-metoxicinamato de octila inclusos e não inclusos em lipossomas e evidenciou uma manutenção de estabilidade na formulação com essas substâncias inclusas nos lipossomas.

4.6 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DOS FILTROS SOLARES EM DIFERENTES MEIOS

Com o objetivo de estudar a liberação *in vitro* de produtos farmacêuticos contendo ativos que apresentam uma baixa solubilidade em água, soluções receptoras contendo surfactantes ou ainda, solventes orgânicos podem ser necessárias para garantir a solubilidade adequada para a manutenção da condição *sink*.

Na literatura, para a análise de filtros solares, algumas soluções receptoras já foram descritas para estudos de liberação e permeação *in vitro*, tais como tampão fosfato pH 7,4 com soro albumina bovina a 4% (p/v) para a análise de BMDM incluso em ciclodextrinas (SIMEONI, SCALIA & BENSON, 2004), solução de miglyol 812 em etanol 96% (1:9) para nanopartículas sólido-lipídicas de oxibenzona (WISSING & MULLER, 2002), solução tampão fosfato pH 7,4 com Tween 80 a 5% (p/p) para nanocápsulas contendo p-metoxicinamato de octila (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2001), solução tampão fosfato pH 7,4 (40%), etanol (50%) e polietilenoglicol 20 oleil éter (10%) para estudos dos filtros solares 3,4-MBC e BMDM em formulações convencionais (SASSON, 2006) e solução tampão pH 7,4 com oleil éter a 4% (p/v) para análise da oxibenzona e N,N-dietil-m-toluamida em produtos fotoprotetores e repelentes (DEET) (WANG, KASICHAYANULA & GU, 2006).

A solução tampão fosfato pH 7,4 é muito descrita na literatura e além disso, obedece outras características recomendadas para emprego como solução receptora em estudos de liberação *in vitro*, como ser compatível com o método analítico empregado, possibilitando a injeção direta das amostras no sistema cromatográfico eleito para quantificação dos ativos (SHAH, ELKINS & WILLIAMS, 1999).

Foram testadas algumas soluções receptoras para os filtros solares em estudo, solução tampão fosfato pH 7,4 contendo etanol 30% (v/v) e solução tampão fosfato pH 7,4 com 2, 2,5, 3, 3,5 e 4% de polissorbato 80 (Tween 80) e os valores encontrados de solubilidade estão demonstrados na **TABELA 26**.

TABELA 26: Estudo de solubilidade para o 3,4-MBC e o BMDM.

Solução Receptora	Concentração (µg/mL)	
	3,4-MBC	BMDM
Tampão fosfato pH 7,4 com etanol 30% (v/v)	1499,0	598,4
Tampão fosfato pH 7,4 com 2% Tween 80	845,0	427,7
Tampão fosfato pH 7,4 com 2,5% Tween 80	960,4	589,6
Tampão fosfato pH 7,4 com 3% Tween 80	1236,9	672,2
Tampão fosfato pH 7,4 com 3,5% Tween 80	1451,0	677,1
Tampão fosfato pH 7,4 com 4% Tween 80	1482,9	677,9

De acordo com o FDA (U.S. FDA/CDER, 1997), é permitido o uso de soluções hidroalcólicas como meio receptor para o estudo de liberação *in vitro*, quando o ativo for muito pouco hidrossolúvel, como é o caso dos filtros solares, 3,4-MBC e BMDM.

Além disso, quando o ativo apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, pode ser requerido o uso de tensoativos. Estes compostos têm como função diminuir a tensão interfacial entre o soluto e o solvente em que está contido, já que esses agentes contêm grupos hidrófilos e lipofílicos. Os tensoativos podem ser aniônicos, catiônico, anfotéricos e não

iônicos, sendo os mais usuais lauril sulfato de sódio, tween 80 e brometo de cetiltrimetilamônio (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000; LACHMAN, LIEBERMAN & KANIG, 2001). O tensoativo tween 80 foi escolhido por ser um tensoativo não iônico que apresenta um valor de HLB de 15, portanto, menos hidrofílico do que quando comparado com outros tensoativos como o lauril sulfato de sódio que apresenta HLB próximo de 40, sendo considerado hidrofílico (ANSEL, POPOVICH & ALLEN, 2000). O 3,4-MBC e o BMDM apresentam um coeficiente de partição ($\log K$) de 1,069 e 0,654, respectivamente (SASSON, 2006), mostrando um caráter lipofílico, o que ajuda a explicar a afinidade pelas micelas de tween 80 e, como consequência, uma maior solubilidade nos meios que o contêm.

De acordo com a **TABELA 26**, embora o valor máximo de 3,4-MBC tenha sido encontrado na solução tampão fosfato pH 7,4 contendo etanol 30% (v/v), esta solução não foi escolhida como solução receptora, já que o etanol nessa concentração poderia interferir na análise da formulação gel contendo lipossomas, visto que foi mostrado anteriormente, que solução de etanol a 25% (v/v) pode destruir as vesículas lipossomais com o tempo de contato.

Avaliando os resultados, observa-se que os filtros solares apresentaram uma menor solubilidade nos meios contendo mais baixas concentrações de tensoativo, 2% e 2,5% de Tween 80. Valores maiores de solubilidade foram obtidos com soluções contendo maiores concentrações do tensoativo, na faixa de 3,5% e 4%. Dessa forma, a solução receptora escolhida foi tampão fosfato pH 7,4 contendo 4% de tween 80 devido a maior concentração de saturação encontrada de 1482,9 $\mu\text{g/mL}$ para o 3,4-MBC e 677,98 $\mu\text{g/mL}$ para o BMDM, obedecendo desta forma a condição *sink*.

4.7 ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DAS FORMULAÇÕES

O uso de célula de difusão de Franz para avaliação da liberação de filtros solares a partir de diferentes formulações já foi descrito em vários trabalhos (ALVAREZ-ROMÁN *et al.*, 2001; WISSING & MÜLLER, 2002; YENER, INCEGÜL & YENER, 2003; WANG, KASICHAYANULA & GU, 2006). Os estudos de liberação *in vitro* foram realizados em células de Franz, utilizando membrana sintética de acetato de celulose.

Nas **TABELAS 27** e **28** estão apresentadas as massas médias de 3,4-MBC encontradas em cada tempo de coleta de amostra da solução receptora, normalizadas pela área de contato para a formulação gel de Natrosol® com os filtros solares livres e formulação lipossomada, respectivamente.

TABELA 27: Massa cedida de 3,4-MBC em cada tempo de coleta por área, da formulação contendo gel de Natrosol® com os filtros solares livres, utilizando membrana sintética de acetato de celulose (n = 6).

Tempo (min)	Quantidade cedida/área (µg/cm²)	Desvio Padrão (dp)
30	1,33	0,10
60	1,62	0,40
90	2,04	0,39
120	2,37	0,42
150	2,75	0,40
180	2,87	0,36

TABELA 28: Massa cedida de 3,4-MBC em cada tempo de coleta por área, da formulação contendo gel de Natrosol® com os filtros solares inclusos em lipossomas, utilizando membrana sintética de acetato de celulose (n = 6).

Tempo (min)	Quantidade cedida/área (µg/cm²)	Desvio Padrão (dp)
30	0,51	0,09
60	0,86	0,19
90	1,16	0,17
120	1,50	0,09
150	1,78	0,11
180	1,86	0,14

Observa-se nas **TABELA 27** e **28** que a formulação gel de Natrosol® com os filtros solares livres foi a que cedeu a maior quantidade de 3,4-MBC para a solução receptora $2,87 \pm 0,36 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ em 180 minutos, enquanto que a formulação com os filtros solares inclusos em lipossomas liberou $1,86 \pm 0,14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de 3,4-MBC ao final de 180 minutos, valor menor do que a quantidade cedida pela formulação contendo os filtros solares livres. Pode-se sugerir que a inclusão dos filtros solares em sistemas lipossomais é capaz de dificultar a difusão do 3,4-MBC para a solução receptora quando comparada esta formulação com a anterior.

Nas **FIGURAS 44** e **45** observa-se a representação gráfica dos resultados expressos na **TABELAS 27** e **28**, respectivamente.

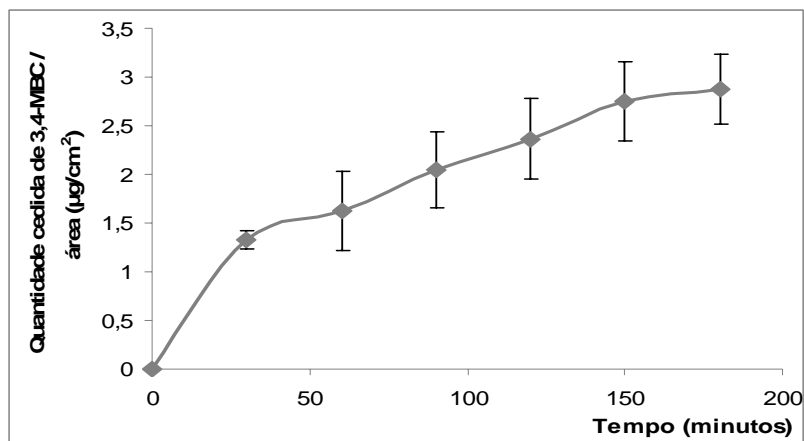


FIGURA 44: Massa de 3,4-MBC acumulada na solução receptora normalizada pela área de contato em função do tempo na formulação gel de Natrosol® com filtros solares livres.

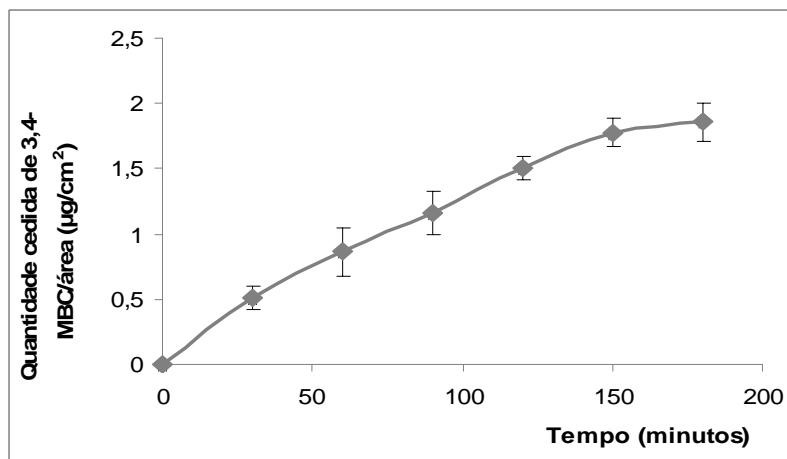


FIGURA 45: Massa de 3,4-MBC acumulada na solução receptora normalizada pela área de contato em função do tempo na formulação gel de Natrosol® com filtros solares inclusos em lipossomas.

Observa-se que a formulação gel com os filtros solares inclusos em lipossomas apresentou uma taxa de cedência mais regular, já que a concentração de 3,4-MBC é crescente com o tempo (**FIGURAS 44 e 45**); ademais, o desvio padrão entre as seis células foi menor do que o encontrado na formulação com os filtros solares livres, indicando uma variabilidade menor entre as réplicas do ensaio de liberação.

O fluxo foi calculado por regressão linear de cada célula e corresponde à inclinação dos pontos experimentais a partir do tempo de 60 minutos, assumindo-se que a a partir deste ponto o equilíbrio de difusão já estaria alcançado. O valor do fluxo encontrado foi $0,661 \pm 0,086 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para a formulação com os filtros solares livres e $0,520 \pm 0,114 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para a formulação lipossomada.

A comparação entre os fluxos obtidos para a liberação do 3,4-MBC foi realizada através do teste t de Student que visa testar a diferença entre as médias de dois conjuntos de resultados, sendo usado para amostras pequenas (MENDHAM *et al.*, 2002). Pelos valores de fluxos encontrados há uma diferença estatística significativa ($p = 0,036$) entre ambas as formulações, considerando o intervalo de confiança de 95%.

As massas médias de BMDM encontradas na solução receptora nas células de difusão de Franz, equipadas com membrana sintética de acetato de celulose, normalizadas pela área de contato, em função do tempo estão dispostas nas **TABELAS 29 e 30** para a formulação gel de Natrosol® com os filtros solares livres e formulação lipossomada, respectivamente.

TABELA 29: Massa cedida de BMDM em cada tempo de coleta por área, da formulação contendo gel de Natrosol® com os filtros solares livres, utilizando membrana sintética de acetato de celulose ($n = 6$).

Tempo (min)	Quantidade cedida/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Desvio Padrão (dp)
30	0,40	0,11
60	0,53	0,17
90	0,65	0,16
120	0,84	0,27
150	0,97	0,33
180	1,09	0,35

TABELA 30: Massa cedida de BMDM em cada tempo de coleta por área, da formulação contendo gel de Natrosol® com os filtros solares inclusos em lipossomas, utilizando membrana sintética de acetato de celulose (n = 6).

Tempo (min)	Quantidade cedida/área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Desvio Padrão (dp)
30	0,33	0,09
60	0,41	0,10
90	0,51	0,10
120	0,57	0,12
150	0,64	0,13
180	0,68	0,17

A quantidade de BMDM cedida pela formulação gel de Natrosol® com os filtros solares livres foi de $1,09 \pm 0,35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ em 180 minutos (**TABELA 29**), diferentemente da formulação com os filtros solares inclusos em lipossomas em que houve uma liberação de BMDM de $0,68 \pm 0,17 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ no final de 3 horas (**TABELA 30**). Sendo assim, a formulação lipossomada cedeu menor quantidade de BMDM quando comparada a formulação contendo os filtros solares livres.

Da mesma forma que ocorreu na liberação do 3,4-MBC, o ensaio de cedência para o BMDM apresentou desvio padrão entre as células adequado, com baixa variabilidade entre as réplicas. A formulação lipossomada apresentou uma cedência mais regular.

Nas **FIGURAS 46 e 47** observa-se a representação gráfica dos resultados expressos nas **TABELAS 29 e 30**, respectivamente.

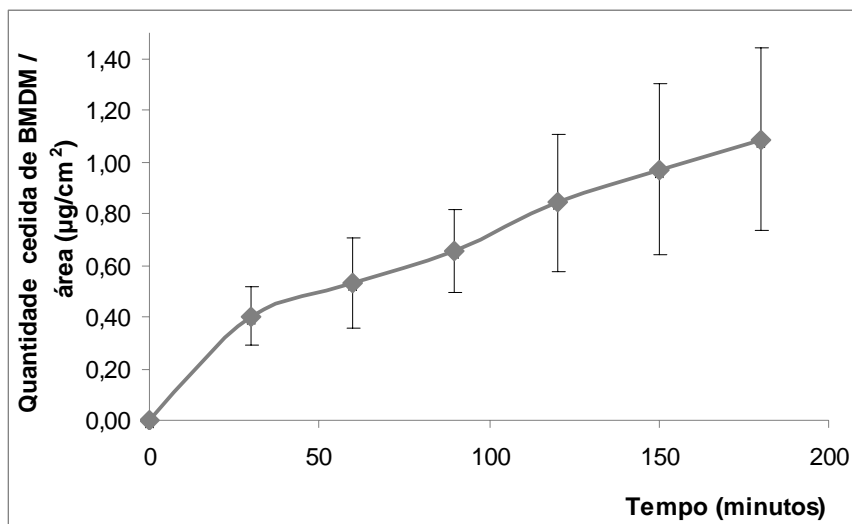


FIGURA 46: Massa de BMDM acumulada na solução receptora normalizada pela área de contato em função do tempo na formulação gel de Natrosol® com filtros solares livres.

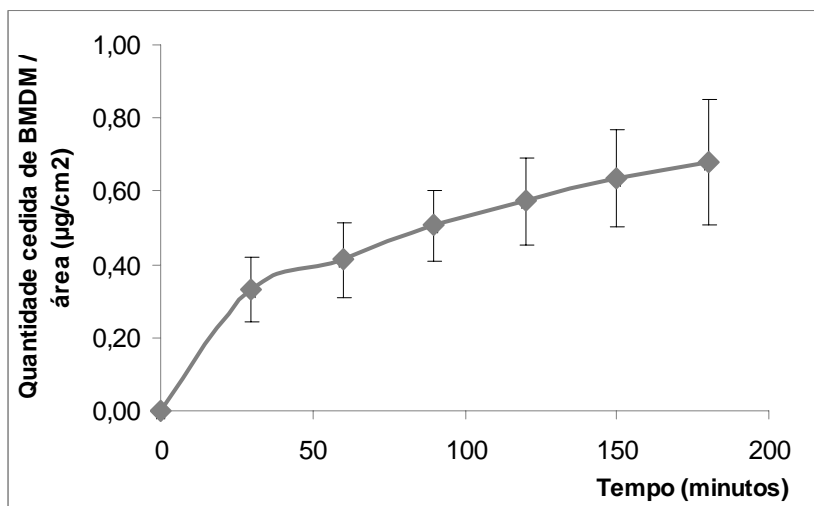


FIGURA 47: Massa de BMDM acumulada na solução receptora normalizada pela área de contato em função do tempo na formulação gel de Natrosol® com filtros solares inclusos em lipossomas.

A fim de calcular o fluxo da liberação do BMDM, foi realizada a regressão linear de cada célula a partir de 60 minutos. O valor encontrado foi de $0,285 \pm 0,187 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para a formulação com os filtros solares livres e $0,133 \pm 0,037 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ para a formulação lipossomada.

A comparação entre os fluxos obtidos para a liberação de BMDM foi feita por teste t de Student. As formulações não apresentaram diferenças estatisticamente significativas para o fluxo ($p = 0,079$), considerando intervalo de confiança de 95%.

Guy e Hadgraft (1990) propuseram para a linearização dos dados que o tratamento dos estudos de liberação *in vitro* deveria compreender a adoção de função com base na raiz quadrada do tempo (GUY & HADGRAFT, 1990). A linearidade foi confirmada adotando o modelo de Higuchi pelos coeficientes de correlação (r) apresentados na **TABELA 31** e é a garantia que a taxa de liberação foi mantida constante a partir de 60 minutos, para ambas as formulações. Foi encontrada uma boa linearidade ($r > 0,99$) para a quantidade de filtros solares cedida em função da raiz quadrada do tempo, para ambas as formulações.

TABELA 31: Coeficientes de correlação (r) observados a partir de 60 minutos utilizando o modelo de Higuchi.

Formulações		Coefficiente de correlação (r)
Gel + filtros livres	3,4-MBC	0,9946
	BMDM	0,9957
Gel + filtros em lipossomas	3,4-MBC	0,9917
	BMDM	0,9970

Para facilitar a comparação das quantidades cedidas de 3,4-MBC e BMDM das diferentes formulações foi construída a **TABELA 32**, contendo os resultados já apresentados anteriormente.

TABELA 32: Comparação das massas cedidas de 3,4-MBC e BMDM em cada tempo de coleta por área, entre as duas formulações, utilizando membrana sintética de acetato de celulose.

Tempo (minutos)	Quantidade de 3,4-MBC cedido por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)		Quantidade de BMDM cedido por área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	
	Gel com filtros livres	Gel com filtros lipossomados	Gel com filtros livres	Gel com filtros lipossomados
30	$1,33 \pm 0,10$	$0,51 \pm 0,09$	$0,40 \pm 0,11$	$0,33 \pm 0,09$
60	$1,62 \pm 0,40$	$0,86 \pm 0,19$	$0,53 \pm 0,17$	$0,41 \pm 0,10$
90	$2,04 \pm 0,39$	$1,16 \pm 0,17$	$0,65 \pm 0,16$	$0,51 \pm 0,10$
120	$2,37 \pm 0,42$	$1,50 \pm 0,09$	$0,84 \pm 0,27$	$0,57 \pm 0,12$
150	$2,75 \pm 0,40$	$1,78 \pm 0,11$	$0,97 \pm 0,33$	$0,64 \pm 0,13$
180	$2,87 \pm 0,36$	$1,86 \pm 0,14$	$1,09 \pm 0,35$	$0,68 \pm 0,17$

Pelos valores encontrados na **TABELA 32** pode-se sugerir que a inclusão dos filtros solares em estudo, em sistemas de liberação, como os lipossomas, faz com que a partição do 3,4-MBC e do BMDM da formulação para a solução receptora seja menor, permitindo que fiquem mais tempo retidos na formulação. Portanto, se o mesmo comportamento ocorrer *in vivo*, pode-se extrapolar que uma formulação com os ativos incluídos em lipossomas ficariam mais tempo retidos na pele, local onde os fotoprotetores devem atuar. Essa ação da formulação lipossomal corrobora os estudos de Glavas-Dodov e colaboradores (2002) que avaliaram a cinética de liberação de uma formulação gel contendo cloridrato de lidocaína encapsulado em lipossomas por um período de 24 horas e os resultados mostraram que o perfil de liberação *in vitro* é de uma difusão controlada, em que os lipossomas atuam como um sistema reservatório para a liberação contínua do fármaco.

Além disso, pode ser observado que para o filtro solar que absorve na faixa do UVB, o 3,4-MBC, a quantidade cedida para a solução receptora após 180 minutos é mais que o dobro da quantidade cedida pelo BMDM. Lembrando que é descrito na literatura que o 3,4-MBC apresenta efeitos estrogênicos (MUELLER *et al.*, 2003; SCHLUMPF *et al.*, 2004; SCIDLOVÁ-WUTTKE *et al.*, 2006), diminuir a capacidade de liberação do ativo da

formulação para aumentar a sua concentração na epiderme minimiza o risco de absorção percutânea e aumenta a segurança e a eficácia da formulação. Logo, a formulação lipossomal apresenta-se como uma formulação promissora, oferecendo um menor risco de atividade hormonal e outros efeitos deletérios provocados por esta molécula.

Os resultados apresentados na **TABELA 32** foram dispostos em gráficos (**FIGURAS 48 e 49**) que relacionam a quantidade cedida dos filtros solares em função do tempo, comparando as duas formulações, gel com os filtros solares livres e inclusos em lipossomas.

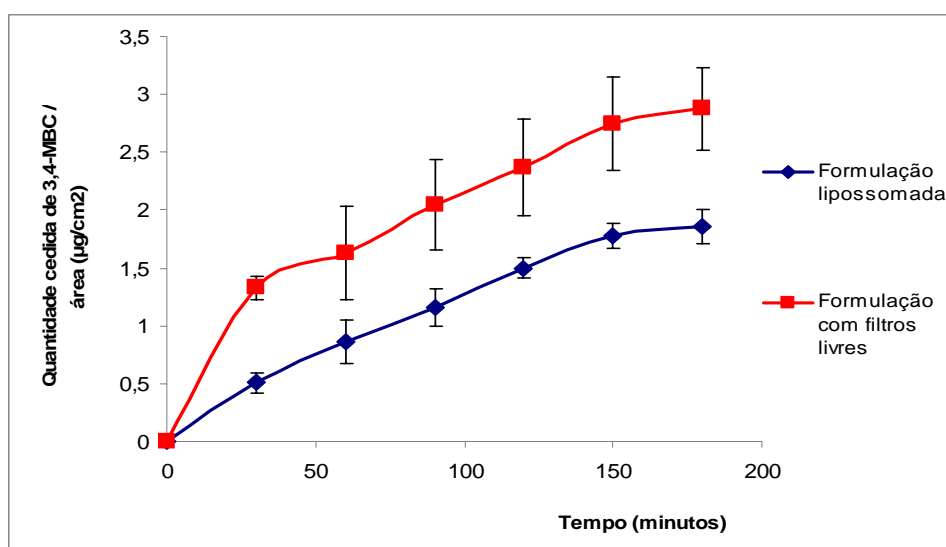


FIGURA 48: Estudo da cedência do 3,4-MBC nas duas formulações desenvolvidas.

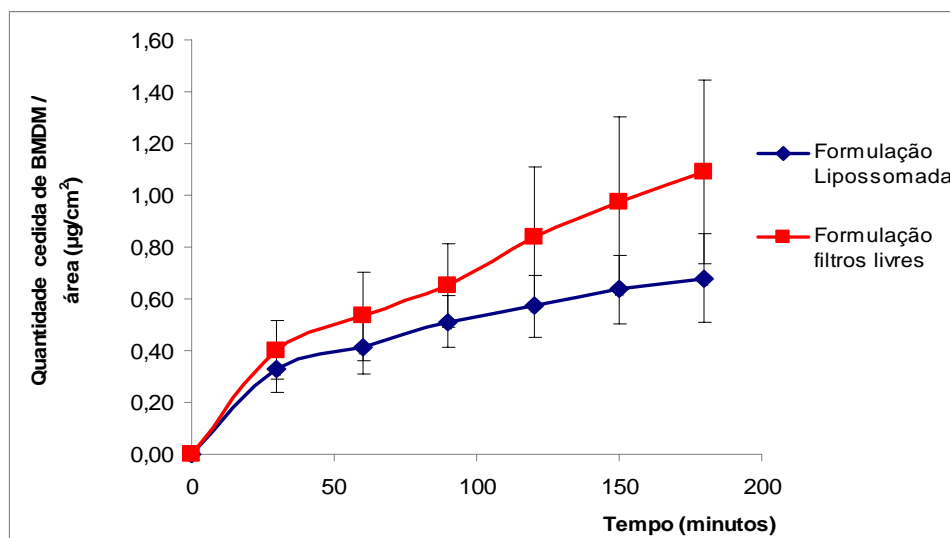


FIGURA 49: Estudo da cedência do BMDM nas duas formulações desenvolvidas.

Os resultados encontrados corroboram os de Mota (2005) que estudou a liberação de p-metoxicinamato de octila (MCO) em três formulações: gel de carbopol com MCO livre, gel de carbopol com MCO incluído em β -ciclodextrina e com MCO incluído em lipossomas. Neste trabalho foi observado que a formulação com MCO incluído em lipossomas foi a que liberou menor quantidade de filtro solar $1,14 \pm 0,07 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ em 180 minutos, com um valor de fluxo de $0,4344 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$.

Os ensaios de liberação *in vitro* são importantes como estudos iniciais para avaliar o comportamento da formulação e a partição dos ativos para o meio receptor. No entanto, para uma análise mais profunda e confirmação dos resultados são necessários realizar os estudos de permeação cutânea *in vitro*, pois a partir desta técnica é possível estudar os parâmetros que influenciam desde a liberação do ativo do veículo para a superfície cutânea até sua difusão nas camadas da pele, quantificando a penetração dos ativos entre os tecidos da pele e a distribuição sistêmica dos mesmos para prover um melhor entendimento do potencial de toxicidade dos filtros solares.

5. CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que:

- O método de hidratação do filme lipídico foi o mais adequado para a preparação dos lipossomas com os filtros solares sólidos 3,4-MBC e BMDM. A relação de aprisionamento mais adequada foi obtida com as concentrações 8,4 mM de 3,4-MBC e 6,3 mM de BMDM para 42 mM de fosfolipídios, devido à proporção adequada entre a quantidade de filtro solar incorporado e fosfolipídios.
- Os métodos utilizados para a avaliação dos lipossomas mostraram-se adequados para análise qualitativa e quantitativa dos lipossomas.
- Ambos os métodos, MO e DLS, mostraram-se úteis e complementares entre si para a análise do tamanho das vesículas nas preparações lipossomais. A visualização microscópica dos lipossomas por MO permitiu a confirmação da formação de vesículas e confirmou as diferenças de tamanho das frações antes e após filtração em membranas de polycarbonato, indicando um processo de normalização adequado. Os diâmetros encontrados pela DLS demonstraram que os lipossomas obtidos estavam dentro da faixa pretendida (em torno de 300 nm).
- O método proposto para a identificação, separação e quantificação dos filtros solares 3,4-MBC e BMDM por CLAE na formulação gel de Natrosol® com os filtros solares livres demonstrou ser econômico, sensível, preciso, reprodutível, robusto e linear na faixa de trabalho selecionada. Além disso, esse método foi adequado também para a quantificação desses filtros solares na formulação lipossomada.
- O resultado do FPS *in vitro* pelo método de Mansur demonstrou haver diferenças estatisticamente significativa entre as formulações (gel com os filtros solares livres e inclusos nos lipossomas) após período de 2 meses. Os valores de FPS encontrados

indicaram que a presença dos lipossomas pode contribuir na manutenção da estabilidade da combinação de filtros solares utilizada em um período de 2 meses.

- Após a determinação da concentração de saturação dos filtros solares por CLAE, verificou-se que a melhor solução receptora para o estudo de liberação *in vitro* nas formulações desenvolvidas foi tampão fosfato pH 7,4 contendo 4% de tween 80, devido a maior concentração de saturação encontrada, obedecendo desta forma a condição *sink*.
- A formulação contendo os filtros solares inclusos em lipossomas foi a que apresentou uma menor quantidade de filtros solares cedidos para a solução receptora, conseguindo, dessa forma, reter mais os filtros solares, liberando-os de maneira mais lenta.
- A formulação contendo os filtros solares inclusos em lipossomas apresentou uma baixa variabilidade entre as réplicas do ensaio de liberação *in vitro*, indicando uma boa repetibilidade, fato este observado pelos menores valores de desvios padrão, quando comparado com a formulação contendo os filtros solares livres.
- O estudo de liberação *in vitro* indica que formulações contendo filtros solares inclusos em sistemas de liberação, como os lipossomas, são promissoras, já que oferecem uma menor cedência dos filtros solares sólidos 3,4-MBC e BMDM da formulação para a solução receptora, possibilitando uma menor absorção percutânea.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. A. **Farmacotécnica**: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 6. ed. São Paulo: Ed. Premier, 2000. p. 244-245; 398-400.

AZULAY, R. D., AZULAY, D. R. **Dermatologia**. 2. ed. São Paulo: Ed. Guanabara Koogan, 1997. p. 1-14.

AZZELLINI, S. C. Agentes Potencializantes de Fotoprotetores. **Cosmetics & Toiletries**, v. 7, n. 4, jul./ago, 1995. Ed. Português.

BARGOIL, S. C.; ERDMAN, L. K. Safe tan. **Cancer Nursig**, v. 16, n. 2, p. 139-144, 1993.

BARRY, B. W. Mode of action of penetration enhancers in human skin. **Journal of Controlled Release**, v. 6, p. 85-97, 1987.

BARTH, A. L.; REZENDE, V. P.; DORNELAS, C. B.; GARCIA, S.; SANTOS, E. P. Fator de proteção solar versus coeficiente de carga de filtros solares químicos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 81, p. 87-90, 2000.

BARTLETT, G. R. Phosphorus assay in column chromatography. **Journal of Biological Chemistry**, v. 234, n. 3, p. 466-468, 1959.

BENTLEY, M. V.; LOPEZ, R. F. Curso de permeação cutânea *in vitro* II. Ribeirão Preto: 2002. Apostila

BETZ, G.; AEPPLI, A.; MENSCHUTINA, N.; LEUENBERGER, H. *In vivo* comparison of various liposome formulations for cosmetic application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 296, p. 44-54, 2005.

BILLHIMER, W. L. Avaliação de filtros solares em seres humanos: proteção contra queimadura solar. **Cosmetics & Toiletries**, v. 1, p. 4-44, 1989.

BILOTI, D. N.; REIS, M. M.; FERREIRA, M. M. C.; PESSINE, F. B. T. Photochemical behavior under UVA radiation of β -cyclodextrin included Parsol[®] 1789 with a chemometric approach. **Journal of Molecular Structure**, v. 481, p. 557-561, 1999.

BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 4, p. 531-537, 2006.

BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, P. L. Skin structure and mode of action of vesicles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 1, p. 41-55, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 47, de 16 de março de 2006. Lista de filtros ultravioletas permitidos para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 17 mar. 2006. Disponível em: <<http://www.e-legis.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 01 set. 2006.

_____. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em: <<http://www.e-legis.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 13 fev. 2007.

_____. Resolução RDC nº 237, de 22 de agosto de 2002. Regulamento técnico sobre protetores solares em cosméticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 ago. 2002. Disponível em: <<http://www.e-legis.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 01 set. 2006.

CANTREL, A.; MCGARVEY, D. J. Photochemical studies of 4-tert-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane (BM-DBM). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 64, p. 117-122, 2001.

CHATELAIN, E.; GABARD, B. Photostabilization of butyl methoxydibenzoylmethane (avobenzene) and ethylhexyl methoxycinnamate by bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (tinosorb S), a new UV broadband filter. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 3, p. 401-406, 2001.

COUTEAU, C.; CULLEL, N. P.; CONNAN, A. E.; COIFFARD, L. J. M. Stripping method to quantify absorption of two sunscreens in human. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 222, p. 153-157, 2001.

DAMIANI, E.; GRECI, L.; PARSONS, R.; KNOWLAND, J. Nitroxide radicals protect DNA from damage when illuminated in vitro in the presence of dibenzoylmethane and a common sunscreen ingredient. **Free Radical Biology Medicine**, v. 26, p. 809-816, 1998.

DEFLANDRE, A.; LANG, G. Photoisomerization of benzylidene camphor and derivatives. **Cosmetics & Toiletries**, v.103, p.69-75,1988.

DIEMBECK, W.; BECK, H.; BENECH-KIEFFER, F.; COURTELLEMONT, P.; DUPUIS, J.; LOVELL, W.; PAYE, M.; SPENGLER, J.; STEILING, W. Test guidelines for *in vitro* assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 191-205, 1999.

DIFFEY, B. L.; TANNER, P. R.; MATTS, P. J.; NASH, J. F. In vitro assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreens products. **Journal of American Academy Dermatology**, v. 43, p. 1024-1035, 2000.

DU PLESSIS, J.; RAMACHANDRAN, C.; WEINER, N.; MÜLLER, D. G. The influence of particle size of liposomes on the disposition of drug into the skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 103, p. 277-282, 1994.

DUTRA, E. A.; KEDOR, E. R. M.; SANTORO, M. I. R. M. Validation of a high performance liquid chromatography method for sunscreen determination in cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 24, p. 97 – 102, 2002.

EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Analysis of liposomes. **Talanta**, v. 68, p. 1432-1441, 2006.

ELIAS, P. M. Epidermal barrier function: intercellular epidermal lipid structures, origin, composition and metabolism. **Journal of Controlled Release**, v. 15, p. 199-208, 1991

ELSAYED, M. M. A.; ABDALLAH, O. Y.; NAGGAR, V. F.; KHALAFALLAH, N .M. Lipids vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 332, p. 1-16, 2007.

ENCICLOPÉDIA de absorvedores de UV para produtos com filtro solar. **Cosmetics & Toiletries**, v. 7, n. 4, p.47-58, 1995. Ed. Português.

ESPOSITO, E.; DRECHSLER, M.; MARIANI, P.; SIVIERI, E.; BOZZINI, R.; MONTESI, L.; MENEGATTI, E.; CORTESI, R. Nanosystems for skin hydration: a comparative study. **International Journal of cosmetic Science**, v. 29, p. 39-47, 2007.

FERREIRA, H.; LÚCIO, M.; SIQUET, C.; REIS, S. Utilização de modelos membranares na avaliação da atividade de fármacos. **Química**, v. 99, p. 39-51, 2005.

FILHO, E. A. S.; SENA, G. L.; PIRES, J. M. Moléculas inibidoras de radiação UV. **Cosmetics & Toiletries**, v. 15, p. 82-84, 2003. Ed. Português.

FINLAY-JONES, J.; HART, P. H. Photoprotection: sunscreens and the immunomodulatory effects of UV irradiation. **Mutation Research**, v. 422, p. 155-159, 1998.

FRIEND, D. R. *In vitro* skin permeation techniques. **Journal of Controlled Release**, v. 18, p. 235-248, 1992.

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

GILCHREST, B. A.; PARK, H. Y.; ELLER, M. S.; YAAR, M. Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 63, n. 1, p. 1-10, 1996.

GLAVAS-DODOV, M.; GORACINOVA, K.; MLADENOVSKA, K.; FREDRO-KUMBARADZI, E. Release profile of lidocaine HCl from topical liposomal gel formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 381-384, 2002.

GÓMEZ-HENS, A.; FERNÁNDEZ-ROMERO, J. M. The role of liposomes in analytical processes. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 1, p. 9-19, 2005.

GUPTA, V. K.; ZATZ, J. L.; REREK, M. Percutaneous absorption of sunscreens through micro-yucatan pig skin *in vitro*. **Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 10, p. 1602-1607, 1999.

GUY, R. H.; HADGRAFT, J. On the determination of drug release rates from topical dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 60, p. R1-R3, 1990.

HAIGH, J. M.; SMITH, E. W. The selection of natural and synthetic membranes for *in vitro* diffusion experiments. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 2, p. 311-330, 1994.

HARRIGAN, P. R.; MADDEN, T. D.; CULLIS, P. R. Protection of liposomes during dehydration or freezing. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 52, p. 139-149, 1990.

HENRIQUES, B. G.; SANTOS, E. P.; GARCIA, S. **Inclusão de 3-(4-metilbenzilideno) cânfora em lipossomas**. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO E IBÉRICO DE QUÍMICOS COSMÉTICOS, 2005, Cuscu.

IANNUCCELLI, V.; SALA, N.; TURSILLI, R.; COPPI, G.; SCALIA, S. Influence of liposphere preparation on butyl-methoxydibenzoylmethane photostability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 63, p. 140-145, 2006.

JANJUA, R. N.; MOGENSEN, B.; ANDERSSON, A.; PETERSEN, J. H.; HENRIKSEN, M.; SKAKKEBAEK, N. E.; WULF, H. C. Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methyl-benzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, p. 57-61, 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1995. p. 301-312.

KAIDBEY, K. H.; BARNES, A. Determination of UVA protection factors by means of immediate pigment darkening in normal skin. **Journal of American Academy Dermatology**, v. 25, p. 262-266, 1991.

KIRCHHOFF, V. W. J. H. **Ozônio e radiação UV**. São Paulo: Ed. Transitec, 1995.

KIRJAVAINEN, M.; URTTI, A.; VALJAKKA-KOSKELA, R.; KIESVAARA, J.; MÖNKKÖNEN, J. Liposome – skin interactions and their effects on the skin permeation of drugs. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 7, p. 279-286, 1999.

KIRJAVAINEN, M. URTTI, A.; JÄÄSKELÄINEN, I.; SUHONEN, M.; PARONEN, P.; VALJAKKA-KOSKELA, R.; KIESVAARA, J.; MÖNKKÖNEN, J. Interactions of liposomes with human skin in vitro-the influence of lipid composition and structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1304, p. 179-189, 1996.

KULLAVANIJAYA, P.; LIM, H. W. Photoprotection. **Journal of American Academy Dermatology**, v. 52, p. 937-958, 2005.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. 3. ed. Lisboa: Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v. 2. p. 855-894,

LEAL, L. H. M. **Fundamentos de microscopia**. Rio de Janeiro: Ed. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2000. p. 33-58.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 77, n. 5, p. 563-569, 2002.

LEONARDI, G. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Penetração cutânea. **Cosmetics & Toiletries**, v. 9, p. 34-36, 1997. Ed. Português.

LIAN, T.; HO, R. J. Y. Trends and developments in liposome drug delivery systems. **Journal of the Pharmaceutical Sciences**, v. 90, n. 6, p. 667-679, 2001.

LOBO, B. W. P. **Avaliação da estabilidade físico-química de misturas totais de nutrientes para uso intravenoso neonatal**. 2005. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

MANSUR, J. S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. A.; AZULAY, R. D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 61, n. 3, p. 121-124, 1986.

MARGINEANLAZAR, G.; FRUCTUS, A. E.; BAILLET, A.; BOCQUET, J. L. THOMAS, P.; MARTY, J. P. Sunscreens photochemical behaviour: *in vivo* evaluation by the stripping method. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 19, p. 87-101, 1997.

MASSON, P.; SCOTTI, L. Fotoproteção: um desafio para a cosmetologia. **Cosmetics & Toiletries**, v. 15, p. 42-53, jul-ago, 2003. Ed. Português.

MEHNERT, W.; MÄDER, K.. Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.47, p.165-196, 2001.

MENDHAM, J. DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. J. **Vogel**: análise química quantitativa, 6. ed. Rio de Janeiro: Ed. LTC, 2002.

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.

MOTA, A. **Estudo da cedência de filtros solares inclusos em sistemas de liberação**. 2005. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)– Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

MOYAL, D.; CHARDON, A.; KOLLIAS, N. UVA protection efficacy of sunscreens can be determined by the persistent pigment darkening (PPD) method (part 2). **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, v. 16, p. 250-255, 2000.

MUELLER, S. O.; KLING, M.; FIRZANI, P. A.; MECKY, A.; DURANTI, E.; SHIELDS-BOTELLA, J.; DELANSORNE, R.; BROSCARD, T.; KRAMER, P. Activation of estrogen receptor α and ER β by 4-methylbenzylidene-camphor in human and rat cells: comparison with phyto- and xenoestrogens. **Toxicology Letters**, v. 142, p. 89-101, 2003.

MURPHY, G. M. An Update on photoprotection. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, v. 18, p. 1-4, 2002.

NEW, R. R. C. **Liposomes: a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1997. p.1–23.

NOHYNEK, G. J.; SCHAEFER, H. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 33, p. 285-299, 2001.

OLSON, F.; HUNT, C. A.; SZOKA, F. C.; VAIL, W. J.; PAPAHA DJOPOULOS, D. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 557, p. 9-23, 1979.

PETRAZZUOLI, M. Advances in sunscreens. **Current Problems in Dermatology**, p. 287-290, 2000.

PIERRE, M. B. R.; TEDESCO, A. C.; MARCHETTI, J. M.; BENTLEY, M. V. L. B. Stratum corneum lipids liposomes for the topical delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy of skin cancer: preparation and *in vitro* permeation study. **BMC Dermatology**, p.1-5, 2001.

PUGLIA, C.; TROMBETTA, D.; VENUTI, V.; SAIJA, A.; BONINA, F. Evaluation of *in vivo* topical anti-inflammatory activity of indometacin from liposomal vesicles. **Journal of Pharmaceutical Pharmacology**, v. 56, p. 1225-1232, 2004.

RAMÓN, E.; ALONSO, C.; CODERCH, L.; DE LA MAZZA, A.; LÓPEZ, O.; PARRA, J. L.; NOTARIO, J. Liposomes as alternative vehicles for sun filter formulations. **Drug Delivery**, v. 12, p. 83-88, 2005.

RASTOGI, S. C.; JENSEN, G. H. Identification of UV filters in sunscreen products by high-performance liquid chromatography-diode-array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 828, p. 311-316, 1998.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia aplicada a dermocosmética**. São Paulo: Ed. Pharmabooks, 2006, p.77-120.

RIBEIRO, R. P. **Desenvolvimento de 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.

ROSEN, C. F. Topical and systemic photoprotection. **Dermatologic Therapy**, v. 16, p. 8-15, 2003.

RUOZI, B.; TOSI, G.; FORNI, F.; FRESTA, M.; VANDELLI, M. A. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: two techniques for rapid characterization of liposomes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, p. 81-89, 2005.

RUVOLO, E. C. Fator de proteção solar: comparação dos métodos de determinação por testes em humanos (*in vivo*) (FDA, COLIPA, SAA). **Cosméticos on Line**, v. 105, p. 37-46, 1997.

SALVADOR, A.; CHISVERT, A. Sunscreen analysis. A critical survey on UV filters determination. **Analytica Chimica Acta**, v. 537, p. 1-14, 2005.

SANTOS, E. P.; FREITAS, Z. M.; SOUZA, K. R.; GARCIA, S. *In vitro* and *in vivo* determinations of sun protection factors of sunscreens lotions with octylmethoxycinnamate. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 20, p. 1-5, 1998.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Química Nova**, v. 25, n. 6 B, p. 1181-1185, 2002.

SANTOS, V. M. **Preparação de filtros solares em nanosistema visando a maior ação protetora**. 2007. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SASSON, C. S. **Influência dos veículos cosméticos na permeação cutânea da associação de filtros solares e acetato de tocoferol**. 2006. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

SAYRE, R. M.; AGIN, P. P.; LEEVE, G. J.; MARLOWE, E. Comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of sunscreens formula. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 29, p. 559-566, 1979.

SCALIA, S.; SIMEONI, S.; BARBIERI, A.; SOSTERO, S. Influence of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin photo-induced free radical production by the sunscreen agent, butyl-methoxydibenzoylmethane. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, p. 1553-1558, 2002.

SCALIA, S.; VILLANI, S.; CASOLARI, A. Inclusion complexation of the sunscreen agent 2-ethylhexyl-p-dimethylaminobenzoate with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: effect on photostability. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, n. 12, p. 1367-1374, 1999.

SCALIA, S.; VILLANI, S.; SCATTURIN, A.; VANDELLI, M. A.; FORNI, F. Complexation of the sunscreen agent, butyl-methoxydibenzoylmethane with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 175, p. 205-213, 1998.

SCHLUMPF, M.; JARRY, H.; WUTTKE, W.; MA, R.; LICHTENSTEIGER, W. Estrogenic activity and estrogen receptor β binding of the UV filter 3-benzylidene camphor. Comparison with 4-methylbenzylidene camphor. **Toxicology**, v. 199, p.109-120, 2004.

SCHWACK, W.; RUDOLPH, T. Photochemistry of dibenzoyl methane UVA filters – Part 1. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 28, p. 229-234, 1995.

SCIDLOVÁ-WUTTKE, D.; JARRY, H.; CHRISTOFFEL, J.; RIMOLDI, G.; WUTTKE, W. Comparison of effects of estradiol (E2) with those of octylmethoxycinnamate (OMC) and 4-methylbenzylidene camphor (4MBC) – 2 filters of UV light- on several uterine, vaginal and bone parameters. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 210, p. 246-254, 2006.

SHAH, V. P. Progress in methodologies for evaluation bioequivalence of topical formulations. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 2, n. 5, p. 175-180, 2001.

SHAH, V. P.; ELKINS, J. S.; WILLIAMS, R. L. Evaluation of test system used for *in vitro* release of drugs for topical dermatological drug products. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 4, n. 3, p. 377-385, 1999.

SHARMA, A., SHARMA, U. S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 154, p. 123-140, 1997.

SIMEONI, S.; TURSILLI, R.; BIANCHI, A.; SCALIA, S. Assay of common sunscreen agents in suncare products by high-performance liquid chromatography on a cyanopropyl-bonded silica column. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 250 – 255, 2005.

SIMEONI, S., SCALIA, S., BENSON, H. A. E. Influence of cyclodextrins on *in vitro* human skin absorption of the sunscreen, butyl-methoxydibenzoylmethane. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 163-171, 2004.

SMYRNIOTAKIS, C. G.; ARCHONTAKI, H. A. Development and validation of a non-aqueous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of four chemical UV filters in suncare formulations. **Journal of Chromatography A**, v. 103, p. 319–324, 2004.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química orgânica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Ed. LTC., 2001. v. 1. p. 59-71.

SUZUKI, K., SAKON, K. Aplicação de lipossomas em cosméticos. **Cosmetics & Toiletries**, v. 2, p. 34-41, 1990. Ed. em Português.

U.S. FDA/CDER Department of health and human Services. Food and drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. **Guidance for industry: nonsterile semisolid dosage forms: scale-up and postapproval changes: chemistry, manufacturing, and controls; *in vitro* release testing and *in vivo* bioequivalence documentation**. 1997.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. Official monographs. 30. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2007.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. General Chapters, Chromatography - high-pressure liquid chromatography. 27. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2004.

URLICH, A. S. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. **Bioscience Reports**, v. 22, n. 2, p. 129-150, 2002.

VAN DEN BERGH, B. A.; VROOM, J.; GERRITSEN, H.; JUNGINGER, H. E.; BOUWSTRA, J. A. Interactions of elastic and rigid vesicles with human skin *in vitro*: electron

microscopy and two-photon excitation microscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1461, p. 155-173, 1999.

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

VEMURI, S. ; RHODES, C. T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 70, p. 95-111, 1995.

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

WANG, T. ; KASICHAYANULA, S.; GU, X. *In vitro* permeation of repellent DEET and sunscreen oxybenzone across three artificial membranes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 310, p. 110-117, 2006.

WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. **Journal of Controlled Release**, v. 81, p. 225-233, 2002.

WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H. A novel sunscreen system based on tocopherol acetate incorporated into solid lipid nanoparticles. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 23, p. 233-243, 2001.

WOLF, R.; TÜZÜN, B.; TÜZÜN, Y. Sunscreens. **Dermatologic Therapy**, v. 14, p. 208-214, 2001.

YAROSH, D. B. Liposomes in investigative dermatology. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 17, p. 203-212, 2001.

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

YU, H. Y.; LIAO, H. M. Triamcinolone p from different liposome formulations through rat skin *in vitro*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 127, p. 1-7, 1996.